

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Jarosław Szymon Świrta

„Ocena ekspresji miRNA w osoczu oraz w tkance guza u chorych z rozpoznaniem biopsyjnym podejrzenie nowotworu pęcherzykowego tarczycy w poszukiwaniu biomarkerów różnicujących zmiany łagodne i złośliwe przed zabiegiem operacyjnym”

*Praca doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Marcin Barczyński

Pracę wykonano w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej, III Katedry Chirurgii Ogólnej UJCM

Kierownik kliniki: prof. dr hab. n. med. Marcin Barczyński

Kierownik katedry: prof. dr hab. n. med. Antoni Szczepanik

Kraków, rok 2023

## **Słowa kluczowe**

rak pęcherzykowy tarczycy, gruczolak pęcherzykowy tarczycy, podejrzenie nowotworu pęcherzykowego tarczycy, mikro RNA, sekwencjonowanie nowej generacji, porażenie nerwu krtaniowego wstecznego, limfadenektomia przedziału środkowego szyi

## **Keywords**

follicular thyroid cancer, follicular adenoma, suspicious for follicular neoplasm, micro RNA, new generation sequencing, recurrent laryngeal nerve palsy, central neck dissection

Rodzicom, Babci, Bratu  
Anieli, Laurze, Beniaminowi, Łucji  
Profesorowi Marcinowi Barczyńskiemu

# Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Biblioteka Medyczna

952.833.090.2023

Kraków, 16.03.2023 r.

**JAROSŁAW ŚWIRTA**  
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

**WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
*na podstawie Bibliografii UJ CM z dnia 16.03.2023 r.*

**1.**

Autorzy: **Świrta Jarosław**, Romaniszyn Michał, Barczyński Marcin.

Tytuł oryginału: Czynniki ryzyka złośliwości zmian ogniskowych tarczycy zweryfikowanych w biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej jako "podejrzenie nowotworu pęcherzykowego".

Czasopismo: **Wiadomości Lekarskie**

Szczegóły: **2020** : T. 73, nr 7, s. 1323-1329, bibliogr. 45 poz., abstr., streszcz.

Uwagi: **Open Access** Creative Commons Attribution License CC-BY-NC-ND 4.0.

Uwagi: Autor korespondencyjny: **Jarosław Szymon Świrta**.

p-ISSN: 0043-5147

Charakt. merytoryczna: **praca oryginalna**

Punktacja MEiN: **20.000**

DOI: 10.36740/WLek202007103

**2.**

Autorzy: **Świrta Jarosław**, Romaniszyn Michał, Barczyński Marcin.

Tytuł oryginału: Wpływ elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi u chorych z rozpoznaniem cytologicznym *podejrzenie nowotworu pęcherzykowego* tarczycy na ocenę stopnia zaawansowania choroby nowotworowej i ryzyko powikłań chirurgicznych.

Czasopismo: **Wiadomości Lekarskie**

Szczegóły: **2020** : T. 73, nr 4, s. 629-637, il., bibliogr. 34 poz., abstr., streszcz.

Uwagi: **Open Access** Creative Commons Attribution License CC-BY-NC-ND 4.0.

Uwagi: Autor korespondencyjny: **Jarosław Szymon Świrta**.

p-ISSN: 0043-5147

Charakt. merytoryczna: **praca oryginalna**

Punktacja MEiN: **20.000**

DOI: 10.36740/WLek202004102

3.

Autorzy: **Świrta Jarosław Szymon**, Wątor Gracjan, Seweryn Michał, Kapusta Przemysław, Barczyński Marcin, Wołkow Paweł.

Tytuł oryginału: Expression of micro-ribonucleic acids in thyroid nodules and serum to discriminate between follicular adenoma and cancer in patients with a fine needle aspiration biopsy classified as suspicious for follicular neoplasm : a preliminary study.

Czasopismo: **Advances in Clinical and Experimental Medicine**

Szczegóły: **2023**, il., bibliogr., abstr.

Uwagi: Autor korespondencyjny: **Jarosław Szymon Świrta**

Uwagi: **Open Access** Creative Commons Attribution License CC-BY 3.0

Uwagi: Online First 2023-03-10

p-ISSN: 1899-5276

e-ISSN: 2451-2680

Charakt. formalna: w druku

Charakt. merytoryczna: **praca oryginalna**

Impact Factor: **1.736**

Punktacja MEiN: **70.000**

DOI: 10.17219/acem/160003

Opracowanie: Oddział Informacji Naukowej  
tel. +48 12 657 23 10  
e-mail: [informacja.naukowa@cm-uj.krakow.pl](mailto:informacja.naukowa@cm-uj.krakow.pl)

# Pozostały dorobek naukowy



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Biblioteka Medyczna

952.833.089.2023

Kraków, 16.03.2023 r.

**JAROSŁAW ŚWIRTA**  
UNIwersytet Jagielloński Collegium Medicum

## WYKAZ PUBLIKACJI

*na podstawie Bibliografii UJ CM z dnia 16.03.2023 r.*

**1.**

Świrta Jarosław S., Barczyński Marcin.  
Krwotok po operacji tarczycy.  
Przegląd Lekarski  
2014 : T. 71, nr 2, s. 82-85, il., bibliogr. 24 poz.  
praca oryginalna  
**MEIN: 6.000**

**2.**

Świrta Jarosław Szymon, Krzemień-Grandys Marzena, Totoń-Żurańska Justyna, Kuś Katarzyna,  
Olszanecki Rafał, Jawień Jacek, Wnuk Marcin, Słowik Agnieszka, Godlewski Jacek, Żmudka Krzysztof,  
Korbut Ryszard, Wołkow Paweł Piotr.  
Polymorphism rs7023923 and monocyte count in blood donors and coronary artery disease patients.  
Kardiologia Polska  
2015 : T. 73, nr 6, s. 445-450, il., bibliogr. 252 poz., sum.  
praca oryginalna  
**IF: 0.878**  
**MEIN: 15.000**

**3.**

Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] Sz., Wałęga P[iotr].  
Zabieg proktologiczny - początek drogi przez mękę? Przebieg pooperacyjny w proktologii.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2016, nr 4, s. 22-24, bibliogr. 22 poz.  
praca poglądowa

**4.**

Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] S[zymon], Wałęga Piotr.  
Przewlekła szczelina odbytu. Już nie boli, ale co dalej.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2016, nr 6, s. 41-42, bibliogr.  
praca poglądowa

30-688 Kraków, ul. Medyczna 7, tel. +48 12 658 02 72, tel. kom. +48 661 890 822, sekretariat.bm@cm-uj.krakow.pl  
www.bm.cm.uj.edu.pl

5.  
Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] S[zymon], Wałęga P[iotr].  
Ból odbytu o nieznannej przyczynie - sprawa dla proktologa czy psychologa? Diagnostyka i leczenie zespołów bólowych odbytu.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2016, nr 5, s. 51-54, bibliogr. 15 poz.  
praca poglądowa
6.  
Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] S[zymon], Wałęga P[iotr].  
Trądzik odwrócony okolicy odbytu. Trudny problem na pograniczu prokto- i dermatologii.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2017, nr 4, s. 57-59, il., bibliogr. 21 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**
7.  
Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] S[zymon], Wałęga P[iotr].  
Nabyte zwężenia odbytu. Łatwa diagnoza, trudne leczenie.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2017, nr 1, s. 79-82, il., bibliogr. 15 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**
8.  
Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] S[zymon], Wałęga P[iotr].  
Wrzód samotny odbytnicy.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2017, nr 3, s. 35-36, bibliogr.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**
9.  
Świrta Jarosław Szymon, Barczyński Marcin.  
Zakres limfadenektomii u chorych na raka tarczycy.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2017, nr 4, s. 49-55, il., bibliogr. 61 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**
10.  
Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] S[zymon], Wałęga P[iotr].  
Zakrzep brzeżny odbytu.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2017, nr 2, s. 39-40, bibliogr. 16 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**

**11.**

Świrta Jarosław Szymon, Barczyński Marcin.  
Szybko powiększający się niebolesny guz szyi - czy chirurg jest niezbędny?  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2017, nr 5, s. 37-41, bibliogr. 59 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**

**12.**

Świrta Jarosław Szymon, Piejko Marcin, Barczyński Marcin, Wałęga Piotr.  
Gigantyczny gruczolak dodatkowej przytarczycy przyczyną przetrwałej pierwotnej nadczynności przytarczyc u chorego z chorobą wielogruzołową przytarczyc.  
Przegląd Lekarski  
2017 : T. 74, nr 1, s. 44-47, il., bibliogr. 35 poz.  
Autor korespondencyjny: Jarosław Szymon Świrta.  
praca kazuistyczna  
**MEIN: 10.000**

**13.**

Wałęga Piotr, Świrta Jarosław Sz., Romaniszyn Michał.  
Przetoki odbytu u osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna.  
W: Przetoki przewodu pokarmowego.  
pod redakcją Tomasza Banasiewicza, Adama Bobkiewicza, Dominika A. Walczaka i Grzegorza Wallnera.  
Poznań : Termedia Wydawnictwa Medyczne, 2017.  
s. 343-351 : il., bibliogr., rozdz. 35.  
30 cm.  
rozdział monografii polskiej  
**MEIN: 20.000**

**14.**

Świrta J[arosław] Sz., Romaniszyn M[ichał], Jaśko K[atarzyna], Barczyński M[arcin].  
Rak przytarczyc - leczenie operacyjne.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2018, nr 6, s. 42-49, bibliogr. 105 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**

**15.**

Świrta J[arosław] Sz., Romaniszyn M[ichał], Barczyński M[arcin].  
Pierwotna nadczynność przytarczyc. Leczenie operacyjne z uwzględnieniem technik małoinwazyjnych.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2018, nr 1, s. 45-54, bibliogr. 125 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**



**16.**

Świrta J[arosław] Sz., Romaniszyn M[ichał], Barczyński M[arcin].  
Wtórna nadczynność przytarczyc - leczenie operacyjne.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2018, nr 4, s. 36-42, bibliogr. 47 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 1.000**

**17.**

Romaniszyn M[ichał], Świrta J[arosław] Sz., Wałęga P[iotr].  
Proktologia. 84-letnia kobieta z nietypowym powikłaniem wypadania odbytnicy  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2018, nr 5, s. 63-65, dok. s. 88, bibliogr. 2 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca kazuistyczna  
**MEIN: 1.000**

**18.**

Romaniszyn M[ichał], Swirta J[arosław] S., Walega P[iotr] J..  
Long-term results of endoscopic pilonidal sinus treatment vs Limberg flap for treatment of difficult cases of complicated pilonidal disease : a prospective, nonrandomized study.  
Colorectal Disease  
2020 : Vol. 22, nr 3, s. 319-324, il., bibliogr. 21 poz., abstr.  
Autor korespondencyjny: Michał Romaniszyn.  
praca oryginalna  
**IF: 3.788**  
**MEIN: 100.000**

**19.**

Świrta Jarosław, Romaniszyn Michał, Barczyński Marcin.  
Rak tarczycy związany z zespołami genetycznymi.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2020, nr 6, s. 21-30, il., bibliogr.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 5.000**

**20.**

Świrta J[arosław] Sz[ymon], Romaniszyn M[ichał], Barczyński M[arcin].  
Nieinwazyjny nowotwór pęcherzykowy tarczycy o jądrach komórkowych przypominających raka brodawkowego.  
Medycyna Praktyczna. Chirurgia  
2021, nr 1, s. 57-61, bibliogr. 40 poz.  
Autor korespondencyjny: brak.  
praca poglądowa  
**MEIN: 5.000**

Opracowanie: Oddział Informacji Naukowej  
tel. +48 12 657 23 10  
e-mail: informacja.naukowa@cm-uj.krakow.pl

## Spis treści

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską.....	4
Pozostały dorobek naukowy związany z tematyką pracy doktorskiej.....	6
1. Wykaz stosowanych skrótów.....	11
2. Streszczenie w języku polskim.....	12
3. Streszczenie w języku angielskim.....	16
4. Wstęp.....	20
5. Założenia i cel pracy.....	21
6. Kopie opublikowanych prac .....	22
6.1. Risk factors of malignancy in patients with fine needle aspiration biopsy results interpreted as "suspicious for follicular neoplasm" .....	22
6.2. The impact of elective central lymph node dissection on postoperative pathological staging and surgical complication rate in patients with results of fine needle aspiration biopsy suspicious for follicular neoplasm of thyroid .....	29
6.3. Expression of micro-RNA in thyroid nodules and serum to discriminate follicular adenoma and cancer in patients with fine needle aspiration biopsy verified as “suspicious for follicular neoplasm” - preliminary study.....	38
7. Podsumowanie i wnioski .....	49
8. Piśmiennictwo .....	51
9. Opinia Komisji Bioetycznej .....	65
10. Oświadczenia współautorów publikacji .....	66

## 1. Wykaz stosowanych skrótów

**ATA** – Amerykańskie Towarzystwo Tyreologiczne (*American Thyroid Association*)

**NKW** – nerw krtaniowy wsteczny

**ChH** – choroba Hashimoto

**TBSRTC** – klasyfikacja cytologiczna biopowanych zmian ogniskowych tarczycy (*The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*)

**NKW** – nerw krtaniowy wsteczny;

**BACC** – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana;

**USG/US** – badanie ultrasonograficzne;

**ATA** – *American Thyroid Association* – Amerykańskie Towarzystwo Tyreologiczne

**FNAB** – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana (fine needle aspiration biopsy )

**SFN** - podejrzenie nowotworu pęcherzykowego (“suspicious for follicular neoplasm)

**NGS** - sekwencjonowanie nowej generacji (next generation sequencing)

**WDTC** – dobrze zróżnicowane raki tarczycy (well-differentiated thyroid cancers)

**TC** – rak tarczycy (thyroid cancer )

**NIFTP** - nieinwazyjny nowotwór pęcherzykowy z jądrowymi cechami brodawkowymi (*noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features* )

**FTC** – rak pęcherzykowy tarczycy (follicular thyroid cancer)

**PTC** – rak brodawkowaty tarczycy ( papillary thyroid cancer)

**FVPTC** – wariant pęcherzykowy raka brodawkowatego tarczycy (follicular variant of papillary thyroid cancer)

**MDS** - wielowymiarowe skalowanie (multidimensional scaling)

**qPCR** - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time polymerase chain reaction)

## 2. Streszczenie w języku polskim

### Wprowadzenie

Zmiany ogniskowe w tarczycy stwierdza się u około 65% badanych. W znakomitej większości są to zmiany łagodne. Według danych pochodzących z analiz przeprowadzonych na dużych grupach chorych odsetek nowotworów złośliwych waha się w przedziale 3%–15%. W ciągu ostatnich lat zapadalność na raka tarczycy dynamicznie wzrasta.

Istotną rolę w algorytmie diagnostycznym stanowi biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana (BACC). BACC charakteryzuje się dużą dokładnością i pozwala zakwalifikować zmianę ogniskową jako łagodną bądź złośliwą. W Polsce przyjęto klasyfikację cytologiczną biopciowanych zmian według systemu Bethesda (TBSRTC – *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*), który wyróżnia 6 kategorii, przypisując każdej określone ryzyko złośliwości.

W rozprawie doktorskiej poddano analizie chorych z kategorią IV wg klasyfikacji Bethesda – podejrzenie nowotworu pęcherzykowego (SFN). Charakteryzuje się ona ryzykiem raka tarczycy wahającym się w przedziale 8,2-19%. Dotychczas nie wprowadzono do praktyki klinicznej testu, który wykazywałby dostatecznie wysoką czułość lub pozwalałby wykluczyć zmianę złośliwą, dlatego większość chorych z takim wynikiem BACC wymaga leczenia operacyjnego i weryfikacji histopatologicznej.

Szansą na zwiększenie dokładności diagnostycznej okazały się badania molekularne. MiRNA należą do endogennych, jednoniciowych, niewielkich, wysoce konserwatywnych, niekodujących cząsteczek, o długości 18 - 25 rybonukleotydów. Odgrywa istotną rolę w wielu zarówno w prawidłowym funkcjonowaniu komórek jak i procesach patologicznych, jak: proliferacja, różnicowanie oraz apoptoza. miRNA zaburza ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym poprzez interakcję z mRNA. Są bardzo trwałe i ich struktura pozostaje niezmienną w tkankach po zamrożeniu oraz w formalinie. Ta właściwość pozwoliła podjąć próbę użycia miRNA w komercyjnych testach bazujących na diagnostyce molekularnej. Dotychczas opublikowano liczne prace, w których wykazano związek zaburzonej regulacji miRNA z nowotworami złośliwymi. Dotychczas opublikowano liczne prace, w których wykazano związek zaburzonej regulacji miRNA z nowotworami złośliwymi. W 2006 roku Weber i wsp. opublikowali pierwszą pracę na temat wykorzystania miRNA do różnicowania gruczolaka pęcherzykowego (FA) i raka pęcherzykowego tarczycy (FTC). Od tamtej pory w licznych pracach wykazano, że miRNA może być czułym biomarkerem raka tarczycy, zarówno w preparacie tkankowym, jak i w osoczu, przy czym większość publikacji dotyczy raka brodawkowatego.

## **Cel**

Cel badania był dwójaki: scharakteryzowanie miRNA w zmianach ogniskowych tarczycy zweryfikowanych w BACC jako SFN oraz znalezienie w osoczu panelu miRNA, który pozwoliłby różnicować gruczolaka pęcherzykowego i dobrze zróżnicowane raki tarczycy (WDTC) – raka brodawkowatego i pęcherzykowego.

## **Materiały i metody**

Do badania włączono 110 pacjentów operowanych w Oddziale Klinicznym Chirurgii Ogólnej z Onkologią Szpitala Miejskiego Specjalistycznego im. G. Narutowicza w Krakowie (na bazie którego działa III Katedra Chirurgii Ogólnej UJCM) w latach 2016–2020 z powodu podejrzenia nowotworu pęcherzykowego tarczycy. Kryteria włączenia stanowiły: potwierdzone cytologiczne rozpoznanie „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” lub „podejrzenie nowotworu z komórek Hürthle’a” u chorego dotychczas nieleczonego z tego powodu, wiek od 18 do 90 r.ż., świadoma zgoda chorego na udział w badaniu. Z badania wyłączono chorych z obecnością typowych cech nowotworu złośliwego, takich jak naciekanie okolicznych tkanek, podejrzenie przerzutów do węzłów chłonnych lub przerzutów odległych stwierdzonych w badaniu klinicznym lub w przedoperacyjnych badaniach obrazowych.

W pierwszej publikacji podjęto próbę wyodrębnienia czynników klinicznych lub ultrasonograficznych, które wiązałyby się z większym ryzykiem raka tarczycy. Grupy poddano analizie pod względem: wieku, płci, obecności choroby Hashimoto, średnicy guza, odsetka rozpoznań cytologicznych „podejrzenie z komórek Hürthle’a” oraz sumarycznej liczby klinicznych i ultrasonograficznych cech zwiększonego ryzyka złośliwości według rekomendacji Amerykańskiego Towarzystwa Tyreologicznego (ATA).

W drugiej pracy przeanalizowano wpływ elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi na pooperacyjny staging oraz wczesne powikłania pooperacyjne. Stopień zaawansowania choroby nowotworowej przedstawiono wg 8 edycji AJCC/ TNM z 2017 roku. Porównano odsetki wczesnych pooperacyjnych powikłań chirurgicznych w grupie badanej oraz w grupie chorych operowanych w tym samym okresie w tutejszej Klinice z powodu wola nienowotworowego. Ruchomość fałdów głosowych oceniał specjalista laryngologii w 2. dobie pooperacyjnej metodą wideolaryngoskopii. Odsetek uszkodzeń nerwów krtaniowych wstecznych (NKW) przedstawiono w przeliczeniu na nerwy narażone na ryzyko uszkodzenia, a nie na liczbę pacjentów. Za definicję hipokalcemii przyjęto obniżenie stężenia wapnia całkowitego w surowicy poniżej 2,0 mmol/l w okresie hospitalizacji. Opracowanie statystyczne wykonano w pakiecie oprogramowania Statistica 13 (StatSoft Inc). Do oceny normalności rozkładu zastosowano test zgodności Chi kwadrat. Jednoczynnikową analizę statystyczną materiału przeprowadzono przy pomocy testów Chi<sup>2</sup> Pearsona dla zmiennych

nominalnych oraz U Manna-Whitney'a i t-studenta dla zmiennych ilościowych. W ocenie istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

Trzecia publikacja przedstawia analizę molekularną, którą przeprowadzono u 10 chorych z wysoko zróżnicowanym rakiem tarczycy (WDTC) oraz 14 chorych z gruczolakiem pęcherzykowym (FA) tarczycy. Obie grupy porównano pod kątem struktury płci, wieku, obecności choroby Hashimoto, średnicy guza oraz ultrasonograficznych czynników ryzyka jako punktacji w skali EU-TIRADS. Fragmenty guza oraz niezmienioną makroskopowo tkankę tarczycy zostały pobrane przez doświadczonego patologa, które zabezpieczono w RNA Later, a następnie umieszczono w temperaturze 80 st. C do momentu ekstrakcji RNA. Krew pobrano w sali operacyjnej przed nacięciem skóry. Około 50-100mg tkanki guza poddano lizie przy użyciu preparatu TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) i pobrano RNA. Z 0,5ml osocza wyizolowano całkowite RNA według protokołu RNeasy. Tak zwane małe RNA (small RNA) zastosowano do przygotowania bibliotek NGS. W celu uzyskania RNA o wysokiej jakości usunięto z dalszej analizy odczyty zawierające poniżej 15 nukleotydów oraz nieposiadające adapterów. Po przygotowaniu bibliotek przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji w aparacie NextSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Uzyskane wyniki znormalizowano dostosowując je do rozmiarów bibliotek i przedstawiono jako liczbę odczytów na milion (CPM) wykorzystując oprogramowanie miRDeep2 software. Otrzymane odczyty miRNA zostały zachowane na lokalnym serwerze. Poddano ocenie jakość odczytów za pomocą oprogramowanie FastQC software. Tak opracowane znormalizowane wyniki – CPMs – zostały poddane skalowaniu wielowymiarowego. Do analizy statystycznej i eksploracyjnej miRNome zastosowano pakiet LIMMA. Osoczowe miRNA wyizolowano z próbek o jednakowej objętości. Do analizy różnicowej ekspresji miRNA zastosowano test t-studenta.

## Wyniki

W pierwszej publikacji, która objęła 110 osób operowanych w powodu podejrzenia nowotworu pęcherzykowego tarczycy, w grupie chorych ze zmianą złośliwą stwierdzono, w porównaniu z grupą z gruczolakiem pęcherzykowym, przewagę mężczyzn (16,6% vs. 13,1%,  $p=0,31$ ) większy odsetek biopsji zweryfikowanych jako *podejrzenie nowotworu z komórek Hurthle'a* (55,6% vs. 45,7%,  $p=0,075$ ), większy odsetek pacjentów z chorobą Hashimoto (33,3% vs. 31,5%,  $p=0,55$ ), większy odsetek klinicznych i ultrasonograficznych cech zwiększonego ryzyka złośliwości (1,4 vs. 1,29,  $p=0,71$ ), mniejszą średnicę guza (14,5 mm vs. 19,4 mm,  $p=0,15$ ) oraz fakt, że chorzy byli średnio o 2,3 roku młodsi (53,1 vs. 55,4 roku,  $p=0,42$ ). Wyniki te nie były istotne statystycznie.

W drugiej publikacji, w grupie 80 zoperowanych chorych, stwierdzono łącznie 129 węzłów chłonnych (średnio 1,6 węzła chłonnego na 1 chorego) w preparacie pooperacyjnym, wszystkie węzły zostały zweryfikowane jako wolne od komórek nowotworowych. U 26

chorych nie znaleziono węzłów chłonnych w preparacie. W grupie chorych z rakiem tarczycy wykazano nieistotnie większą średnią liczbę węzłów chłonnych (2,2 vs. 1,5,  $p=0,13$ ) oraz nieistotnie częściej stwierdzano węzły chłonne w preparacie (90% vs. 64%,  $p=0,1$ ). Analiza pooperacyjnych powikłań chirurgicznych nie wykazała istotnych różnic w częstości ich występowania pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną: niedowładu NKW (3,38% vs. 1,49%,  $p=0,08$ ), krwawienia do rany pooperacyjnej (1,25% vs. 0,44%,  $p=0,29$ ) oraz hipokalcemii (5% vs 5,4%,  $p=0,86$ ). Porównując częstość powikłań w zależności od zakresu zabiegu, wczesny pooperacyjny niedowład NKW oraz krwawienie do rany stwierdzono w grupie badanej jedynie u chorych poddanych całkowitemu wycięciu tarczycy.

W ostatniej pracy przedstawiono wyniki badań molekularnych - różnicową ekspresję miRNA pomiędzy próbkami FA i WDTC. Stwierdzono znamienne statystycznie nadekspresję miRNA - miR-146b-5p ( $p=0,031$ ) oraz miR-146b-3p ( $p=0,034$ ), natomiast poziom ekspresji miR-195-3p ( $p=0,032$ ) okazał się istotnie niższy w grupie chorych z WDTC w porównaniu z grupą chorych z FA. Wyniki zostały zwalidowane przy wykorzystaniu zewnętrznej kohorty pochodzącej z The Cancer Genom Atlas (TCGA). Porównaniu z sygnaturą z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego uzyskano pokrycie 90% próbek (18 z 20 miRNAs). Następnie potwierdzono obecność miRNA w osoczu. Zmienność ekspresji zbadano za pomocą metody qPCR. W badaniu stwierdzono wyższy poziom ekspresji hsa\_miR\_195\_u pacjentów z WDTC, co wskazuje na odwrotną zależność pomiędzy ekspresją tego miRNA w tkankach i osoczu w obu grupach (WDTC vs FA). Uzyskany rezultat był istotny statystycznie ( $p=0,039$ ).

## Wnioski

W analizie czynników ryzyka nie stwierdzono wiarygodnych cech klinicznych, które charakteryzowałyby się znamienne niskim ryzykiem raka w zmianach ogniskowych zweryfikowanych w BACC „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego”, dlatego w guzach o średnicy przekraczającej 2cm leczenie operacyjne pozostaje najlepszą metodą pozwalającą wykluczyć złośliwy charakter zmiany.

Poszerzenie zakresu o limfadenektomię przedziału VI szyi nie poprawia histopatologicznego stagingu, natomiast w doświadczonych ośrodkach w chirurgii tarczycy nie wiąże się z większym ryzykiem powikłań pooperacyjnych.

MiRNA jest obiecującym biomarkerem różnicującym gruczolaka pęcherzykowego i dobrze zróżnicowane raki tarczycy. Zmienność ekspresji cząsteczek miRNA - miR-146b-5p oraz miR-146b-3p oraz miR-195-3p może być wykorzystana do odróżnienia zmiany łagodnej i złośliwej, natomiast miR-195-3p stanowi osoczowy biomarker, potencjalnie umożliwiający wykluczenie raka tarczycy na etapie przedoperacyjnym.

### 3. Streszczenie w języku angielskim

#### Introduction

Thyroid nodules occur in 65% of population. Most of them are benign lesions. Recent large retrospective studies conducted at a high-volume centers revealed TC in 3%–15% of biopsies. Thyroid cancer (TC) accounts for more than 95% of endocrine cancers. Over the last three decades TC has become one of the most rapidly increasing cancer in the USA. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) comprises basic method in preoperative diagnostic work-up. FNAB is characterized by high level of accuracy and enables to preliminary assessment of the lesions as benign or malignant. The results are presented according to the Bethesda system which categorizes into six groups. In the doctoral the analysis of patients with FNAB result Bethesda tier IV - suspicious for follicular neoplasm (SFN) has been performed. The malignancy rate varies between 8,2 – 19%. To date, there are no diagnostic tools allowing to exclude malignancy and indeterminate cytopathology often requires diagnostic surgery for definitive.

There have been several studies appraising the potential of miRNAs as diagnostic markers for thyroid cancer. miRNAs are endogenous, single-stranded, tiny, highly conserved, noncoding molecules with lengths ranging from 18 to 25 nucleotides RNAs. miRNAs are encompassed in many biological and pathological processes as proliferation, differentiation and apoptosis. miRNAs alter gene expression at the post-transcriptional level of messenger RNAs (mRNAs). miRNAs are extremely stable and remain intact in tissues, whether fresh, frozen or formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) <sup>37</sup>. This property of miRNAs has been exploited for the development of several commercially available miRNA-based molecular tests. To date many papers revealed association between malignant neoplasm and altering miRNA expression. In 2006 Weber et al in their study showed miRNA as a potential molecule allowing to discriminate FA and FTC. To date there are many researches emphasising mi RNA as a valuable biomarker, mostly papillary thyroid cancer.

#### Objectives

The purpose of this study was twofold: to characterize the miRNAs signature of the tumors assessed as SFN and to define circulating miRNA pattern to distinguish follicular adenoma from follicular cancer in patients with thyroid nodules verified in FNAB as SFN



## Materials and Methods

In this study 110 consecutive patients were included. All patients were operated in Department of General Surgery of G. narutowicz Hospital, Third Chair of General Surgery, Jagiellonian University Medical College in Cracow, between 2016 and 2020. The indication for surgery was FNAB result “suspicious for follicular neoplasm”. Inclusion criteria were: the result of fine needle aspiration biopsy “suspicious for follicular/oxyphilic neoplasm”, absence of invasive neoplasm features as follows infiltration of surrounding tissue or lymph nodes/distant metastases, informed consent. Typical features of malignant process as suspicion on lymph nodes metastases or infiltration of adjacent tissues excluded from the study.

In first paper the aim was to define factors correlating with risk of malignancy. Six specific categories were defined and the clinical records for patients were collected: sex, age, presence of oxyphilic cells, diameter of the tumour, presence of Hashimoto disease, aggregate amount of clinical and ultrasonographic features of malignancy according to ATA

The second study assessed the impact of elective central lymph node dissection on postoperative pathological staging and early surgical complication rate. Staging of thyroid cancer was presented according to 8<sup>th</sup> edition TNM/AJCC 2017. Surgical early postoperative complications were reported and the rate was compared between the study group and the control group consisting of patients operated on in the same period for benign nodular goiter. The vocal cords mobility was assessed with video laryngoscope on the second postoperative day. Hypocalcemia was defined as calcium concentration in serum below 2,0 mmol/l. Statistical analysis of phenotype data was performed using Statistica 13.0 software. *P*-values <0.05 were considered statistically significant. To determine if a data set is wellmodeled by a normal distribution, the chi-square test of independence has been applied. To define statistical significance, the Mann–Whitney *U* test and t test were used, as appropriate.

The third paper shows the results of molecular analysis performed on 10 patients with WDTC and 14 patients with FA. Age, sex, presence of Hashimoto disease, diameter of the tumor, presence of FNAB suspicious for Hurthle cell neoplasm and US risk factors according to EU-TIRADS were compared between both groups. The specimens of tumor and macroscopically normal thyroid tissue were excised in the operating theatre by experienced pathologist. The specimens were placed immediately into RNAlater® and stored at –80°C until they were ready for RNA extraction. All blood samples were taken in the operating theatre, before a skin incision was done. Tumor’s RNA was extracted from 50–100 mg of disrupted tissue in TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany). RNA from 0.5ml plasma was extracted using total RNA protocol of RNeasy Small RNA was used to generate NGS library. For quality purpose we remove all reads with length below 15 nucleotides, and

without adapter. As a next step new generation sequencing has been performed on NextSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Results have been saved on the local server. Quality of reads has been assessed using FastQC software. The raw counts were normalized for library size and represented as counts per million (CPM) with miRDeep2 software.

For multidimensional scaling (MDS) miRNA read count normalized for library size have been used. Statistical and exploratory analysis of miRNOME data was performed in R, limma package. The same volume of plasma from each patients for miRNA isolation had been taken. For the analysis of miRNA expression t-test was applied as appropriate.

## Results

In the first paper, including 110 consecutive patients operated on because of SFN of thyroid, there were no significant differences between age (53,1 vs. 55,4 years,  $p=0,42$ ), gender (16,6% vs. 13,1%,  $p=0,31$ ), tumour diameter (14,5 mm vs. 19,4 mm,  $p=0,15$ ), aggregate amount of clinical and ultrasonographic factors (1,4 vs. 1,29,  $p=0,71$ ), presence of Hashimoto disease (33,3% vs. 31,5%,  $p=0,55$ ) and fine needle aspiration biopsy result *suspicious for Hurthle cell neoplasm* (55,6% vs. 45,7%,  $p=0,075$ ) in both groups.

The second study, performed on 80 patients, revealed 129 lymph nodes dissected (mean 1.6 lymph node per 1 patient), all lymph nodes were clear of cancer cells. In 26 patients there were no lymph nodes in postoperative preparation. In group of patients with WDTC lymph nodes were detected more often (90% vs 64%,  $p=0,1$ ) and mean amount of lymph nodes was greater (2,2 vs 1,5,  $p=0,13$ ) in postoperative specimen in compared with the group of patients with FA. No significant differences were identified in prevalence of early postoperative complications among the study group and the control group patients: unilateral recurrent laryngeal nerve (RLN) palsy 3.38% vs. 1.49%;  $p=0,08$ ), hypocalcemia (5% vs. 5.4%;  $p=0,86$ ), postoperative hemorrhage (1.25% vs. 0.44;  $p=0,29$ ). The analysis of complication frequency based on range of surgery revealed the postoperative hemorrhage and RLN palsy occurred in patients after total thyroidectomy.

The third study shows the results of molecular analysis – differential expression of miRNA between FA and WDTC. We found that the expression level of two miRNAs, miR-146b-5p ( $p=0,031$ ) and miR-146b-3p ( $p=0,034$ ) were significantly higher, whereas miR-195-3p ( $p=0,032$ ) occurred to be significantly lower in patients with WDTC than in patients with FA. The results have been validated using external TCGA data cohort. Overall Jagiellonian University Medical College signature of WDTC has 90% overlap (18 from 20 miRNAs) with the signature of TCGA. The presence of this miRNA in plasma have been confirmed. Altered expression of miRNAs was tested by qPCR. The study revealed higher expression level of circulating miR-195-3p in patients with WDTC in compared to patients with FA, in contrary to results of miRNA expression in tissues. The difference was statistically significant ( $P=0,039$ ).

## **Conclusion**

In patients with FNAB results classified as Bethesda tier IV there are no reliable clinical features associated with low risk of malignancy and surgery should be consider in every case of tumor size above 2 cm as most appropriate manner to exclude thyroid cancer.

Elective central lymph node dissection at experienced surgical hands does not improve postoperative pathological staging and is not associated with higher risk of early postoperative complications.

MiRNA may be useful in the diagnostic process of patients “suspicious for follicular neoplasm”. Differential expression of miRNAs 146a, 146b and 195 has a potential of discriminating between WDTC and FA. Additionally miR-195-3p could be isolated from serum and be applied as a valuable tool which excludes thyroid cancer in preoperative work-up.

## 4. Wstęp

Zmiany ogniskowe tarczycy stanowią powszechną patologię tego narządu i są najczęstszym powodem konsultacji endokrynologicznej. Według badań autopsyjnych u ponad 50% populacji stwierdza się przynajmniej 1 zmianę niemą klinicznie o średnicy przekraczającej 1cm, natomiast odsetek guzów wykrywanych podczas badania palpacyjnego waha się w przedziale 4–7%. Po ocenie zmiany w USG, następnym etapem w algorytmie diagnostycznym stanowi kwalifikacja do biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC). Wyniki BACC są przedstawiane według 6-stopniowej klasyfikacji Bethesda. W przypadku kategorii I-III ryzyko raka tarczycy jest niewielkie i przy nieobecności innych wskazań, prowadzi się leczenie zachowawcze. Kategoria V i VI wymaga leczenia operacyjnego. W przypadku kategorii IV – podejrzenie nowotworu pęcherzykowego – ryzyko raka jest pośrednie. Chorzy z takim rozpoznaniem mogą być leczeni zachowawczo przy niewielkim rozmiarze guza oraz nieobecności innych czynników ryzyka raka – klinicznych i ultrasonograficznych. Pewne rozpoznanie pozwala uzyskać jedynie wycięcie guza i ocenę histopatologiczną.

Duże możliwości w zakresie poprawy diagnostyki chorób nowotworowych, w tym raka tarczycy, są związane z wykorzystaniem miRNA. Przez blisko 2 dekady, od ukazania się pierwszej publikacji w 2005 roku, znaczenie miRNA w patologii gruczołu tarczowego było intensywnie badane. Wiele prac poddało ocenie możliwość wykorzystania miRNA jako biomarkera raka tarczycy. Szczegółowa analiza zmian ogniskowych tarczycy miała na celu ustanowienie ogólnych kryteriów złośliwości, jak i znalezienie specyficznych miRNA dla poszczególnych podtypów histologicznych. Co więcej, jedno z kluczowych zagadnień stanowi określenie panelu miRNA, który byłby w stanie różnicować gruczolaka i raka pęcherzykowego tarczycy w badaniu przedoperacyjnym. Część autorów przedstawiła klasyfikatory miRNA składające się z kilku cząsteczek miRNA, co znamienne zwiększa czułość i swoistość. Materiał wykorzystywany w klasyfikatorze pochodził z guza, np. uzyskany na drodze BACC. Przeglądając bazę pubmed nie znaleziono publikacji wykorzystujących osoczowe miRNA w przedoperacyjnej diagnostyce guzów - podejrzenie nowotworu pęcherzykowego (SFN).

## 5. Założenia i cel pracy

Założeniem przedstawionych w cyklu publikacji badań jest hipoteza, że istnieje biomarker umożliwiający różnicowanie nowotworów łagodnych od złośliwych w grupie chorych z przedoperacyjnym rozpoznaniem w BACC guza tarczycy - podejrzenie nowotworu pęcherzykowego (Bethesda IV), wobec braku wystarczająco trafnych cech kliniczno-ultrasonograficznych.

Wprowadzenie do praktyki klinicznej wiarygodnego biomarkera stwarzałoby możliwość uniknięcia niepotrzebnych tyroidektomii u pacjentów gruczolakami pęcherzykowym oraz zastosowania adekwatnego, bardziej rozległego zakresu zabiegu w sytuacji wysokiego prawdopodobieństwa raka pęcherzykowego tarczycy u chorych z wynikiem BACC „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego”.

Cele szczegółowe pracy to:

- identyfikacja czynników ryzyka wpływających na ryzyko raka w zmianach ogniskowych tarczycy ocenionych w BACC jako Bethesda IV (SFN) : wiek, płeć, średnicę guza, obecność choroby Hashimoto, podkategorię biopsyjną „podejrzenie nowotworu z komórek Hurthle’a” oraz sumę ultrasonograficznych i klinicznych czynników ryzyka;
- ocena wpływu elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi na pooperacyjny staging oraz wczesne powikłania pooperacyjne;
- znalezienie panelu miRNA w guzie oraz w osoczu, który umożliwiłby odróżnić z wysoki prawdopodobieństwem FA od WDTC przed podjęciem decyzji o leczeniu operacyjnym;
- możliwości zastosowania tkankowego oraz osoczowego miRNA do różnicowania gruczolaka pęcherzykowego i WDTC.

## 6. Kopie opublikowanych prac

© Aluna Publishing

Wiadomości Lekarskie, VOLUME LXXIII, ISSUE 7, JULY 2020

ORIGINAL ARTICLE

### CZYNNIKI RYZYKA ZŁOŚLIWOŚCI ZMIAN OGNISKOWYCH TARCZYCY ZWERYFIKOWANYCH W BIOPSIJ ASPIRACYJNEJ CIENKOIGŁOWEJ CELOWANEJ JAKO "PODEJRZENIE NOWOTWORU PĘCZERZYKOWEGO"

### RISK FACTORS OF MALIGNANCY IN PATIENTS WITH FINE NEEDLE ASPIRATION BIOPSY RESULTS INTERPRETED AS "SUSPICIOUS FOR FOLLICULAR NEOPLASM"

DOI: 10.36740/Wlek202007103

Jarosław Świrta<sup>1</sup>, Michał Romaniszyn<sup>2</sup>, Marcin Barczyński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>III KATEDRA CHIRURGII OGÓLNEJ, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET Jagielloński w Krakowie, Kraków, POLSKA

<sup>2</sup>ZAKŁAD DYDAKTYKI MEDYCZNEJ, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET Jagielloński w Krakowie, Kraków, POLSKA

#### STRESZCZENIE

**Wstęp:** Rozpoznanie cytologiczne „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” stawiane jest w około 10% biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC) zmian ogniskowych tarczycy. Kategoria obejmuje: gruczolaka pęcherzykowego, raka pęcherzykowego, wariant pęcherzykowy raka brodawkowatego oraz ich warianty oksyfilne. Do chwili obecnej nie wprowadzono do praktyki klinicznej narzędzia diagnostycznego, za pomocą którego można wykluczyć obecność nowotworu złośliwego i stąd też część chorych z podejrzeniem nowotworu pęcherzykowego tarczycy wymaga leczenia operacyjnego w celu postawienia ostatecznego rozpoznania.

**Cel pracy:** Wyodrębnienie czynników ryzyka raka tarczycy u chorych ze zmianami ogniskowymi lub guzami tarczycy zweryfikowanymi w BACC jako „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego”.

**Materiały i metody:** Do badania zakwalifikowano kolejnych 110 chorych operowanych od stycznia 2016 do marca 2020 z powodu podejrzenia nowotworu pęcherzykowego tarczycy. Kryteria włączenia stanowiły: wynik BACC – klasa IV według klasyfikacji Bethesda, brak ewidentnych cech złośliwości guza, takich jak: naciekanie okolicznych tkanek, podejrzenie przerzutów do węzłów chłonnych bądź przerzutów odległych stwierdzonych w badaniu klinicznym lub w przedoperacyjnych badaniach obrazowych.

**Wyniki:** U 18 chorych (16,3%) rozpoznano raka tarczycy. Najczęstszym podtypem okazał się rak brodawkowaty (66,6%). Spośród zmian łagodnych (92 chorych) dominował gruczolak pęcherzykowy (49%). Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy rakiem tarczycy a: płcią, średnicą guza, wiekiem, sumarycznym wynikiem klinicznych i ultrasonograficznych cech zwiększonego ryzyka złośliwości zmian ogniskowych, obecnością choroby Hashimoto oraz wynikiem BACC „podejrzenie nowotworu z komórek Hurthle’a”.

**Wnioski:** U chorych z wynikiem cytologicznym „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego tarczycy” uzyskanym w wyniku BACC nie występują kliniczne czynniki pozwalające na odstąpienie od leczenia operacyjnego z uwagi na statystycznie mniejsze ryzyko nowotworu złośliwego.

**SŁOWA KLUCZOWE:** rak tarczycy, podejrzenie nowotworu pęcherzykowego tarczycy, podejrzenie nowotworu z komórek Hurthle’a tarczycy, gruczolak pęcherzykowy tarczycy

#### ABSTRACT

**Introduction:** Approximately 10% of fine needle aspiration biopsy (FNAB) of thyroid nodules may be verified as “suspicious for follicular neoplasm”; this category involves follicular adenoma, follicular carcinoma, follicular variants of papillary carcinoma and subclass “suspicious for Hurthle cell neoplasm”. At present, there is no diagnostic tool to discriminate between follicular adenoma and cancer. Most patients are required surgery to exclude malignant process.

**The aim:** To define factors correlating with risk of malignancy in patients with FNAB of thyroid focal lesions and nodules verified as Bethesda tier IV.

**Materials and Methods:** In this study 110 consecutive patients were included. All patients were operated because of FNAB result “suspicious for follicular neoplasm” of thyroid gland at a single institution from January 2016 until March 2020. From this set, six specific categories were defined and the clinical records for patients were collected: sex, age, presence of oxyphilic cells, diameter of the tumour, presence of Hashimoto disease, aggregate amount of clinical and ultrasonographic features of malignancy according to AIA.

**Results:** In 18 patients (16,3%) thyroid cancer occurred. Most frequent subtype turned out to be papillary cancer (66,6%). In group of benign lesion (92 patients) predominance of follicular adenoma was disclosed – (49%). Age, gender, tumour diameter, aggregate amount of clinical and ultrasonographic factors, presence of Hashimoto disease and fine needle aspiration biopsy result suspicious for Hurthle cell neoplasm did not correspond to increased risk of malignancy.

**Conclusions:** In patients with FNAB results classified as Bethesda tier IV there are no reliable clinical features associated with low risk of malignancy and surgery should be consider in every case as most appropriate manner to exclude thyroid cancer.

**KEY WORDS:** follicular adenoma, thyroid cancer, suspicious for follicular neoplasm, suspicious for Hurthle cell neoplasm

Wiad Lek. 2020;73(7):1323-1329

**SKRÓTY**

ATA – Amerykańskie Towarzystwo Tyreologiczne (*American Thyroid Association*)

NKW – nerw krtaniowy wsteczny

RT – rak tarczycy

RBT – rak brodawkowaty tarczycy, wariant klasyczny

RPT – rak pęcherzykowy tarczycy;

WPRBT – wariant pęcherzykowy raka brodawkowego tarczycy

ChH – choroba Hashimoto

BACC – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana

USG – badanie ultrasonograficzne

TBSRTC – klasyfikacja cytologiczna biopsjowanych zmian ogniskowych tarczycy (*The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*)

**WSTĘP**

Guzki tarczycy stanowią powszechną patologię tego narządu i są najczęstszym powodem konsultacji endokrynologicznej. Według badań autopsyjnych u ponad 50% populacji stwierdza się przynajmniej 1 zmianę niemą klinicznie o średnicy przekraczającej 1cm, natomiast odsetek guzów wykrywanych podczas badania palpacyjnego waha się w przedziale 4–7% [1, 2]. Czulość badania ultrasonograficznego (USG) przewyższa badanie kliniczne i pozwala rozpoznać zmiany ogniskowe nawet u 67% populacji [3]. Kolejne miejsce w algorytmie diagnostycznym zajmuje biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana (BACC). BACC charakteryzuje się dużą dokładnością i pozwala zakwalifikować zmianę ogniskową jako łagodną bądź złośliwą z ryzykiem złośliwości odpowiednio <5% oraz >96%[4]. W Polsce przyjęto klasyfikację cytologiczną biopsjowanych zmian według systemu Bethesda (TBSRTC – *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*), który wyróżnia 6 kategorii, przypisując każdej określone ryzyko złośliwości (Tab. 1) [5].

Odsetek wyników BACC, których rezultat nie pozwala na wybór optymalnej ścieżki postępowania ze względu na zbyt niską czulość, zawiera się w przedziale 0,4–40,7% (średnio 20%) [6-8]. Doskonały przykład takiej biopsji zwanej „nieokreśloną” stanowi kategoria IV – podejrzenie nowotworu pęcherzykowego tarczycy odpowiadając za 1,2–25,3% BACC, średnio 10%. Kategoria zawiera następujące rozpoznania histopatologiczne – gruczolak pęcherzykowy, rak pęcherzykowy oraz wariant pęcherzykowy raka brodawkowego wraz z ich wariantami oksyfilnymi, lecz w około 25% mylący obraz może wystąpić w przypadku guzków hiperplastycznych oraz przewlekłego limfocytowego zapalenia tarczycy [9, 10]. Większość guzów stanowią zmiany łagodne, choć w niektórych przypadkach ryzyko złośliwości sięga nawet 40% [11]. Brak precyzyjnej terminologii odzwierciedla ograniczenia BACC tarczycy w sytuacji, gdy rozpoznanie nowotworu złośliwego wymaga uwidocznienia naciekania torebki lub angioinwazji [11, 12]. Obraz cytologiczny kategorii „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” charakteryzuje bogato komórkowy aspirat zawierający jednolitą populację komórek pęcherzykowych,

minimalną ilość lub brak koloidu, układy przestrzenne o charakterze rozetek, a poszczególne komórki zawierają wydętne, zachodzące na siebie jądra, sporadycznie z obecnością atypii.

Diagnostyka nowotworów pęcherzykowych stanowi „szarą strefę” cytologii tarczycy. Trafność biopsji cienkoigłowej w rozpoznawaniu nowotworu złośliwego jest wysoka i zawiera się w przedziale 90–100%, natomiast w przypadku zmian pęcherzykowych średnio jedynie 20% z nich okazuje się zmianami złośliwymi w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym [13, 14].

**CEL PRACY**

Celem pracy była wyodrębnienie czynników ryzyka raka tarczycy u chorych ze zmianami ogniskowymi lub guzami tarczycy zweryfikowanymi w BACC jako „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego”. Identyfikacja klinicznych cech związanych z wyższym prawdopodobieństwem złośliwości w tej grupie pozwoliłaby wyodrębnić chorych, dla których obserwacja byłaby odpowiednim postępowaniem. Postępowanie zachowawcze w uzasadnionych przypadkach umożliwiłoby zmniejszenie chorobowości oraz ogólnych kosztów leczenia. Brak takich czynników może stanowić impuls do poszukiwania innych metod diagnostycznych, np.: biomarkerów w tkance guza bądź w osoczu, które podniosą zwiększyć prawdopodobieństwo klinicznie istotnego rezultatu.

**MATERIAŁ I METODY**

Do badania zakwalifikowano 110 kolejnych pacjentów operowanych w III Klinice Chirurgii Ogólnej UJCM w Krakowie na przełomie stycznia 2016 i marca 2020 z powodu wyniku BACC zweryfikowanej jako klasa IV według Bethesda (TBSRTC). Dane kliniczne zostały zebrane prospektywnie. Charakterystykę grupy pod względem cech demograficznych oraz klinicznych umieszczono w tabeli 2. Kryteria włączenia stanowiły: potwierdzone cytologiczne rozpoznanie „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” lub „podejrzenie nowotworu z komórek Hürthle’a ” u chorego dotychczas nieleczzonego z tego powodu, wiek od 18 do 90 r.ż., świadoma zgoda chorego na udział w badaniu. Kryterium wyłączenia stanowiła obecność cech nowotworu złośliwego, takich jak naciekanie okolicznych tkanek, podejrzenie przerzutów do węzłów chłonnych lub przerzutów odległych w badaniu klinicznym lub w przedoperacyjnych badaniach obrazowych.

Ocena zmienności badanych cech została przedstawiona poprzez średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe (SD), 95% przedział ufności (95% CI) oraz odsetek częstości występowania (%). Opracowanie statystyczne wykonano w programie Statistica 13. Jednoczynnikową analizę statystyczną materiału przeprowadzono przy pomocy testów Chi<sup>2</sup> Pearsona oraz U Manna-Whitney’a. W ocenie istotności statystycznej przyjęto wartość p<0,05. Opracowano ryzyko względne raka tarczycy dla poszczególnych parametrów.

Tabela 1. Kategorie rozpoznania w badaniu cytologicznym tarczycy w klasyfikacji Bethesda.

Kategoria rozpoznania	Ryzyko raka tarczycy
I – biopsja niediagnostyczna lub niesatysfakcjonująca	5–10% <sup>a,c</sup>
II – zmiana łagodna	<1% <sup>a</sup> (0–3%) <sup>c</sup>
III – zmiana pęcherzykowa bliżej nieokreślona (FLUS) lub atypia o nieokreślonym znaczeniu (AUS)	2,4–5,2% <sup>a</sup> (6–18%) <sup>f</sup>
IV – nowotwór pęcherzykowy lub podejrzenie nowotworu pęcherzykowego <sup>a</sup>	8,2–19% <sup>a</sup> (10–40%) <sup>f</sup>
V – podejrzenie złośliwości	75% <sup>a</sup> (45–60%) <sup>f</sup>
VI – nowotwór złośliwy	≥95–100% <sup>a</sup> (94–96%) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> na podstawie Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology 2017

<sup>b</sup> ryzyko raka przyjmowane w populacji polskiej, na podstawie: Diagnostyka i leczenie raka tarczycy – rekomendacje polskie. Endokrynol. Pol., 2018; 69: 34–74

<sup>c</sup> ryzyko raka z pominięciem przypadków pooperacyjnych rozpoznania nieinwazyjnego nowotworu pęcherzykowego tarczycy o jądrach komórkowych przypominających raka brodawkowatego (uznawanego obecnie za nowotwór niezłośliwy) – na podstawie: Cibas E.S., Ali S.Z.: The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. Thyroid 2017; 27: 1341–1346

<sup>d</sup> W rozpoznaniu „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” mieści się także „podejrzenie nowotworu z komórek Hürthle’a” (dawniej „oksyfilnego”), które jest obciążone większym (15–25%) ryzykiem złośliwości i częściej stanowi jednoznaczne wskazanie do leczenia operacyjnego.

BAC – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa

## WYNIKI

W badaniu pooperacyjnym u 18 chorych rozpoznano raka tarczycy, najczęstszy podtyp stanowił RBT (66,6%), w połowie przypadków stwierdzono WPRBT (6/12). Spośród zmian łagodnych dominował gruczolak pęcherzykowy (49%). Raport histopatologiczny przedstawiono w tabeli 3. Pacjentów podzielono na 2 grupy: ze zmianą łagodną (grupa 1) oraz z nowotworem złośliwym (grupa 2). Grupy poddano analizie pod względem: wieku, płci, obecności choroby Hashimoto, średnicy guza, odsetka rozpoznania cytologicznego „podejrzenie z komórek Hürthle’a” oraz sumarycznej liczby klinicznych i ultrasonograficznych cech zwiększonego ryzyka złośliwości według rekomendacji Polskiej Grupy Nowotworów Endokrynnych [15]. W grupie chorych ze zmianą złośliwą stwierdzono przewagę mężczyzn (16,6% vs. 13,1%,  $p=0,31$ ), większy odsetek biopsji zweryfikowanych jako *podejrzenie nowotworu z komórek Hürthle’a* (55,6% vs. 45,7%,  $p=0,075$ ), większy odsetek pacjentów z chorobą Hashimoto (33,3% vs. 31,5%,  $p=0,55$ ), większy odsetek klinicznych i ultrasonograficznych cech zwiększonego ryzyka złośliwości (1,4 vs. 1,29,  $p=0,71$ ), mniejszą średnicę guza (14,5 mm vs. 19,4 mm,  $p=0,15$ ) oraz chorzy byli średnio o 2,3 roku młodsi (53,1 vs. 55,4 roku,  $p=0,42$ ), lecz wyniki te nie były istotne statystycznie (Tab. 4). Ryzyko względne złośliwości związane z poszczególnymi cechami przedstawiono w tabeli 5.

## DYSKUSJA

Pomimo postępu diagnostyce, większej czułości badań obrazowych oraz możliwości wykorzystania technik immunohistochemicznych, w codziennej praktyce klinicznej wykluczenie nowotworu złośliwego w guzach pęcherzykowych na podstawie BACC jest niemożliwe. Rak tarczycy występuje średnio 3–4 razy częściej u kobiet, natomiast bardziej agresywny przebieg i większą śmiertelność

stwierdza się u mężczyzn. Postuluje się wpływ hormonów płciowych na patogenezę raka tarczycy, lecz dokładny mechanizm molekularny nie został poznany i na dzień dzisiejszy brakuje dowodów naukowych potwierdzających tę teorię. W kilku doniesieniach wskazano płeć męską jako czynnik ryzyka nowotworu złośliwego w przypadku chorych z nieokreśloną biopsją. Co więcej, wielośrodkowa analiza 21746 chorych operowanych w Europie i Stanach Zjednoczonych wykazała, że płeć męska wiąże się z istotnie wyższym ryzykiem złośliwości w każdej kategorii według systemu Bethesda (od I do VI) [16]. W analizowanej materiale dominowały kobiety w obu grupach, jednak odsetek mężczyzn w grupie z rozpoznaniem był większy [17–19].

Przewlekłe limfocytowe zapalenie tarczycy jest to choroba o podłożu autoimmunologicznym opisaną ponad 100 lat temu [20]. Na świecie ChH stwierdza się u około 1 na 1000 osób, najczęściej u kobiet w 4–6 dekadzie. [21]. Związek pomiędzy chorobą Hashimoto a nowotworem złośliwym tarczycy po raz pierwszy zaobserwowano w 1955 roku [22]. Częstsze występowanie RT u chorych z ChH zostało potwierdzone w licznych publikacjach [23–25], chociaż niektórzy autorzy nie wykazują takiej zależności [26]. W 2017 roku ukazały się 2 metaanalizy, które potwierdziły zwiększone ryzyko RBT u chorych z ChH. Na szczególną uwagę zasługuje praca Resende de Paiva i wsp. uwzględniająca wszystkie podtypy RT. Na podstawie 64,628 przypadków wykazali dodatnią korelację pomiędzy ChH a RBT, natomiast nie stwierdzono takiej zależności w przypadkach pozostałych podtypów RT [27, 28]. Spośród potencjalnych mechanizmów wymienia się uszkodzenia DNA w wyniku nadmiernego wytwarzania rodników tlenowych, jednak dokładny przebieg transformacji nowotworowej pozostaje nieznanym [29]. Brakuje doniesień analizujących wpływ choroby Hashimoto na ryzyko raka wśród chorych z rozpoznaniem cytologicznym *podejrzenie nowotworu pęcherzykowego*.



Tabela 2. Charakterystyka grupy badanej

	Wartość średnia [min – max]	Odchylenie standardowe [SD]	Liczba chorych [n,%]
Wiek [lata]	55,1 [19-88]	18,14	
Rozmiar guza [mm]	18,7 [3-80]	15,85	
Czynniki ryzyka złośliwości	1,32 [0-4]	0,82	
Choroba Hashimoto			35 (31,8%)
Rozpoznanie cytologiczne – podejrzenie nowotworu pęcherzykowego/ podejrzenie nowotworu z komórek oksyfilnych			58/52 (52,7%)
Płeć (M/WK)			15/95 (13,6%)

Czynniki ryzyka złośliwości [15]:

- kliniczne

- a) przerzuty do węzłów chłonnych lub przerzuty odległe;
- b) ekspozycja szyi na promieniowanie jonizujące w wywiadzie;
- c) szybki wzrost guzka;
- d) guzek twardy, zrosnięty z otoczeniem;
- e) średnica guzka > 4 cm;
- f) pojawienie się guzka tarczycy przed 20. rokiem życia lub po 60. roku życia;
- g) porażenie nerwów krtaniowych, szczególnie jednostronne.

- ultrasonograficzne

- a) cechy wskazujące na możliwość przerzutu raka tarczycy do węzłów chłonnych szyjnych;
- b) cechy naciekania torebki tarczycy wraz z naciekaniem okolicznych narządów lub bez;
- c) obecność mikrozwapnień w zmianie ogniskowej tarczycy;
- d) charakter lity i hipoechogeniczność zmiany ogniskowej;
- e) kształt zmiany ogniskowej („wysokość > szerokość”);
- f) nieregularne granice zmiany;
- g) cechy wzmożonego, chaotycznego przepływu naczyniowego centralnie w zmianie.

Zależność ta wydaje się być wartą zbadania ze względu na obecność komórek oksyfilnych w przebiegu ChH, co może prowadzić do błędnej diagnozy cytologicznej i pochopnej kwalifikacji do leczenia operacyjnego. W badanym materiale we wszystkich przypadkach współistnienia choroby Hashimoto i raka tarczycy (6/18) rozpoznano podtyp brodawkowaty, w 3 przypadkach WPRBT. Przewaga chorych z ChH w grupie chorych z rakiem tarczycy nie była istotna statystycznie.

Pojawienie się zmiany ogniskowej w tarczycy przed 20 rż oraz po 60 rż wiąże się z jej większym ryzykiem złośliwości [30]. W przypadku dzieci i młodych dorosłych nabłonek tarczycy wykazuje wyższy stopień proliferacji i zwiększoną podatność na czynniki zewnętrzne, np: promieniowanie oraz częstsze występowanie niektórych mutacji prowadzących do raka tarczycy, jak rearanżacja RET/PTC [31]. Niedoczynności tarczycy oraz osłabiona funkcja układu odpornościowego są najprawdopodobniej odpowiedzialne za większą częstość raka tarczycy w grupie osób po 60 rż [32]. W naszym materiale średni wiek chorych w grupie 1 wyniósł 55,4 roku, natomiast w grupie 2 – 53,1 roku. Różnica nie była istotna statystycznie ( $p=0,58$ ).

Rozmiar guza ma istotny wpływ na ryzyko rozsiewu, nawrotu choroby oraz rokowanie. Według polskich zaleceń guz o średnicy >4 cm stanowi wskazanie do zabiegu operacyjnego w przypadku biopsji nieokreślonej. W analizowanym materiale w 1 przypadku guz o średnicy >4 cm okazał się mieć złośliwy charakter. Ponadto, w grupie chorych ze

zmianami łagodnymi średni rozmiar guza okazał się być większy o 4,9 mm (19,4 mm vs. 14,5 mm), lecz wynik nie jest statystycznie istotny ( $p=0,15$ ) [15, 33].

Wytyczne ATA oraz rekomendacje Polskiej Grupy Nowotworów Endokrynnych wyróżniają kliniczne i ultrasonograficzne cechy zwiększonego ryzyka złośliwości zmian ogniskowych tarczycy [15]. Każdej cesze przypisano 1 punkt, po czym zsumowano je i porównano średnią wartość punktową dla obu grup. Średnio więcej cech zwiększonego ryzyka złośliwości stwierdzono w grupie 2 (1,4 vs. 1,29), przy czym nie uzyskano istotności statystycznej ( $p=0,65$ ).

Obecność komórek oksyfilnych w biopsjach zmian ogniskowych tarczycy stanowi powszechnie uznany czynnik ryzyka nowotworu złośliwego [15,35]. W przypadku populacji polskiej co najmniej 15% takich guzów okazuje się być RT, natomiast w populacji ogólnej odsetek ten sięga nawet 40%. Chorzy z takim rozpoznaniem cytologicznym powinni być kwalifikowani do leczenia operacyjnego. U chorych z wynikiem BACC *podejrzenie nowotworu z komórek Hurthle’a* stwierdzono częstsze występowanie raka tarczycy, lecz nie wykazano istotności statystycznej (55,6% vs 45,7%,  $p=0,075$ ).

Z uwagi na brak możliwości przedoperacyjnego odróżnienia raka od gruczolaka pęcherzykowego tarczycy wielu autorów poszukiwało klinicznych cech związanych z wyższym ryzykiem złośliwości w tej grupie chorych. Niektóre doniesienia sugerują stratyfikację nowotworów pęcherzykowych na zmiany wysokiego ryzyka, które na-

Tabela 3. Wynik badania histopatologicznego.

	Grupa 1 N=92	Grupa 2 N=18
Wynik badania histopatologicznego	Gruzołak pęcherzykowy = 45	Rak brodawkowaty, wariant klasyczny = 6, wariant pęcherzykowy = 6
	Wole guzkowe = 36	Rak pęcherzykowy = 5
	Przewlekłe zapalenie = 11	Rak niskozróżnicowany = 1

Tabela 4. Czynniki ryzyka raka tarczycy

	Grupa 1	Grupa 2	p
Płeć (M/K)	12/80	3/15	0,31
Sredni wiek [lata]	55,4 (±19,1)	53,1 (±17,6)	0,58
Srednia liczba czynników ryzyka złośliwości klinicznych i USG	1,29 (± 0,91)	1,4 (± 1,03)	0,65
Choroba Hashimoto [n (%)]	29/92 (31,5)	6/18 (33,3)	0,55
Rozpoznanie cytologiczne – pęcherzykowy/ Onkocyтары [n,%]	50/42 (54,3)	8/10 (44,4)	0,075
Srednica guza [mm]	19,4 (±11,2)	14,5 (± 9,7)	0,15
Razem	N= 92	N= 18	

Tabela 5. Ryzyko względne raka tarczycy.

Cecha	Liczba chorych	Ryzyko złośliwości (n = 18)	
		Przedział ufności (95% CI)	P
Płeć			
Męczyzna	15	0,9 (0,85 – 1,71)	0,31
Kobieta	95	1,00	
Wiek			
Ponad 55 lat	51	0,76 (0,64 – 1,59)	0,61
Poniżej 55 lat	69	1,00	
Choroba Hashimoto			
Tak	35	0,94 (0,91 – 1,18)	0,55
Nie	75	1,00	
Srednica guza			
Ponad 4 cm	12	1,34 (0,83 – 1,67)	0,47
Poniżej 4cm	98	1,00	
Podjęzrenie npl z komórek Hürthle'a			
Tak	52	1,05 (0,89 – 1,21)	0,075
Nie	58	1,00	
Suma klinicznych i ultrasonograficznych cech ryzyka złośliwości 1 lub więcej	87	1,46 (0,89 – 1,74)	0,23
0	23	1,00	

leży poddać operacji oraz niskiego ryzyka złośliwości, dla których obserwacja będzie właściwym postępowaniem [15]. Istotne znaczenie ma średnica zmiany. RT występuje częściej w guzach pęcherzykowych przekraczających >3–4 cm w największym wymiarze. Baloch i wsp., oprócz średnicy, do czynników ryzyka, zaliczyli płeć męską oraz wiek >40 lat, z kolei Davis i wsp., dodatkowo wykazali wpływ radioterapii okolicy głowy i szyi na występowanie RP [13,34].

Srednica guza odgrywa istotną rolę również w przypadku podejrzenia nowotworu z komórek Hurthle'a. Według

pracy Bronner i LiVolsi zmiany przekraczające 4 cm w 80% mają charakter złośliwy [35].

W celu stratyfikacji ryzyka RT można wykorzystać badania obrazowe. Wytyczne ATA z 2015 roku podkreślają wysoką wartość USG tarczycy w ocenie zmian o nieokreślonym potencjale złośliwości [36]. W zależności od doniesień do cech zwiększających ryzyko złośliwości zalicza się: mikrozwapnienia, kształt zmiany "wyższy niż szerszy", nieregularny brzeg, lity charakter, brak halo oraz hypoehogeniczność [37]. Na podstawie metaanalizy 9 badań obserwacyjnych Remonti i wsp wykazali, że nie ma pojedynczej cechy w USG,

która w przypadku nieokreślonej biopsji charakteryzowała się akceptowalną dokładnością [38].

Liczne doniesienia wskazują na potrzebę wprowadzenia kryteriów ultrasonograficznych u chorych z nieokreśloną BACC, które pozwoliłyby na stratyfikację w obrębie tej grupy [39, 40]. Amerykańskie Towarzystwo Radiologów zaproponowało system punktowy oparty na 5 cechach. Zmiany ogniskowe zostają zaklasyfikowane do odpowiedniej kategorii na podstawie liczby punktów otrzymywanych za określone cechy: TR2 (2 pkt); TR3 (3 pkt); TR4 (4–6 pkt, TR4a – 4 pkt, TR4b – 5 pkt, TR 4c – 6 pkt) i TR5 (≥7 pkt) [41, 42]. Oba modele zostały porównane w pracach Middletona i wsp. oraz Barbosa i wsp. Autorzy konkludują, że zmiany ogniskowe zwerifikowane jako podejrzenie nowotworu pęcherzykowego z wysokim ryzykiem złośliwości na podstawie kryteriów ATA 2015 lub wynikiem 4b/4c/5 według ACR TI-RADS wiążą się z gorszym rokowaniem i stanowią wskazanie do leczenia operacyjnego. W przypadku mniejszego ryzyka złośliwości można rozważyć badania molekularne (jednak metody te są drogie i w Polsce nier refundowane) [41, 42].

Postępy w dziedzinie biologii molekularnej zostały wykorzystane w diagnostyce nowotworów pęcherzykowych tarczycy. Badania molekularne pozwalają na rozróżnienie łagodnych i złośliwych guzów, zwłaszcza w sytuacji niejednoznaczności wyniku badania cytologicznego (według klasyfikacji Bethesda kategoria III–V) poprzez wykrywanie mutacji typowych dla RT [43, 44]. Wyróżnia się 2 ścieżki diagnostyczne, które wynikają z charakterystyki stosowanych testów. W przypadku niewielkiego ryzyka raka stosuje się testy wykluczające. Zalicza się do nich *Afirma Gene Expression Classifier* (GEC), który dostarcza firma Veracyte. Najnowsza wersja testu charakteryzuje się czułością 91,1% oraz specyficznością 68,3% [44]. Jeżeli ryzyko raka jest wysokie, należy wykonać test potwierdzający, np. ThyroSeq V3 Genomic Classifier, który charakteryzuje się czułością 94%, specyficznością 82%, wartością predykcyjną ujemną 97% i wartością predykcyjną dodatnią 66%. Zastosowanie testu ThySeq V3 pozwala uniknąć diagnostycznego zabiegu operacyjnego u ponad 60% [45].

Doniesienia z ostatnich lat pokazują, że diagnostyka zmian pęcherzykowych tarczycy jest tematem otwartym. Pomimo postępu w dziedzinie badań obrazowych, biologii molekularnej oraz immunohistochemii, znaczny odsetek chorych wymaga zabiegu operacyjnego w celu wykluczenia nowotworu złośliwego. Wobec inwazyjności, potencjalnych powikłań oraz wysokich kosztów diagnostyczny zabieg operacyjny nie jest optymalnym rozwiązaniem, jednak na dzień dzisiejszy pozostaje postępowaniem z wyboru. Wymienione niedogodności mogłyby zostać wyeliminowane dzięki badaniom molekularnym. Koszty, jakie trzeba ponieść są niższe, niż w przypadku zabiegu operacyjnego, natomiast mniej opłacalne jest wykonywanie ich u każdego chorego z rozpoznaniem cytologicznym Bethesda IV. Kluczowym wydaje się wyselekcjonowanie cech klinicznych i ultrasonograficznych, w przypadku których testy molekularne będą miały najwyższą wartość diagnostyczną i opłacalność.

W badaniu Autorów nie wyselekcjonowano czynników ryzyka, które wiązałyby się z niskim ryzykiem nowotworu złośliwego u chorych z wynikiem BACC *podejrzenie nowotworu pęcherzykowego*. Z jednej strony ograniczenie badania stanowi niewielka liczebność analizowanej grupy. Z drugiej strony należy podkreślić trudności w pozyskaniu materiału związane z charakterem zmian. Szerokie spektrum rozpoznaw histopatologicznych odpowiadających kategorii IV według klasyfikacji Bethesda czyni tę grupę niejednorodną, co utrudnia wyszukanie czynników ryzyka różnicujących np.: raka i gruczolaka pęcherzykowego. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań uwzględniających większe grupy chorych, zwłaszcza do czasu powszechnego wprowadzenia badań molekularnych lub innych testów o wysokiej trafności diagnostycznej

## PIŚMIENNICTWO

- Mortensen JD, Woolner LB, Bennett WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab*. 1955;15(10):1270–80.
- Singer PA. Evaluation and management of the solitary thyroid nodule. *Otolaryngol Clin North Am*. 1996;29(4):577–91.
- Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med*. 1994;154(16):1838–40.
- Cases JA, Surks MI. The changing role of scintigraphy in the evaluation of thyroid nodules. *Semin Nucl Med*. 2000;30(2):81–7.
- Borgett I, Vielh P, Lebouilleux S, et al. Assessment of the cost of fine-needle aspiration cytology as a diagnostic tool in patients with thyroid nodules. *Am J Clin Pathol* 2008;129:763–771.
- Mahony GT, Mahony BS. Low nondiagnostic rate for fineneedle capillary sampling biopsy of thyroid nodules: a singular experience. *J Ultrasound Med* 2013;32:2155–2161.
- Choi YS, Hong SW, Kwak JY, et al. Clinical and ultrasonographic findings affecting nondiagnostic results upon the second fine needle aspiration for thyroid nodules. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2304–2309.
- Ali SZ, Cibas ES. Editors. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 2nd edition. New York: Wiley, 2017.
- Cross P, Chandra A, Giles T, et al. Guidance on the reporting of thyroid cytology specimens. 2nd edition. London, United Kingdom: Royal College of Pathologists, 2016.
- Lloyd RV, Osamura RV, Kloppel G, et al editors. World health organization classification of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC, 2017:65–142.
- Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": A gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41–44.
- Tuttle RM, Lemar H, Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid* 1998;8:377–383.
- Baloch ZW, Hendreen S, Gupta PK, et al. Interinstitutional review of thyroid fine-needle aspirations: Impact on clinical management of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 2001;25:231–234.
- Belfiore A, La Rosa GL. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:361–400.
- Jarząb B, Dedećjus M., Słowińska-Klencka D, et al. Guidelines of Polish National Societies Diagnostics and Treatment of Thyroid Carcinoma 2018 Update. *Endokrynol Pol* 2018; 69 (1): 34–74.

16. Inabnet WB 3rd, Palazzo F, Sosa JA, et al. Correlating the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology with Histology and Extent of Surgery: A Review of 21,746 Patients from Four Endocrine Surgery Registries Across Two Continents. *World J Surg.* 2020;44(2):426–435.
17. Kilfoy BA, Devesa SS, Ward MH, et al. Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009;18:1092–1100.
18. Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988–2005. *Cancer.* 2009;115:3801–3807.
19. Piccardo A, Puntoni M, Treglia G, et al. Thyroid nodules with indeterminate cytology: prospective comparison between 18F-FDG-PET/CT, multiparametric neck ultrasonography, 99mTc-MIBI scintigraphy and histology. *Eur J Endocrinol.* 2016;174:693–703.
20. Hashimoto H. Zur Kenntniss der lymphomatösen Veränderung der schilddrüse strumal lymphomatosa. *Arch Klin Chirurgie.* 1912; 97: 218–48 (translated in Levit T. The thyroid: a physiological, clinical and surgical study. London: E. & S. Livingston, 1954 p. 547–61).
21. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in United States, 1973–2002. *JAMA.* 2006;295:2164–2167.
22. Dailey ME, Lindsay S, Skahen R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. *AMA Arch Surg.* 1955;2:291–7.
23. Konturek A, Barczyński M, Wierzbowski W, et al. Coexistence of papillary thyroid cancer with Hashimoto thyroiditis. *Langenbecks Arch Surg.* 2013;3:389–94.
24. Liu X, Zhu L, Cui D, et al. Coexistence of histologically confirmed Hashimoto's thyroiditis with different stages of papillary thyroid carcinoma in a consecutive Chinese cohort. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:769294.
25. Papanicolaou R, Imams S, Todorova-Koteva K, et al. Hashimoto's thyroiditis pathology and risk for thyroid cancer. *Thyroid.* 2014;7:1107–14.
26. Jankovic B, Le KT, Hershman JM. Clinical Review: Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma: is there a correlation?. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):474–482.
27. Resende de Paiva C, Grønhoj C, Feldt-Rasmussen U, von Buchwald C. Association between Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer in 64,628 Patients. *Front Oncol.* 2017;7:53.
28. Lai X, Xia Y, Zhang B, et al. A meta-analysis of Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma risk. *Oncotarget.* 2017;8(37):62414–62424.
29. Kim ES, Lim DJ, Baik KH, et al. Thyroglobulin antibody is associated with increased cancer risk in thyroid nodules. *Thyroid.* 2010;8:885–91.
30. Rago T, Fiore E, Scutari M, et al. Male sex, single nodularity, and young age are associated with the risk of finding a papillary thyroid cancer on fine-needle aspiration cytology in a large series of patients with nodular thyroid disease. *Eur J Endocrinol.* 2010;162:763–770.
31. Jarzab B, Handkiewicz-Junak D, Wloch J. Juvenile differentiated thyroid carcinoma and the role of radioiodine in its treatment: A qualitative review. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12:773–803.
32. Haymart MR, Repplinger DJ, Levenson GE. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with greater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:809–814.
33. Cavallo A, Johnson DN, White MG, et al. Thyroid nodule size at ultrasound as a predictor of malignancy and final pathologic size. *Thyroid.* 2017; 3:641–650.
34. Davis NL, Gordan M, Germann E, et al. Clinical parameters predictive of malignancy of thyroid follicular neoplasms. *Am J Surg.* 1991;161:567–569.
35. Bronner MP, LiVolsi VA. Oxyphilic (Askanazy/Hurthle cell) tumors of the thyroid: microscopic features predict biologic behaviour. *Surg Pathol.* 1988;1:137–50.
36. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1–133.
37. Tessler FN, Middleton WD, Grant EG, et al. ACR thyroid imaging, reporting and data system (TI-RADS): white paper of the ACR TI-RADS Committee. *J Am Coll Radiol.* 2017;14(5):587–595.
38. Remotti LR, Kramer CK, Leitão CB, et al. Thyroid ultrasound features and risk of carcinoma: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Thyroid.* 2015;25(5):538–550.
39. Trimboli P, Deandrea M, Mormile A, et al. American Thyroid Association ultrasound system for the initial assessment of thyroid nodules: use in stratifying the risk of malignancy of indeterminate lesions. *Head Neck.* 2018;40(4):722–727.
40. Tang AL, Falcioglu M, Yang H, et al. Validation of American Thyroid Association ultrasound risk assessment of thyroid nodules selected for ultrasound fine-needle aspiration. *Thyroid.* 2017;27(8):1077–1082.
41. Middleton WD, Teefey SA, Reading CC, et al. Comparison of performance characteristics of American College of Radiology TI-RADS, Korean Society of Thyroid Radiology TI-RADS, and American Thyroid Association guidelines. *Am J Roentgenol.* 2018;210(5):1148–1154.
42. Barbosa TLM, Junior COM, Graf H, et al. ACR TI-RADS and ATA US scores are helpful for the management of thyroid nodules with indeterminate cytology. *BMC Endocr Disord.* 2019;19(1):112.
43. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7:569–580.
44. Bode-Lesniewska B, Cochand-Priollet B, Straccia P, et al. Management of thyroid cytological material, preanalytical procedures and bio-banking. *Cytopathology.* 2019;30:7–16.
45. Patel KN, Angell TE, Babiarz J, et al. Performance of a Genomic Sequencing Classifier for the Preoperative Diagnosis of Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. *JAMA Surg.* 2018; 153:817–24.

#### ORCID i wkład autorów

Jarosław Świrta 0000-0001-6353-0162 <sup>A,AC,AE,F</sup>

Michał Romaniszyn <sup>A,AC,E</sup>

Marcin Barczyński <sup>A,AC,E,F</sup>

#### Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

#### AUTOR KORESPONDUJĄCY

Jarosław Szymon Świrta

ul. Kuźnicy Kollątajowskiej 16a/35, 31-234 Kraków, Polska

tel.: 502 182 963

e-mail: swirtaszymon@gmail.com

Nadesłano: 18.03.2020

Zaakceptowano: 03.06.2020

A = Work concept and design, B = Data collection and analysis, C = Responsibility for statistical analysis, D = Writing the article, E = Critical review, F = Final approval of the article

## ORIGINAL ARTICLE

## WPŁYW ELEKTYWNEJ LIMFADENEKTOMII PRZEDZIAŁU VI SZYI U CHORYCH Z ROZPOZNANIEM CYTOLOGICZNYM PODEJRZENIE NOWOTWORU PĘCZERZYKOWEGO TARCZYCY NA OCENĘ STOPNIA ZAAWANSOWANIA CHOROBY NOWOTWOROWEJ I RYZYKO POWIKŁAŃ CHIRURGICZNYCH

### THE IMPACT OF ELECTIVE CENTRAL LYMPH NODE DISSECTION ON POSTOPERATIVE PATHOLOGICAL STAGING AND SURGICAL COMPLICATION RATE IN PATIENTS WITH RESULTS OF FINE NEEDLE ASPIRATION BIOPSY SUSPICIOUS FOR FOLLICULAR NEOPLASM OF THYROID

DOI: 10.36740/WLek202004102

Jarosław Świrta<sup>1</sup>, Michał Romaniszyn<sup>2</sup>, Marcin Barczyński<sup>1</sup><sup>1</sup>III KATEDRA CHIRURGII OGÓLNEJ, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET Jagielloński, KRAKÓW, POLSKA<sup>2</sup>ZAKŁAD DYDAKTYKI MEDYCZNEJ, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET Jagielloński, KRAKÓW, POLSKA**STRESZCZENIE**

**Wstęp:** Zmiany pęcherzykowe tarczycy stanowią częstą patologię tego narządu. Zalicza się do nich gruczolak pęcherzykowy, raka pęcherzykowy oraz wariant pęcherzykowy raka brodawkowatego. Obecnie nie ma przedoperacyjnego badania diagnostycznego, które pozwoliłoby wykluczyć złośliwy charakter zmian pęcherzykowych, wobec czego większość chorych z podejrzeniem nowotworu pęcherzykowego tarczycy wymaga leczenia operacyjnego w celu postawienia ostatecznego rozpoznania.

**Cel pracy:** Zbadanie wpływu elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi u chorych kwalifikowanych do zabiegu operacyjnego z powodu wyniku badania cytologicznego „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” lub „podejrzenie nowotworu z komórek oksyfilnych” uzyskanego za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC) na ocenę stopnia zaawansowania raka tarczycy rozpoznanego w histopatologicznym badaniu pooperacyjnym oraz oszacowanie ryzyka wystąpienia wczesnych powikłań chirurgicznych po tej procedurze.

**Materiały i metody:** Do badania zakwalifikowano kolejnych 80 chorych operowanych w III Klinice Chirurgii Ogólnej UJCM w latach 2016–2018. Kryteria włączenia stanowiły: wynik BAC „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” lub „nowotworu z komórek oksyfilnych” tarczycy, brak cech inwazyjnego nowotworu, takich jak przerzuty do węzłów chłonnych lub przerzuty odległe oraz naciekanie okolicznych tkanek w badaniu klinicznym bądź w przedoperacyjnych badaniach obrazowych oraz świadoma zgoda chorego. U wszystkich chorych wykonano elektywną limfadenektomię przedziału VI szyi. Porównano częstość wczesnych powikłań chirurgicznych w grupie badanej i w grupie chorych operowanych w tym samym okresie w tutejszym ośrodku z powodu guzkaowego.

**Wyniki:** U 10 (12,5%) chorych rozpoznano raka tarczycy, w tym raka brodawkowatego u 8 (80%) chorych i raka pęcherzykowego u 2 (20%) chorych. Spośród zmian łagodnych dominował gruczolak pęcherzykowy stwierdzony u 42 (60%) chorych. Wycięto łącznie 129 węzłów chłonnych (średnio 1,6 węzła na 1 chorego). U 26 chorych nie stwierdzono utkania chłonnego w preparacie pooperacyjnym. Przerzutów węzłowych nie stwierdzono u żadnego chorego z rozpoznaniem rakiem tarczycy. Nie stwierdzono także istotnych różnic w częstości występowania wczesnych powikłań pooperacyjnych pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną: jednostronny niedowład fałdu głosowego (3,38% vs. 1,49%,  $p=0,08$ ), hipokalcemia (1,25% vs. 0,44;  $p=0,29$ ) pooperacyjne krwawienie do rany (5% vs. 5,4%;  $p=0,86$ ).

**Wnioski:** U chorych operowanych z powodu podejrzenia nowotworu pęcherzykowego lub podejrzenia nowotworu z komórek oksyfilnych tarczycy elektywna limfadenektomia przedziału VI nie wpływa na pooperacyjny staging w przypadku stwierdzenia raka tarczycy w pooperacyjnym preparacie, a także nie wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia wczesnych powikłań pooperacyjnych, o ile operację przeprowadza doświadczony chirurg.

**SŁOWA KLUCZOWE:** rak pęcherzykowy tarczycy, gruczolak pęcherzykowy tarczycy, wariant pęcherzykowy raka brodawkowatego tarczycy, elektywna limfadenektomia, niedowład nerwu kraniowego wstępnego

**ABSTRACT**

**Introduction:** Follicular-patterned lesions of the thyroid are common; these include follicular adenoma, follicular cancer and follicular variant of papillary cancer. At present, preoperative discrimination between follicular adenoma and follicular cancer is infeasible and most patients require surgery to confirm diagnosis.

**The aim:** To assess the impact of elective central lymph node dissection on postoperative pathological staging and early surgical complication rate in patients operated for suspicion for follicular neoplasm or suspicion for oxyphilic neoplasm of thyroid.

**Materials and Methods:** Eighty consecutive patients operated between 2016–2018 in Third Department of General Surgery UJCM because of suspicious for follicular neoplasm of the thyroid were included into the study. Inclusion criteria were: the result of fine needle aspiration biopsy “suspicious for follicular/oxyphilic neoplasm”, absence of invasive neoplasm features as follows infiltration of surrounding tissue or lymph nodes/distant metastases, informed consent. In all patients elective central lymph node dissection was

performed. Surgical early postoperative complications were reported and the rate was compared between the study group and the control group consisting of patients operated on in the same period for benign nodular goitre.

**Results:** In 10 (12,5%) patients thyroid cancer was diagnosed, including 8 (80%) patients with papillary cancer and 2 (20%) patients with follicular cancer. The most common benign lesion was follicular adenoma diagnosed in 42 (60%) patients. There were 129 lymph nodes dissected (mean 1.6 lymph node per 1 patient), all lymph nodes were clear of cancer cells. In 26 patients there were no lymph nodes in postoperative preparation. Metastatic lymph nodes were not identified in any patients of the study group with final diagnosis of thyroid cancer. No significant differences were identified in prevalence of early postoperative complications among the study group and the control group patients: unilateral recurrent laryngeal nerve (RLN) palsy 3.4% vs. 1.49%;  $p=0.08$ , hypocalcemia (5% vs. 5.4%;  $p=0.86$ ), postoperative hemorrhage (1.25% vs. 0.44;  $p=0.29$ ).

**Conclusions:** Elective central lymph node dissection at experienced surgical hands does not improve postoperative pathological staging and is not associated with higher risk of early postoperative complications.

**KEY WORDS:** follicular thyroid cancer, follicular thyroid adenoma, follicular variant of papillary thyroid cancer, elective lymph node dissection, recurrent laryngeal nerve palsy

## SKRÓTY:

NKW – nerw krtańniowy wsteczny;

BACC – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana;

USG – badanie ultrasonograficzne;

ATA – *American Thyroid Association* – Amerykańskie Towarzystwo Tyreologiczne

## WSTĘP

Choroby tarczycy należą do najczęstszych schorzeń układu wydzielnia wewnętrznego. Około 50% osób po 50. roku życia posiada zmiany ogniskowe w gruczole tarczowym, natomiast zaburzenia czynności tarczycy dotyczą około 7% dorosłej populacji [1]. Raki stanowią ponad 95% nowotworów złośliwych tarczycy i odpowiadają za około 1% wszystkich nowotworów złośliwych w populacji. W ciągu ostatnich lat liczba rozpoznań raka tarczycy dynamicznie wzrasta [2, 3]. Według danych amerykańskich rak tarczycy plasuje się na 3. miejscu wśród nowotworów, których rozpoznawalność zwiększa się najszybciej, z podwojeniem zapadalności w ciągu ostatnich 3 lat [4–6]. Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów w 2016 stwierdzono około 4000 nowych zachorowań na raka tarczycy [7].

Morfologię gruczołu tarczowego ocenia się za pomocą badania ultrasonograficznego (USG). W przypadku stwierdzenia zmian ogniskowych, przy spełnieniu kryteriów, przeprowadza się biopsję aspiracyjną cienkoigłową celowaną (BACC) w celu wykluczenia choroby nowotworowej. Biopsja gruboigłowa nie poprawia znacząco trafności rozgraniczenia raka i gruczolaka pęcherzykowego. Wskazaniem do wykonania BACC pod kontrolą USG jest obecność wyczuwalnego guzka lub zmiany ogniskowej w tarczycy o średnicy >10 mm lub >5 mm w przypadku obecności dodatkowych czynników ryzyka złośliwości. Klasyfikacja cytologiczna nakłuwanym zmianom powinna być prowadzona według zaleceń *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* (TBSRTC). Wynik BACC tarczycy przyporządkowany zostaje do jednej z 6 kategorii: 1 – biopsja niediagnostyczna, 2 – zmiana łagodna, 3 – zmiana pęcherzykowa bliżej nieokreślona, 4 – podejrzeniem nowotworu pęcherzykowego, 5 – podejrzenie złośliwości, 6 – nowotwór złośliwy [8].

Pomimo technicznego rozwoju oraz wzrostu trafności metod diagnostycznych ich czułość pozostaje niezadowolająca. Według rekomendacji Amerykańskiego Towarzystwa Tyreologicznego (ATA) dla kategorii IV – podejrzenie nowotworu pęcherzykowego lub nowotworu z komórek oksyficznych tarczycy – ryzyko złośliwości oceniane jest na 25–40%. Z drugiej strony około 25% tych zmian okazuje się nie być w ogóle zmianą nowotworową i może odpowiadać guzkowi rozrostowemu o wysokiej komórkowości lub limfocytowemu zapaleniu tarczycy. W przypadku kategorii IV wykluczyć nowotwór złośliwy można jedynie oceniając materiał histopatologiczny uzyskany na drodze zabiegu operacyjnego. Publikowane polskie dane wskazują, że ryzyko raka w kategorii IV według klasyfikacji Bethesda wynosi od 8,2 do 19%. Minimalny zakres operacji obejmuje całkowite wycięcie płata tarczycy wraz z cieśnią, który można poszerzyć w zależności od indywidualnej oceny ryzyka nowotworu złośliwego oraz obecności zmian ogniskowych w drugim płacie. W przypadku guzów o średnicy poniżej 2 cm dopuszcza się rezygnację z zabiegu operacyjnego pod warunkiem nieobecności cech ryzyka klinicznego oraz skrupulatnego dalszego monitorowania klinicznego i ultrasonograficznego [8, 9].

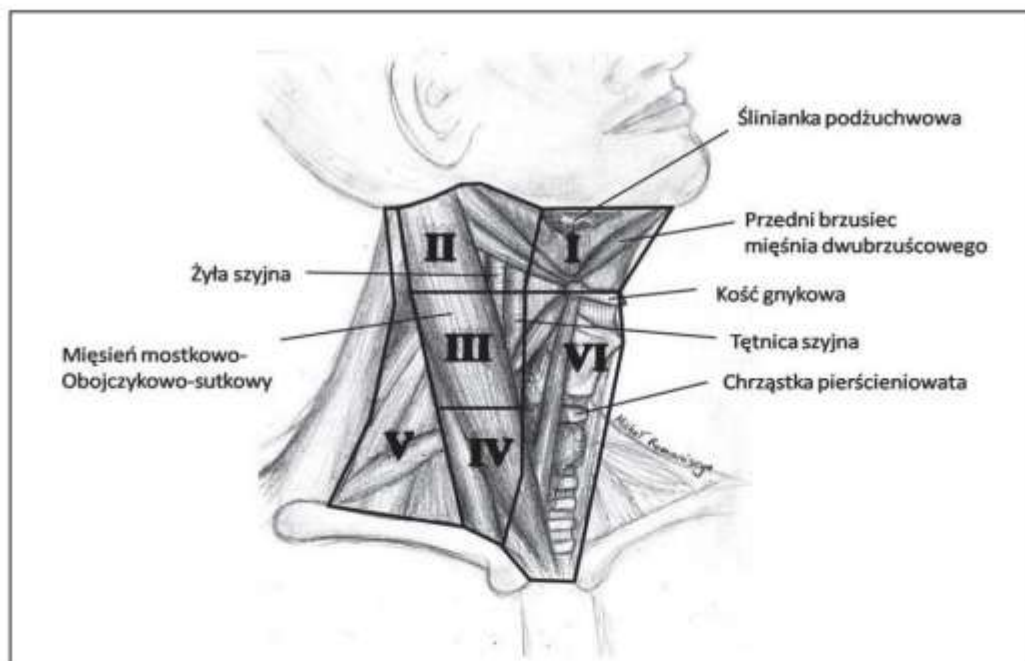
Przeglądając bazę danych Pub Med (stan na 30.10.2019 r.) nie znaleziono prac, w których analizowano zagadnienie elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi u chorych z podejrzeniem nowotworu pęcherzykowego oraz nowotworu z komórek oksyficznych tarczycy.

## CEL PRACY

Celem badania było określenie roli elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi u chorych z rozpoznaniem biopsyjnym „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” lub „podejrzenie nowotworu z komórek oksyficznych” w ocenie stopnia zaawansowania raka tarczycy rozpoznanego w histopatologicznym badaniu pooperacyjnym oraz oszacowanie ryzyka wystąpienia wczesnych powikłań chirurgicznych związanych z tą procedurą.

## MATERIAŁ I METODY

Do badania włączono 80 kolejnych pacjentów operowanych w III Klinice Chirurgii Ogólnej UJCM w Krakowie w latach 2016–2018 z powodu podejrzenia nowotworu



Ryc. 1. Klasyfikacja regionalnych węzłów chłonnych szyi według American Thyroid Association.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej.

	Wartość średnia [min - max]	Odchylenie standardowe [SD]	Liczba chorych [n]
Wiek [lata]	55,6 [21-88]	17,55	
Rozmiar guza [mm]	18,5 [5-60]	12,28	
Czynniki ryzyka złośliwości*	1,28 [0-4]	0,93	
Choroba Hashimoto			28
Rozpoznanie cytologiczne – podejrzenie nowotworu pęcherzykowego/ podejrzenie nowotworu z komórek oksyfilnych			40/40
Płeć (M/K)			12/68

\*Czynniki ryzyka złośliwości:

- kliniczne

- przerzuty do węzłów chłonnych lub przerzuty odległe;
- ekspozycja szyi na promieniowanie jonizujące w wywiadzie;
- szybki wzrost guzka;
- guzek twardy, zrośnięty z otoczeniem;
- średnica guzka > 4 cm;
- pojawienie się guzka tarczycy przed 20. rokiem życia lub po 60. roku życia;
- porażenie nerwów krtaniowych, szczególnie jednostronne;

- ultrasonograficzne

- cechy wskazujące na możliwość przerzutu raka tarczycy do węzłów chłonnych szyjnych;
- cechy naciekania torebki tarczycy wraz z naciekaniem okolicznych narządów lub bez;
- obecność mikrozwapnień w zmianie ogniskowej tarczycy;
- charakter lity i hipoechogeniczność zmiany ogniskowej;
- kształt zmiany ogniskowej („wysokość > szerokość”);
- nieregularne granice zmiany;
- cechy wzmożonego, chaotycznego przepływu naczyniowego centralnie w zmianie.

Na podstawie [9].

Tabela 2. Raport histopatologiczny.

	Zmiana łagodna	Nowotwór złośliwy	p
Liczba wyciętych węzłów chłonnych	107	22	
Liczba wyciętych węzłów chłonnych (średnia)	1,5	2,2	0,13
Liczba węzłów chłonnych przerzutowych	-	0	
Liczba chorych bez węzłów chłonnych w preparacie	25	1	0,15
Wynik badania histopatologicznego	Gruczołek pęcherzykowy = 42	Rak brodawkowaty = 8	
	Wole guzkowe = 21	Rak pęcherzykowy = 2	
	Przewlekłe zapalenie = 7		

pęcherzykowego lub nowotworu z komórek oksyfilnych tarczycy. Dane kliniczne zbierano prospektywnie. Kryteria włączenia stanowiły: potwierdzone cytologiczne rozpoznanie „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” lub „podejrzenie nowotworu oksyfilnego tarczycy” u chorych dotychczas nieleczonego z tego powodu, wiek od 18. do 90. rż, świadoma zgoda chorego na udział w badaniu. Kryterium wyłączenia stanowiło występowanie ewidentnych cech nowotworu złośliwego, takich jak naciekanie okolicznych tkanek w badaniach obrazowych lub badaniu klinicznym, podejrzenie przerzutów do węzłów chłonnych lub przerzutów odległych.

Charakterystyka grupy pod względem cech demograficznych oraz klinicznych została przedstawiona w tabeli 1. U wszystkich chorych wykonano elektywną limfadenektomię przedziału VI szyi (Ryc. 1). Przeanalizowano rozpoznania histopatologiczne oraz stopień zaawansowania choroby nowotworowej wg 8 edycji AJCC/ TNM z 2017 roku (Tab. 2, 5) [10]. Porównano odsetki wczesnych pooperacyjnych powikłań chirurgicznych w grupie badanej oraz w grupie chorych operowanych w tym samym okresie w tutejszej Klinice z powodu wola nienowotworowego (Tab. 3). Ruchomość fałdów głosowych oceniał specjalista laryngologii w 2. dobie pooperacyjnej metodą wideolaryngoskopii. Odsetek uszkodzeń NKW przedstawiono w przeliczeniu na nerwy narażone na ryzyko uszkodzenia, a nie na liczbę pacjentów. Za definicję hipokalcemii przyjęto obniżenie stężenia wapnia całkowitego w surowicy poniżej 2,0 mmol/l w okresie hospitalizacji. U wszystkich chorych po całkowitym wycięciu tarczycy stosowano rutynowo substytucję preparatami wapnia i aktywną postacią witaminy D<sub>3</sub>. Opracowanie statystyczne wykonano w pakiecie oprogramowania Statistica 12 opracowanym przez StatSoft Inc. Jednoczynnikową analizę statystyczną materiału przeprowadzono przy pomocy testów Chi<sup>2</sup> Pearsona oraz U Manna-Whitney'a. W ocenie istotności statystycznej przyjęto wartość p<0,05.

## WYNIKI

Średni wiek grupy badanej wyniósł 55,6 roku, z przewagą kobiet (stosunek K/M = 5,7/1). Chorobę Hashimoto stwierdzono u 28 chorych. W badaniu cytologicznym rozpoznania podejrzenie nowotworu pęcherzykowego i podejrzenie nowotworu z komórek oksyfilnych wystąpiły w jednakową częstością (40 vs. 40 chorych). U 68 chorych zakres zabiegu polegał na całkowitym wycięciu tarczycy, a u 12 wykonano jedynie lobektomię. W badaniu pooperacyjnym u 10 chorych rozpoznano raka tarczycy, najczęstszy podtyp

stanowił rak brodawkowaty (8/10, 80%). Spośród zmian łagodnych dominował gruczołek pęcherzykowy (42/70, 60%). W badaniach histopatologicznych stwierdzono łącznie 129 węzłów chłonnych (średnio 1,6 węzła chłonnego na 1 chorego), wszystkie węzły zostały zweryfikowane jako wolne od komórek nowotworowych. U 26 chorych nie znaleziono węzłów chłonnych w preparacie pooperacyjnym. W porównaniu do grupy chorych ze zmianami łagodnymi, w grupie chorych z rakiem tarczycy wykazano nieistotnie większą średnią liczbę węzłów chłonnych (2,2 vs. 1,5, p= 0,13) oraz nieistotnie częściej stwierdzano węzły chłonne w preparacie (90% vs. 64%, p=0,1). Analiza pooperacyjnych powikłań chirurgicznych nie wykazała istotnych różnic w częstości ich występowania pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną: niedowład NKW (3,38% vs. 1,49%, p=0,08), krwawienia do rany pooperacyjnej (1,25% vs. 0,44%, p=0,29) oraz hipokalcemii (5% vs 5,4%, p= 0,86). Porównując częstość powikłań w zależności od zakresu zabiegu, wczesny pooperacyjny niedowład NKW oraz krwawienie do rany stwierdzono w grupie badanej jedynie u chorych poddanych całkowitemu wycięciu tarczycy (Tab. 4).

## DYSKUSJA

Raki, w odróżnieniu od pozostałych nowotworów litych, wykazują tendencję do rozsiewu drogą naczyń chłonnych. W 1908 roku Moynihan zwrócił uwagę na znaczącą rolę znajomości anatomii układu chłonnego w chirurgii onkologicznej (*The surgery of malignant disease is not the surgery of organs, it is anatomy of the lymphatic system*) [11]. Limfadenektomia stanowi nieodłączną składową leczenia chorób nowotworowych wywodzących się z tkanki nabłonkowej. Wycięcie regionalnego układu chłonnego ma na celu doszczętne usunięcie komórek nowotworowych i w konsekwencji wyleczenie. Należy mieć na uwadze, że węzły chłonne są najczęstszym miejscem wznowy raka tarczycy po leczeniu radykalnym, a przerzuty węzłowe są uważane za jeden z czynników rokowniczych. Wykazano zmniejszony odsetek wznów raka tarczycy po elektywnej (profilaktycznej) limfadenektomii [12–15]. Pomimo braku jednego schematu przerzutowania najczęściej pierwszym miejscem rozsiewu są węzły chłonne przedziału środkowego szyi (stacja VI) [16]. Znajduje to odzwierciedlenie w zaleceniach dotyczących leczenia operacyjnego raka tarczycy. W większości przypadków, oprócz całkowitego wycięcia tarczycy, zaleca się elektyw-



**Tabela 3.** Wczesne powikłania pooperacyjne.

	Grupa badana [n=80]	Grupa kontrolna [n=1138]	p
Wczesny niedowład/porażenie NKW	5(3,38%)*	31 (1,49%) <sup>b</sup>	0,08
krwawienie	1 (1,25%)	5 (0,44%)	0,29
	Grupa badana [N=68]	Grupa kontrolna [N=972]	
hipokalcemia	4 (5%)	62 (5,4%)	0,86

NKW – nerw krtaniowy wsteczny; \* 148 NKW narażonych na ryzyko uszkodzenia; <sup>b</sup> 2075 NKW narażonych na ryzyko uszkodzenia; n – liczba chorych poddanych operacji tarczycy (lobektomii lub tyreoidektomii), N – liczba chorych poddanych tyreoidektomii

**Tabela 4.** Wczesne powikłania pooperacyjne w zależności od zakresu zabiegu w grupie badanej.

	Lobektomia n=12	Tyreoidektomia n=68	p
Niedowład/porażenie NKW	0	5	1,0
Hipokalcemia	0	4	1,0
Krwawienie	0	1	1,0

ne wycięcie węzłów chłonnych przedziału VI. Pozostałe przedziały wymagają wycięcia w razie podejrzenia obecności procesu nowotworowego, o czym może świadczyć charakterystyczny obraz w ultrasonografii i w badaniu śródoperacyjnym lub wcześniejsze potwierdzenie zajęcia przez nowotwór w oparciu o wynik badania cytologicznego [17]. Znaczenie rokownicze elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi w leczeniu chorób nowotworowych tarczycy wykazano kilka lat temu w ośrodku autorów. Barczyński i wsp. porównali wyniki leczenia dwóch grup chorych (tyreoidektomia z obustronną limfadenektomią przedziału VI węzłów chłonnych szyjnych oraz tyreoidektomia bez limfadenektomii). Po 10 latach obserwacji wykazano mniejszy odsetek wznów lokoregionalnych w grupie chorych poddanych limfadenektomii [18]. Ponadto, na podstawie 5-letniej obserwacji po operacyjnym leczeniu pierwotnym 760 chorych na raka brodawkowatego tarczycy odnotowano, że obecność przerzutów w przedziale VI szyi oraz stosunek węzłów chłonnych zmienionych przerzutowo do wszystkich węzłów chłonnych w preparacie po limfadenektomii  $\geq 0,3$  był najsilniejszym czynnikiem rokowniczym wznowy w węzłach chłonnych przedziału bocznej szyi [19].

Pod rozpoznaniem cytologicznym „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego/ z komórek oksyfilnych tarczycy” kryje się zarówno rak pęcherzykowy, jak i wariant pęcherzykowy raka brodawkowatego. Rak brodawkowaty jest najczęstszym (obecnie około 85%) nowotworem złośliwym tarczycy [20]. Charakteryzuje go duża skłonność do przerzutowania drogą naczyń chłonnych. Według piśmiennictwa nawet w 85–90% przypadków wykrywa się przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych. Rozsiew krwiopochodny występuje rzadko i zazwyczaj późno [21–24].

Rak pęcherzykowy wykazuje odmienne cechy biologiczne. Częstość jego występowania maleje i obecnie wynosi około 5% [20]. Przerzuty raka pęcherzykowego tarczycy do węzłów chłonnych występują rzadko (3–15%), jednak ich stwierdzenie jest uważane za niekorzystny czynnik

rokowniczy [25–27]. Ze względu na relatywnie mały odsetek przypadków rozsiewu drogą układu chłonnego polskie rekomendacje leczenia raka tarczycy dopuszczają odstępianie od wycięcia węzłów chłonnych w określonych przypadkach [28].

Jak zatem potraktować zmianę ogniskową, dla której ryzyko złośliwości sięga nawet 40%? Czy zastosować bardziej radykalne leczenie odpowiednie dla zmiany złośliwej, czy zminimalizować zakres zabiegu jak w przypadku nienowotworowego wola? Przede wszystkim należy podkreślić, że w przypadku zmiany zweryfikowanej w BACC jako „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego” ryzyko raka w polskiej populacji jest niższe niż w populacji amerykańskiej i zawiera się w przedziale 8,2–19% [28]. Kolejnym zagadnieniem, na które należy odpowiedzieć, jest wpływ limfadenektomii na odsetek powikłań wynikający z poszerzenia zakresu zabiegu.

Analiza histopatologiczna wykazała, że u 80 chorych wycięto łącznie 129 węzłów chłonnych, co dało średnią 1,6 węzła na chorego. Po uwzględnieniu faktu, że w pooperacyjnym preparacie węzły chłonne znaleziono jedynie u 54 chorych, na chorego przypadło 2,4 węzła chłonnego. W grupie chorych ze zmianą łagodną średnia liczba węzłów chłonnych na pacjenta wyniosła 1,5, natomiast w grupie chorych z nowotworem złośliwym 2,2. Analiza statystyczna okazała się nieznamienna ( $p=0,13$ ). W żadnym z węzłów chłonnych nie stwierdzono obecności komórek nowotworowych. Diagnostyka mikroskopowa wyciętego preparatu oznaczonego przez chirurga jako „węzły chłonne” wykazała u 8 chorych (10%) obecność przytarczyc, choć należy podkreślić, że w żadnym z tych przypadków nie wystąpiła objawowa hipokalcemia pooperacyjna. W 5 przypadkach (6,25%) wycięto fragment grasicy, natomiast u 13 chorych (16,25%) preparat zawierał jedynie tkankę tłuszczową. Limfadenektomia przedziału VI szyi nie przyczyniła się do dokładniejszej oceny stopnia zaawansowania raka tarczycy w badanej grupie chorych, jeśli został stwierdzony w preparacie.

Każdy zabieg chirurgiczny niesie ze sobą ryzyko powikłań. Dla chirurgii tarczycy charakterystyczne komplikacje stanowią niedowład lub porażenie nerwu krtaniowego wstecznego (NKW) oraz hipokalcemia związana z pooperacyjną niedoczynnnością przytarczyc. Pooperacyjny niedowład fałdów głosowych będący konsekwencją uszkodzenia NKW stanowi najbardziej niepokojące powikłanie. Przejściowy niedowład stwierdza się w 0,4–12% przypadków [29–31], natomiast odsetek trwałych uszkodzeń wynosi 0,2–6% [31–33]; przy czym jego częstość jest mniejsza w ośrodkach dysponujących dużym doświadczeniem w chirurgii tarczycy i korzystających rutynowo z metody śródoperacyjnego neuromonitoringu (0,2–0,8%). Raportowana w piśmiennictwie częstość niedowładu NKW zawiera się w szerokim przedziale także ze względu na fakt, że nie wszyscy chorzy po operacji tarczycy są badani laryngoskopowo, a jedynie chorzy z objawami w postaci dysfonii lub chrypki w przebiegu pooperacyjnym oraz zróżnicowanie czasu po operacji, kiedy badania laryngoskopowe jest wykonywane (im rzadziej i później badamy, tym częściej odsetek uszkodzeń wczesnych jest niedoszacowany i pozornie wyniki są lepsze). Metaanaliza uwzględniająca 25000 pacjentów wykazała częstość przejściowego i trwałego pooperacyjnego uszkodzenia jednostronnego fałdów głosowych odpowiednio u 9,8% oraz 2,3% chorych. Okres obserwacji wyniósł średnio rok [34]. Nadzieję na zmniejszenie odsetka pooperacyjnego niedowładu NKW wiązano z zastosowaniem metody śródoperacyjnego neuromonitoringu (IONM). W badaniach randomizowanych udowodniono spadek częstości trwałego [35] oraz czasowego porażenia fałdów głosowych, szczególnie u chorych wysokiego ryzyka [36]. Opublikowana w 2019 roku metaanaliza 5 badań randomizowanych nie wykazała, aby zastosowanie IONM miało przewagę nad klasyczną identyfikacją NKW i pozwoliło istotnie statystycznie zmniejszyć częstości czasowego lub trwałego jednostronnego uszkodzenia NKW, jednak w analizie nie uwzględniono korzyści z zastosowania neuromonitoringu ciągłego, a także koncepcji etapowej tyreoidektomii w prewencji obustronnego niedowładu fałdów głosowych [37]. Powszechnie wiadomo, że obustronne uszkodzenie NKW jest powikłaniem zagrażającym życiu chorego i może wymagać trwałego wyłonienia tracheostomii. W przypadku jednostronnego niedowładu NKW do głównych objawów zalicza się chrypkę, dysfonię, sporadycznie występuje dysfagia. Należy mieć na uwadze, że niedowład NKW to nie tylko wyżej wymienione dolegliwości. Nouraei i wsp. wykazali znaczący wzrost częstości hospitalizacji w tej grupie chorych, częstsze infekcje dolnych dróg oddechowych i wyższą śmiertelność [38].

W przeprowadzonym badaniu wczesny pooperacyjny niedowład fałdów głosowych stwierdzono w grupie badanej u 5 chorych (3,38% spośród 148 nerwów narażonych na ryzyko uszkodzenia). Powikłanie to wystąpiło tylko u chorych poddanych całkowitemu wycięciu tarczycy. U żadnego z tych chorych nie stwierdzono nowotworu złośliwego w badaniu histopatologicznym. Porównano częstość wczesnego pooperacyjnego niedowładu fałdu głosowego w grupie badanej

i grupie kontrolnej chorych operowanych w ośrodku autorów w tym samym przedziale czasowym. W grupie kontrolnej na 1138 operacji z powodu łagodnego wola (201 łobektomii i 937 tyreoidektomii), bez limfadenektomii przedziału VI szyi, stwierdzono wczesny niedowład/porażenie NKW u 31 chorych (1,49% spośród 2075 nerwów narażonych na ryzyko uszkodzenia). Odsetek ten nie był znamienne statystycznie niższy w grupie kontrolnej w porównaniu z odsetkiem wczesnego niedowładu NKW w grupie badanej ( $p=0,08$ ). Na podstawie piśmiennictwa można stwierdzić, że operacja ze wskazań onkologicznych, wycięcie węzłów chłonnych, operacja dużego zamostkowego wola i reoperacja są uważane za czynnik ryzyka wystąpienia jednostronnego pooperacyjnego niedowładu fałdów głosowych a także pooperacyjnej hipokalcemii [39–41]. Jednak częstość występowania tych powikłań jest odwrotnie proporcjonalna do doświadczenia chirurga, im doświadczenie większe, tym ryzyko powikłań jest mniejsze.

Najczęstszym powikłaniem charakterystycznym dla chirurgii tarczycy jest pooperacyjna hipokalcemia [42]. Według różnych doniesień jej występowanie sięga nawet 71% [43]. Duża rozbieżność w publikowanych pracach może być spowodowana brakiem ściśle przyjętej definicji terminu hipokalcemia. Mehanna i wsp. wykazali, że w zależności od przyjętej definicji częstość hipokalcemii waha się pomiędzy 0 a 46% [44]. Brak jednoznacznych kryteriów rozpoznania utrudnia rzetelną, rzeczywistą ocenę jej występowania, analizę oraz ustalenie wytycznych postępowania. Objawy kliniczne hipokalcemii występują zwykle w ciągu 24–48 h. Są wynikiem niedoboru wapnia zjonizowanego, który jest jego aktywną biologicznie formą. Dotyczą przede wszystkim zaburzeń czynności układu nerwowego i nerwowo-mięśniowego [45]. Według wytycznych Polskiej Grupy Nowotworów Endokrynnych w bezpośrednim okresie pooperacyjnym konieczne jest monitorowanie stężenia wapnia zjonizowanego w surowicy krwi pozwalające ocenić funkcję przytarczyc. Etiologia hipokalcemii jest wieloczynnikowa. W przypadku zabiegów operacyjnych na tarczycy i przytarczycach wymienia się niedoczynność przytarczyc spowodowaną uszkodzeniem gruczołu lub jego unaczynienia oraz przypadkowym wycięciem. Do innych przyczyn zalicza się hemodylucję spowodowaną podażą płynów dożylnie, hiperkalciurię w odpowiedzi na stres pooperacyjny lub nadmierne uwalnianie kalcytoniny, zespół głodnych kości u chorych z zaburzeniami metabolicznymi kości. Im wcześniej występuje od zabiegu, tym dłużej się utrzymuje [46, 47]. Leczenie wymaga zwykle doustnej podaży preparatów wapnia oraz prekursora czynnego metabolitu witaminy D<sub>3</sub>, choć w przypadku ostrych objawów konieczna może się okazać suplementacja wapnia dożylnie. W większości przypadków niedoczynność przytarczyc ma charakter przejściowy. Jeśli utrzymuje się powyżej 6 miesięcy, stwierdza się postać przetrwałą. Konieczność regularnego przyjmowania preparatów wapnia może być uciążliwa dla chorych. Jedną z alternatyw stanowi dożylna podaż analogu (teryparatyd) lub całej cząsteczki parathormonu (PTH). Takie postępowanie zmniejsza zapotrzebowanie na wapń, poprawia gęstość mineralną kości [48–51]. Ostateczną opcją może być przeszczepienie przytarczyc. Wyniki wahają się w szerokim przedziale (20–100%), duży wpływ ma sposób przechowywa-

nia i przygotowania gruczołu. Średni czas życia przeszczepu wynosi od 5 do 10 lat [52, 53]. W badaniach na dużych grupach wykazano wpływ profilaktycznej limfadenektomii w raku tarczycy na zwiększenie częstości przejściowej i trwałej niedoczynności przytarczyc [54–56].

W przeprowadzonym badaniu hipokalcemia wystąpiła u 4 chorych, w każdym przypadku miała charakter przejściowy. W porównaniu z grupą kontrolną hipokalcemię stwierdzano rzadziej (5% vs. 5,4%), różnica nie była jednak znamienna statystycznie ( $p=0,86$ ).

Krwawienie nie jest powszechnym powikłaniem w chirurgii tarczycy (0,5–1,5%). Ze względu na dużą dynamikę i ucisk na tchawicę stanowi zagrożenie dla życia chorego i wymaga doraźnej interwencji. Do podstawowych czynników ryzyka zalicza się płeć męską, starszy wiek, choroba Graves-Baseдова, wole zamostkowe, zabieg przeprowadzany przez chirurga o mniejszym doświadczeniu [57–60]. Limfadenektomia nie jest klasycznym czynnikiem ryzyka krwawienia, jednak można spotkać doniesienia, w których wykazano jej wpływ na wystąpienie krwotoku pooperacyjnego [61, 62]. Objawy, które powinny szczególnie zwracać naszą uwagę to niepokój chorego, ból lub uczucie ucisku w okolicy szyi, krwawienie z rany, powiększenie obwodu szyi, narastająca duszność, tachykardia oraz obfity drenaż [63]. W grupie badanej stwierdzono pojedynczy przypadek krwawienia po tyreoidektomii (1,25%). Krwawienie w grupie kontrolnej wystąpiło u 5 chorych (0,44%). Różnica nie była znamienna statystycznie ( $p=0,29$ ). W przeprowadzonej analizie poszerzenie zakresu zabiegu o limfadenektomię centralną nie wiązało się ze wzrostem ryzyka krwawienia do rany.

U 12 chorych wykonano całkowite wycięcie płata tarczycy wraz z cieśnią. W 2 przypadkach w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym rozpoznano mikroraka brodawkowatego tarczycy (pT1a). Z uwagi na wczesny stopień zaawansowania nowotworu radykalizacja leczenia – wtórne wycięcie drugiego płata tarczycy – nie była konieczna. Ponadto, w analizowanym materiale poważne powikłania, takie jak wczesne porażenie lub niedowład NKW, pooperacyjna hipokalcemia lub krwawienie do rany wymagające reoperacji wystąpiły jedynie u chorych poddanych całkowitemu wycięciu tarczycy (Tab. 4).

W badanej grupie częstość raka tarczycy wyniosła 12,5%, zatem mieści się w zakresie typowym dla polskiej populacji. Z uwagi na rozpowszechnienie badania USG oraz udoskonalenie techniki BACC nowotwory tarczycy są rozpoznawane we wczesnym stadium zaawansowania. Pozwala to na uzyskanie radykalności onkologicznej przy mniejszym zakresie zabiegu operacyjnego. W analizowanym materiale w 7 przypadkach (70%) rozpoznany nowotwór złośliwy okazał się mikrorakiem: pT1a (Tab. 5). Według zaleceń Polskiej Grupy Nowotworów Endokrynnych oraz ATA w takim stopniu zaawansowania raka tarczycy limfadenektomia przedziału VI szyi nie jest konieczna [8, 9].

Warto podkreślić, że wpływ zajęcia węzłów chłonnych na przeżycia odległe w zróżnicowanym raku tarczycy jest mniejszy niż np.: naciekanie okolicznych tkanek. Doskonale obrazuje to 8 edycja klasyfikacji AJCC/TNM, w której przyporządkowanie do stopnia zaawansowania klinicznego

nowotworu koreluje z przeżyciami odległymi. W porównaniu z 7. edycją klasyfikacji AJCC/TNM, według której chorzy z przerzutami do węzłów chłonnych przedziału VI szyi byli zaklasyfikowani do III stopnia zaawansowania, w najnowszej, 8. edycji, zostają przyporządkowani do stopnia II. Podobnie obecność przerzutów w węzłach chłonnych przedziału bocznego szyi (cecha N1b) dotychczas była równoznaczna z rozpoznaniem IV stopnia zaawansowania, natomiast obecnie są zaklasyfikowani jako II stopień zaawansowania. Szacowane 10-letnie przeżycie zależne od choroby dla chorych w II stopniu zaawansowania waha się w granicach 85–95% [10, 64].

Badanie to ma kilka ograniczeń. Podstawowym ograniczeniem badania jest niewielka liczebność grupy badanej. Przeprowadzenie analizy na większej grupie prawdopodobnie pozwoliłoby na uzyskanie większej różnorodności co do stopnia zaawansowania cechy T i umożliwiło stwierdzenie przerzutów w węzłach chłonnych przedziału VI oraz wskazanie czynników ryzyka ich wystąpienia zależnie od wielkości ogniska pierwotnego. Niewielka liczebność grupy badanej uniemożliwiła także przeprowadzenie analizy wieloczynnikowej ryzyka wystąpienia powikłań chirurgicznych. Kolejnym ograniczeniem tego badania jest brak odległej kontroli chorych z powikłaniami chirurgicznymi, stąd w badaniu oceniano jedynie powikłania wczesne. Jednak brak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania wczesnych powikłań w grupie chorych poddanych elektywnej limfadenektomii i operowanych bez limfadenektomii przemawia pośrednio za bezpieczeństwem tej procedury chirurgicznej w rękach chirurga doświadczonego w operacjach tarczycy. Na ocenę częstości wczesnej pooperacyjnej niedoczynności przytarczyc mogło mieć wpływ stosowanie rutynowej substytucji preparatami wapnia i aktywnej postaci witaminy D<sub>3</sub> u wszystkich chorych po całkowitym wycięciu tarczycy w okresie hospitalizacji.

## WNIOSKI

Elektywna limfadenektomia przedziału VI szyi u chorych zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego z powodu podejrzenia nowotworu pęcherzykowego lub oksyfilnego tarczycy nie wpływa na ocenę stopnia zaawansowania w przypadku rozpoznania nowotworu złośliwego, jak i nie wiąże się z wyższym ryzykiem wystąpienia wczesnych powikłań pooperacyjnych, o ile operację przeprowadza doświadczony chirurg. Stąd może nadal być ona rozważana jako opcja terapeutyczna u wybranych chorych z dużym guzem lub znacznym ryzykiem złośliwości oszacowanym na podstawie cech klinicznych, ultrasonograficznych lub śródoperacyjnych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977;7:481–493.
2. Morris LG, Sikora AG, Myssiorek D, DeLucure MD. The basis of racial differences in the incidence of thyroid cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2008;15:1169–1176
3. Pellegri G, Frasca F, Regalbuto C. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol.* 2013;2013:965212.

4. Davies L, Ouellette M, Hunter M, Welch HG. The increasing incidence of small thyroid cancers: where are the cases coming from? *Laryngoscope*. 2010; 120: 2446–2451.
5. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA*. 2006;295:2164–2167.
6. Morris LG, Myssiorek D. Improved detection does not fully explain the rising incidence of well-differentiated thyroid cancer: a population-based analysis. *Am J Surg*. 2010;200:454–461
7. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie. [http://onkologia.org.pl/raporty/ dostęp z dnia 01.07.2019].
8. Jarzab B, Płaczkiewicz-Jankowska E. Zasady diagnostyki zmian ogniskowych tarczycy i ich kwalifikacji do leczenia operacyjnego zgodnie z rekomendacjami polskich towarzystw naukowych „Diagnostyka i leczenie raka tarczycy” 2018. *Med Prakt*. 2018;10:69–81.
9. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1–133.
10. Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid*. 2017;27(6):751–756.
11. Moynihan BG. The surgical treatment of cancer of the sigmoid flexure and rectum with especial reference to the principles to be observed. *Surg Gynecol Obstet*. 1908;6:463.
12. Giordano D, Gradoni P, Oretti G. Treatment and prognostic factors of papillary thyroid microcarcinoma. *Clin. Otolaryngol*. 2010;35:118–124.
13. Lombardi CP, Bellantone R, De Crea C. Papillary thyroid microcarcinoma: extrathyroidal extension, lymph node metastases, and risk factors for recurrence in a high prevalence of goiter area. *World J Surg*. 2010;34:1214–1221.
14. Mercante G, Frasoldati A, Pedroni C. Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients. *Thyroid* 2009;19:707–716.
15. Pisello F, Geraci G, Nigro CL. Neck node dissection in thyroid cancer. A review. *G Chir*. 2010;31:112–118.
16. Park JH, Lee YS, Kim BW. Skip lateral neck node metastases in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2012;36:743–747.
17. Carty SE, Cooper DS, Doherty GM. Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19:1153–1158.
18. Barczyński M, Konturek A, Stopa M, Nowak W. Prophylactic central neck dissection for papillary thyroid cancer. *Br J Surg*. 2013;100:410–418.
19. Barczyński M, Konturek A, Stopa M, Nowak W. Nodal recurrence in the lateral neck after total thyroidectomy with prophylactic central neck dissection for papillary thyroid cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2014;399:237–244
20. Barczyński M, Konturek A. Obserwacja chorych po leczeniu z powodu wybranych nowotworów złośliwych. Część VII: zróżnicowany rak tarczycy. *Med Prakt*. 2017;9:29–31.
21. Kim HJ, Sohn SY, Jang HW. Multifocality, but not bilaterality, is a predictor of disease recurrence/persistence of papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2013;37:376–384.
22. Ducci M, Appetecchia M, Marzetti M. Neck dissection for surgical treatment of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 1997;16:333–335.
23. Coatesworth AP, MacLennan K. Cervical metastasis in papillary carcinoma of the thyroid: a histopathological study. *Int J Clin Pract*. 2002;56:241–242.
24. Rotstein L. The role of lymphadenectomy in the management of papillary carcinoma of the thyroid. *J Surg Oncol*. 2009;99:186–188.
25. Machens A, Hauptmann S, Dralle H. Prediction of lateral lymph node metastases in medullary thyroid cancer. *Br J Surg*. 2008;95:586–591.
26. Dralle H, Machens A. Surgical management of the lateral neck compartment for metastatic thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013;25:20–26.
27. Thompson LD, Wieneke JA, Paal E. A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature. *Cancer* 2001;91:505–524.
28. Jarzab B, Dedecjus M, Słowińska-Klencka D, et al. Rekomendacje Polskich Towarzystw Naukowych „Diagnostyka i leczenie raka tarczycy”. Aktualizacja na rok 2018. *Endokrynol Pol*. 2018;69(1):34–74.
29. Deniwar A, Kandil E, Randolph G. Electrophysiological neural monitoring of the laryngeal nerves in thyroid surgery: Review of the current literature. *Gland Surg*. 2015;4:368–375.
30. Deniwar A, Bhatia P, Kandil E. Electrophysiological neuromonitoring of the laryngeal nerves in thyroid and parathyroid surgery: A review. *World J Exp Med*. 2015;5:120–123.
31. Pisanu A, Porceddu G, Podda M, Cois A, Uccheddu A. Systematic review with metaanalysis of studies comparing intraoperative neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves versus visualization alone during thyroidectomy. *J Surg Res*. 2014;188: 152–161.
32. Gurrado A, Bellantone R, Cavallaro G, et al. Can total thyroidectomy be safely performed by residents?: A comparative retrospective multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e3241.
33. Goetzki PE, Schwarz K, Brinkmann J, Wirowski D, Lammers BJ. The impact of intraoperative neuromonitoring (IONM) on surgical strategy in bilateral thyroid diseases: Is it worth the effort? *World J Surg*. 2010;34:1274–1284
34. Jeannon JP, Orabi AA, Bruch GA, Abdalsalam HA, Simo R. Diagnosis of recurrent laryngeal nerve palsy after thyroidectomy: a systematic review. *Int J Clin Pract*. 2009;63(4): 624–9.
35. Ducos A, Lifante JC, Ducarroz S, Soardo P, Colin C, Peix JL. Influence of intraoperative neuromonitoring on surgeons' technique during thyroidectomy. *World J Surg*. 2011;35:773.
36. Barczyński M, Konturek A, Cichoń S. Randomized clinical trial of visualization versus neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves during thyroidectomy. *Br J Surg*. 2009;96(3):240–6.
37. Cirocchi R, Arezzo A, D'Andrea V, et al. Intraoperative neuromonitoring versus visual nerve identification for prevention of recurrent laryngeal nerve injury in adults undergoing thyroid surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;1:CD012483.
38. Nouraei SAR, Allen J, Kaddour H, et al. Vocal palsy increases the risk of lower respiratory tract infection in low-risk, low-morbidity patients undergoing thyroidectomy for benign disease: A big data analysis. *Clin Otolaryngol*. 2017;42(6):1259–1266.
39. Dobrinja C, Troian M, Cipolat-Mis T, et al. Rationality in prophylactic central neck dissection in clinically node-negative (cN0) papillary thyroid carcinoma: Is there anything more to say? A decade experience in a single-center. *Int J Surg*. 2017;41 Suppl 1:40–47.
40. Godballe C, Madsen AR, Sørensen CH, et al. Risk factors for recurrent nerve palsy after thyroid surgery: a national study of patients treated at Danish departments of ENT Head and Neck Surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271(8):2267–76.

41. Chen L, Wu YH, Lee CH, Chen HA, Loh EW, Tam KW. Prophylactic Central Neck Dissection for Papillary Thyroid Carcinoma with Clinically Uninvolved Central Neck Lymph Nodes: A Systematic Review and Meta-analysis. *World J Surg.* 2018;42(9):2846–2857.
42. Pattou F, Combemale F, Fabre S, et al. Hypocalcemia following Thyroid Surgery: Incidence and Prediction of Outcome. *World J Surg.* 1998;22(7):718–724.
43. Jessie WU, Harrison B. Hypocalcemia after Thyroidectomy: The Need for Improved Definitions. *World J Endoc Surg.* 2010;2(1):17–20.
44. Mehanna HM, Jain A, Randeve H, Watkinson J, Shaha A. Postoperative hypocalcemia -the difference a definition makes. *Head Neck.* 2010;32(3):279–83.
45. Debry C, Schmitt E, Senéchal G, Silisté CD, Quevauvilliers J, Renou G. Analysis of thyroid surgery: recurrent paralysis et hypoparathyroidism. On a series of 588 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1995;112(5):211–7.
46. Lee YS, Chang HS, Chung WY, Nam KH, Park CS. Relationship between onset of hypocalcemic symptoms and the recovery time from transient hypocalcemia after total thyroidectomy. *Head Neck.* 2014;36(12):1732–6.
47. Lorenz K, Elweir M, Dralle H. Postthyroidectomy hypocalcemia: the earlier it appears the longer it persists. *Chirurg.* 2015;86(3):286.
48. Winer KK, Ko CW, Reynolds JC, et al. Long-term treatment of hypoparathyroidism: a randomized controlled study comparing parathyroid hormone-(1-34) versus calcitriol and calcium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4214–4220.
49. Rubin MR, Sliney J, McMahon DJ, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Therapy of hypoparathyroidism with intact parathyroid hormone. *Osteoporos Int.* 2010;21:1927–1934.
50. Sikjaer T, Rejnmark L, Rolighed L, Heickendorff L, Mosekilde L et Hypoparathyroid Study Group. The effect of adding PTH (1-84) to conventional treatment of hypoparathyroidism: a randomized, placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* 2011;26:2358–2370.
51. Cusano NE, Rubin MR, McMahon DJ, et al. Therapy of hypoparathyroidism with PTH (1-84): a prospective four-year investigation of efficacy and safety. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:137–144.
52. Shoback D. Clinical practice. Hypoparathyroidism. *N Engl J Med.* 2008;359:391–403.
53. Guerrero MA. Cryopreservation of parathyroid glands. *Int J Endocrinol.* 2010;2010:829540.
54. Selberherr A, Scheuba C, Riss P, Niederle B. Postoperative hypoparathyroidism after thyroidectomy: efficient and cost-effective diagnosis and treatment. *Surgery.* 2015;157:349–353.
55. Giordano D, Valcavi R, Thompson GB. Complications of central neck dissection in patients with papillary thyroid carcinoma: results of a study on 1087 patients and review of the literature. *Thyroid.* 2012;22:911–917.
56. Lee YS, Kim SW, Kim SW, et al. Extent of routine central lymph node dissection with small papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2007;31:1954–1959.
57. Cichoń S, Anielski R, Orlicki P, Krzesiwo-Stempak K. Krwotok po operacji wola. *Przeegl Lek.* 2002;59:489–492.
58. Promberger R, Ott J, Kober F, Koppitsch C, Seemann R, et al: Risk factors for postoperative bleeding after thyroid surgery. *Br J Surg.* 2012; 99: 373-379.
59. Campbell MJ, Mc Coy KL, Shen WT, Carty SE, Lubitz C, et al: A multi-institutional international study of risk factors for hematoma after thyroidectomy. *Surgery* 2013; 154: 1283-1291.
60. Shindo M, Stern A. Total thyroidectomy with and without selective central compartment dissection: a comparison of complication rates. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 136(6): 584-7.
61. Dehal A, Abbas A, Hussain F, Johna S. Risk factors for neck hematoma after thyroid or parathyroid surgery: ten-year analysis of the nationwide inpatient sample database. *Perm J.* 2015; 19(1): 22-8.
62. Suzuki S, Yasunaga H, Matsui H, Fushimi K, Saito Y, Yamasoba T. Factors Associated With Neck Hematoma After Thyroidectomy: A Retrospective Analysis Using a Japanese Inpatient Database. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(7):e2812.
63. Bergenfelz A, Jansson S, Kristoffersson A, et al. Complications to thyroid surgery: results as reported in a database from a multicenter audit comprising 3,660 patients. *Langenbecks Arch Surg.* 2008;393:667–673.
64. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Handbook From the AJCC Cancer Staging Manual*, 7th edn. New York Dordrecht Heidelberg London: Springer 2010; ch. 8, pp. 88-96.

**ORCID i wkład pracy autorów**Jarosław Świrta – 0000-0001-6353-0162 <sup>A,B,C,D,E,F</sup>Michał Romaniszyn – <sup>A,B,C,D</sup>Marcin Barczyński <sup>A,B,C,D,E,F</sup>**Konflikt interesów**

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

**AUTOR KORESPONDUJĄCY**

Jarosław Szymon Świrta

ul. Kuźnicy Kołłątajowskiej 16a/35, 31-234 Kraków, Polska

tel.: 502 182 963

e-mail: swirtaszymon@gmail.com

Nadesłano: 07.01.2020

Zaakceptowano: 20.03.2020

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article

## Expression of micro-ribonucleic acids in thyroid nodules and serum to discriminate between follicular adenoma and cancer in patients with a fine needle aspiration biopsy classified as suspicious for follicular neoplasm: A preliminary study

Jarosław Szymon Świrta<sup>1,A–D,F</sup>, Gracjan Wątor<sup>2,A–D,F</sup>, Michał Seweryn<sup>2,C,D,F</sup>, Przemysław Kapusta<sup>2,C,D,F</sup>, Marcin Barczyński<sup>3,A,D–F</sup>, Paweł Wołkow<sup>2,C,E,F</sup>

<sup>1</sup> Department of Thoracic Surgery, Pulmonary Hospital, Zakopane, Poland

<sup>2</sup> Center for Medical Genomics OMICRON, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

<sup>3</sup> Department of Endocrine Surgery, Third Chair of General Surgery, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Advances in Clinical and Experimental Medicine, ISSN 1899–5276 (print), ISSN 2451–2680 (online)

Adv Clin Exp Med. 2023

### Address for correspondence

Jarosław Szymon Świrta  
E-mail: slash25ter@gmail.com

### Funding sources

None declared

### Conflict of interest

None declared

Received on January 28, 2022

Reviewed on March 29, 2022

Accepted on January 28, 2023

Published online on March 10, 2023

### Cite as

Świrta JS, Wątor G, Seweryn M, Kapusta P, Barczyński M, Wołkow P. Expression of micro-ribonucleic acids in thyroid nodules and serum to discriminate between follicular adenoma and cancer in patients with a fine needle aspiration biopsy classified as suspicious for follicular neoplasm: A preliminary study [published online as ahead of print on March 10, 2023]. *Adv Clin Exp Med*. 2023. doi:10.17219/acem/160003

### DOI

10.17219/acem/160003

### Copyright

Copyright by Author(s)

This is an article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

## Abstract

**Background.** Approximately 10% of thyroid nodules undergoing fine needle aspiration biopsy (FNAB) receive a suspicious for follicular neoplasm (SFN) classification. Currently, there is no diagnostic tool to preoperatively discriminate between follicular adenoma (FA) and thyroid cancer (TC), and most patients require surgery to exclude malignancy.

**Objectives.** To characterize the micro-ribonucleic acid (miRNA) signature of tumors assessed as SFN and define circulating miRNA patterns to distinguish FA from follicular cancer in patients with thyroid nodules biopsied using FNAB.

**Materials and methods.** The study included excised tumor and thyroid tissue samples from 80 consecutive patients collected by a pathologist in the operating theater. The miRNA was isolated from specimens at the Center for Medical Genomics OMICRON, and next-generation sequencing (NGS) was used to obtain target miRNAs. In addition, miRNA expression was detected in serum using polymerase chain reaction (PCR).

**Results.** Well-differentiated thyroid cancer (WDTC) samples had significantly higher expression levels of hsa-miR-146b-5p ( $p = 0.030$ ) and hsa-miR-146b-3p ( $p = 0.032$ ), while the expression levels of hsa-miR-195-3p were significantly lower ( $p = 0.032$ ) in WDTC samples compared to FA specimens. The serum of TC patients showed markedly higher expression of the unique miRNA hsa-miR-195-3p ( $p = 0.039$ ).

**Conclusions.** The overexpression of hsa-miR-146b-5p and hsa-miR-146b-3p, and the downregulation of hsa-miR-195-3p expression could be used as biomarkers to distinguish FA from WDTC in patients with FNAB results classified as Bethesda tier IV. In addition, hsa-miR-195-3p could act as a serum biomarker for differentiating patients with FA from those with WDTC, and preoperative measurement of its expression would help avoid unnecessary surgeries. However, this concept needs further verification in a more substantial prospective study.

**Key words:** thyroid cancer, follicular adenoma, suspicious for follicular neoplasm, next-generation sequencing

## Background

Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine malignancy. It accounts for more than 95% of endocrine cancers. Over the last 3 decades, the incidence of TC in the USA has been growing rapidly and has increased 2.3 fold.<sup>1,2</sup> Much of this rise appears to be due to more sensitive diagnostic procedures, such as computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), often undertaken for unrelated medical problems. These modalities can detect small incidental thyroid nodules that might have gone undetected previously. The death rate for TC slightly increased from 2009 to 2018 (0.6% per year), though it appears to have stabilized in recent years. Nonetheless, there were more than 4100 new cases of TC diagnosed in Poland in 2018, which resulted in 338 deaths.<sup>3</sup>

Thyroid nodules are highly prevalent and occur in up to 65% of the healthy adult population.<sup>4</sup> Ultrasound (US) is currently the best detection tool available for the initial work-up of thyroid nodules, and the primary goal of thyroid US examination is to discriminate benign nodules from lesions comprising malignant features that require advanced diagnostics.<sup>5,6</sup> Particular sonographic features of thyroid nodules associated with a high risk of malignancy include microcalcifications, irregular margins, absence of elasticity, and a taller-than-wide shape.<sup>7–10</sup> Nevertheless, no US feature can efficiently detect or disregard malignancy.<sup>11–14</sup>

The main examination in preoperative diagnostics of thyroid nodules is fine needle aspiration biopsy (FNAB), which has an accuracy of >95%. Fine needle aspiration biopsy demonstrates benign cytological features in more than half of the cases (60–70%), and the risk of malignancy in less than 3%.<sup>15–19</sup> Recent retrospective studies at high-volume centers revealed TC in 3–15% of biopsies.<sup>20–22</sup> Despite high confidence levels, up to 30% of FNABs are reported as indeterminate and unsatisfactory in terms of certainty for malignancy.<sup>23–25</sup>

The malignancy rate increases to 40% in nodules verified as suspicious for follicular neoplasm (SFN), also known as Bethesda tier IV. Indeterminate cytopathology often requires diagnostic surgery for a definitive diagnosis, based on the presence of tumor cells within the lumen of blood vessels or tumor capsular invasion.<sup>26</sup> On the contrary, patients undergoing thyroid lobectomy for an indeterminate biopsy may require completion surgery if the final pathological report confirms cancer.

Significant efforts have been made to combine FNAB results with immunocytochemical and molecular markers, clinical information, and ultrasonography to enhance the accuracy of thyroid biopsies.<sup>27–32</sup> Numerous mutations have been analyzed for their applicability to FNAB diagnosis in different settings,<sup>33–36</sup> though there is not enough confidence in the results for this approach to be widely implemented in clinical practice.

Several studies have appraised the potential of micro-ribonucleic acids (miRNAs) as diagnostic markers for TC.

These tiny noncoding molecules are endogenous, single-stranded and highly conserved, with lengths ranging from 18 to 25 nucleotides. Furthermore, miRNAs are involved in many biological and pathological processes, including proliferation, differentiation and apoptosis, and can alter gene expression at the post-transcriptional messenger RNA (mRNA) level. In addition, miRNAs are very stable and remain intact in tissues, whether fresh, frozen or formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE),<sup>37</sup> a property exploited in the development of several commercially available miRNA-based molecular tests.<sup>38,39</sup> Moreover, miRNAs have demonstrated influence on the activity of TC-related signaling pathways such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the *RET* gene.<sup>40</sup>

The hypothesis explored in this pilot study was that miRNA signatures in malignant tumors assessed as SFN using FNAB differ from signatures in benign tumors, and circulating miRNA distinguishes between the 2 tumor types.

## Objectives

The purpose of this study was twofold and included characterizing the miRNA signature of tumors assessed as SFN and defining circulating miRNA patterns in order to distinguish follicular adenoma (FA) from follicular cancer in patients with thyroid nodules verified as SFN using FNAB.

## Materials and methods

### Patients

This noninterventional study included 80 consecutive patients operated on in the Department of Endocrine Surgery (Third Chair of General Surgery, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland) between January 2016 and October 2018. The indication for surgery was an FNAB result of SFN. Patient baseline demographic and clinical characteristics were extracted from de-identified patient history, physical examination records, US, and pathology reports. This information included patient age, gender, tumor size, presence of Hashimoto's disease, and an aggregate of increased malignancy risk factors, including tumor phenotype based on preoperative US malignancy risk stratification using the European Thyroid Imaging and Reporting Data System (EU-TIRADS) classification.

Blood samples were drawn in the operating theater before the skin incision and were transferred immediately to the Center of Medical Genomics OMICRON of Jagiellonian University Medical College.

An experienced pathologist excised specimens from the tumor and normal thyroid tissues in the operating theater, with samples of normal thyroid tissue obtained

from the contralateral thyroid lobe. The specimens were immediately placed into RNAlater<sup>®</sup> (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. Based on histopathological examination, patients were assigned to TC (study group) or FA (control group) group matched for age, sex and body mass index (BMI). All TC patients and 14 FA patients were eligible for further analysis of complete clinical data and uncontaminated serum samples with detectable miRNA.

All participants provided written informed consent on the day of recruitment. The Institutional Review Board (Bioethical Committee of Jagiellonian University, Kraków, Poland) approved the study (approval No. 122.6120.17.2016 granted on January 28, 2016), which adhered to the Declaration of Helsinki.

### RNA extraction

The extraction of tumor RNA from 50–100 mg of disrupted tissue using TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) with zirconium beads (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) and RNazol<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) resulted in an RNA fraction of less than 200 base pairs (bps) long. The quality and concentration of RNA were determined using TapeStation (Agilent, Santa Clara, USA) and NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), respectively. The RNA was extracted from 0.5 ml of serum using the total RNA protocol provided by RNazol<sup>®</sup>.

### Next-generation sequencing

A next-generation sequencing (NGS) library was generated using 100 ng of small RNA. After adapter ligation (NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina; New England Biolabs, Ipswich, USA), the library was enriched using polymerase chain reaction (PCR) (12 cycles), and the size was selected using BluePippin (Sage Science, Beverly, USA) to cut out 141-bp fragments. In total, 48 samples were multiplexed and individually barcoded. The pooled library was run on NextSeq 500 (Illumina, San Diego, USA) using 75 cycles and a single read mid-output cartridge, with the addition of an artificial PhiX library (Illumina) at a final concentration of 20%.

### Bioinformatics pipeline

A local server housed raw miRNA reads. The bioinformatics pipeline and miRNA identification were previously described.<sup>41</sup> The reads were de-multiplexed based on the 5'-nucleotide barcode sequence at the beginning of the read, and FastQC software (Illumina)<sup>42</sup> was used to assess read quality, with adapters removed at the 3' end using Cutadapt (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>).<sup>43</sup> For quality purposes, all reads with a length below 15 nucleotides or without an adapter were removed. The cleaned reads were then aligned using miRBase 22.1<sup>44</sup>

and counted using miRDeep2 software.<sup>45</sup> The raw counts were normalized for library size using miRDeep2 software and represented as counts per million (CPM) for use in further analysis.

Multidimensional scaling (MDS) used miRNA read counts normalized for library size and outlier selection based on dimensions 1 and 2 (Fig. 1).

### Quantitative polymerase chain reaction

Confirmation of the presence of the most reliable miRNAs in serum was performed using quantitative PCR (qPCR) with SYBR Green intercalating dye (Qiagen/Exiqon, Vedbæk, Denmark). Briefly, 5  $\mu\text{L}$  of total RNA underwent reverse transcription (RT) using the miRCURY<sup>™</sup> LNA<sup>™</sup> Universal RT miRNA PCR system (Qiagen/Exiqon). The generated complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) was diluted 30 times and applied in triplicate to the qPCR reaction, with a specific primer set and spike-in standard (reference gene: *U1N1SP6*), using the CFX384 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Singapore) and a standard Exiqon protocol.

### Ultrasound malignancy risk assessment

The risk of malignancy index was derived from a mean value of clinical factors listed in the Guidelines of Polish National Societies Diagnostics and Treatment of Thyroid Carcinoma and sonographic features according to EU-TIRADS for each group.<sup>46,47</sup> Patients received 1 point for the presence of each clinical risk factor and from 2 to 5 points for the US risk category. Clinical risk factors included lymph node metastases, distant metastases, history of previous neck exposure to radiation, rapid tumor growth, a hard thyroid nodule fixated to surrounding tissues, tumor >4 cm in diameter, nodule occurrence before 20 years of age, nodule occurrence after 60 years of age, and paresis of recurrent laryngeal nerves, particularly the unilateral nerves. The EU-TIRADS categories are presented in Table 1.

### Statistical analyses

Phenotype data were analyzed statistically using Statistica v. 13.0 software (TIBCO Software, Palo Alto, USA). The  $\chi^2$  test of independence was applied to determine if a dataset was well-modeled by a normal distribution. Data did not follow a normal distribution. Therefore, mean, median and range values were calculated. Mann–Whitney U tests and the Fisher's exact tests were used to determine statistical significance, as appropriate. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Statistical and exploratory analyses of miRNome data used the limma package in R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).<sup>48</sup> The CPM values of miRNA expressions were graphed on a two-dimensional scatterplot to find and remove outliers (Supplementary Fig. 1), which included miRNAs with low CPM values (median below



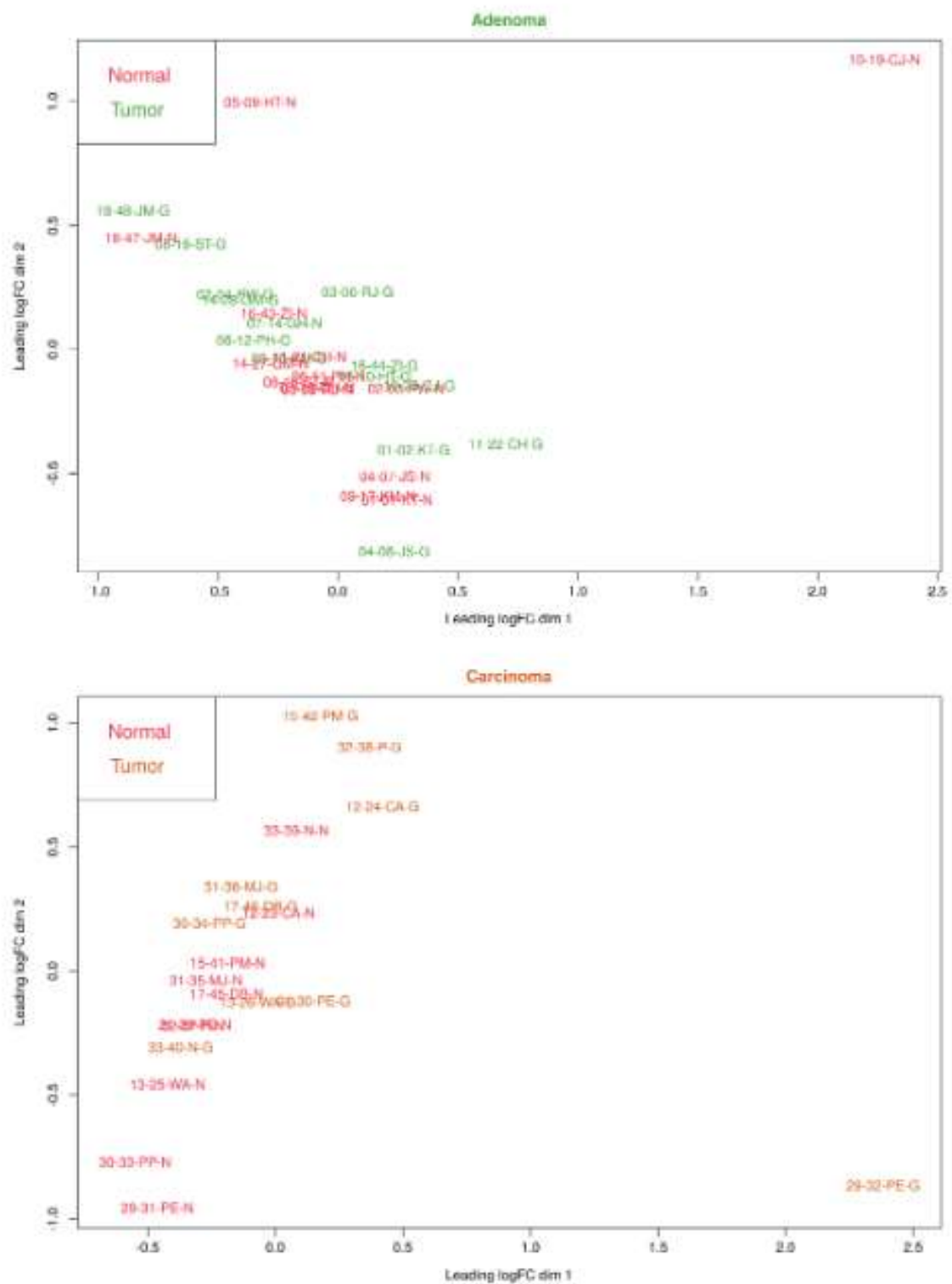


Fig. 1. Multidimensional scaling analysis of adenomas and carcinomas.

**Table 1.** EU-TIRADS categories and risk of malignancy

Category	US features	Malignancy risk (%)
EU-TIRADS 1: normal	no nodules	none
EU-TIRADS 2: benign	pure cyst entirely spongiform	0
EU-TIRADS 3: low risk	ovoid, smooth isoechoic/hyperechoic no features of high suspicion	2-4
EU-TIRADS 4: intermediate risk	ovoid, smooth, mildly hypoechoic no features of high suspicion	6-17
EU-TIRADS 5: high risk	at least 1 of the following features of high suspicion: irregular shape irregular margins microcalcifications marked hypoechogenicity (and solid)	26-87

EU-TIRADS – European Thyroid Association Thyroid Imaging and Reporting Data System; US – ultrasound.

included miRNAs with low CPM values (median below 5 reads). Values were then log-transformed using the voom function. The duplicateCorrelation function created gene-wise mean cell models, and, since the study contained paired samples (tumor and healthy tissue samples from the same patient), patientID randomization generated block variables. The lmFit function was applied for each gene to fit the linear model, and a contrast matrix was created for individual comparisons. Control of the false discovery rate of multiple testing was performed using the Benjamini–Hochberg correction method. Quality measures of the regression model are presented in Supplementary Table 1. Diagnostics plots (voom function plot) for routine check mean-variance relationships of the count data after linear model fitting are shown in Supplementary Fig. 2.

Genes with significant differential serum expression between FA and well-differentiated thyroid cancer (WDTC) patients were processed using GenEx software (MultiD Analyses AB, Gothenburg, Sweden). Raw quantification cycle (Cq) values were prepared according to protocol by removing missing data and applying an efficiency correction. The following steps included sample amount normalization, the calculation of qPCR replicate mean values and log<sub>2</sub> transformation to relative quantities.

The tests were performed as moderated t-statistics, assuming moderated standard errors across genes and effectively borrowing information from the ensemble of genes. In most cases, the distribution of gene expression data was normal, and this assumption still holds for certain technologies such as microarrays and qPCR. Regardless, the limma package used log-CPM values (log<sub>2</sub> of counts per million), for which the normal distribution is assumed. The mean-variance relationship was accounted for using precision weights calculated using the voom function.<sup>48</sup> The analysis followed all transformations recommended as necessary by the package developers (conf. Supplementary Fig. 2). The variance dropped at the low end of the expression scale due to very small counts.<sup>49</sup> Nonetheless, the output was interpreted as a typical voom plot, with a decreasing trend towards higher expression genes (count size) and a very high level

of biological variation.<sup>50</sup> Genes with significant differential serum expression between FA and well-differentiated thyroid cancer (WDTC) patients were processed using GenEx software (MultiD Analyses AB, Gothenburg, Sweden). Raw quantification cycle (Cq) values were prepared according to protocol by removing missing data and applying an efficiency correction. The following steps included sample amount normalization, the calculation of qPCR replicate mean values and log<sub>2</sub> transformation to relative quantities. After the normalization of the relative quantities against serum level (each patient provided the same volume of serum for miRNA isolation), the differences between the FA and WDTC groups were analyzed using Student's t-test.

## Results

### Group characteristics

Pathology reports determined the final diagnoses in cases that underwent total thyroidectomy or thyroid lobectomy. There were no significant differences between the characteristics of both groups, and no patient had a family history of TC. The characteristics of study cohort are shown in Table 2. The WDTC was diagnosed in 10 patients, though there were no significant differences in clinical features or EU-TIRADS scale stratification between the groups. Thyroid nodule phenotypes classified according to EU-TIRADS and pathology reports are presented in Supplementary Table 2.

### Exploratory analysis of miRNA profiles

Matched tumor and healthy samples were sequenced in 1 NextSeq run. A total of 48 samples were multiplexed, which resulted in over 130 million reads (130857304), with a mean of 2,726,194 reads per sample. Alignment to miRBase identified 1610 miRNA transcripts with at least 5 read genes expressed. The most abundant transcript was miR-26a with 16.6 million reads (7.87%).

Table 2. Characteristics of the groups

Category	FA, n = 14 (range; median)	WDTC, n = 10 (range; median)	p-value
Female/male cases	12/2	9/1	0.066 (FisH)
Mean age [years]	55.7 (30–80; 60)	51.4 (37–71; 49.5)	0.371 (U-MW)
Presence of Hashimoto's disease [%]	5/9	3/7	0.166 (FisH)
Tumor diameter [mm]	16.21 (6–40; 15)	12.75 (5.5–25; 9.5)	0.114 (U-MW)
Index of malignancy risk of thyroid tumor (EU-TIRADS)	4.57	4.5	0.593 (U-MW)

EU-TIRADS – European Thyroid Association Thyroid Imaging and Reporting Data System; FA – follicular adenoma; WDTC – well-differentiated thyroid cancer; FisH – Fisher's exact test; U-MW – Mann-Whitney U test. This table shows characteristics of the group with FA and the group with thyroid cancer. In case of nominal variables (sex and presence of Hashimoto's disease), Fisher's exact test has been applied. The distribution of quantitative variables was determined using  $\chi^2$  test of independence. The p-value has been calculated using Mann-Whitney U test.

Table 3. Differential expression miRNAs between FA and WDTC samples

miRNA	Precursor	logFC	AveExpr	p-value	adj. p-value
miR-146b-5p	mir-146b	3.16	11.25	0.000078	0.031
miR-195-3p	mir-195	-1.36	5.41	0.00022	0.032
miR-146b-3p	mir-146b	3.03	4.87	0.00024	0.032

FA – follicular adenoma; WDTC – well-differentiated thyroid cancer. Table presents 3 significant differentially expressed (DE) miRNAs between studied groups with annotation of fold change (logFC), average expression (AveExpr), p-value, and adjusted p-value (adj. p-value). The analysis of DE miRNAs was conducted using limma package in R with Benjamini-Hochberg correction method.

of malignancy sum (number 4) among the entire cohort. Four mean-variance graphs corresponding to miRNA signature analysis were plotted separately for adenoma and carcinoma (Supplementary Fig. 2A,B), as were findings on genes differentially expressed between the 2 groups (Supplementary Fig. 2C,D). A high level of biological variation was evident in both groups due to patient differences.

### Follicular adenoma and well-differentiated thyroid cancer miRNA signatures: the analysis of matched tumor and healthy samples

The primary analysis determined the miRNA signatures of the FA and WDTC separately, using the healthy samples as a baseline. Compared to the healthy tissue, FA samples had 9 differentially expressed miRNAs. At the same time, 20 miRNAs were differentially expressed in the WDTC tissue compared to the healthy samples (Fig. 2 and Supplementary Table 3). Interestingly, the downregulation of 1 miRNA only, miR-873-5p, was shared between the FA and WDTC signatures.

### Differential miRNA expression in follicular adenoma and well-differentiated thyroid cancer samples

The main purpose of this study was to identify differences between FA and WDTC. In this regard, the expression levels of miR-146b-5p ( $p = 0.031$ ) and miR-146b-3p ( $p = 0.034$ ) were significantly higher in patients with WDTC than in those with FA. At the same time, miR-195-3p ( $p = 0.032$ )

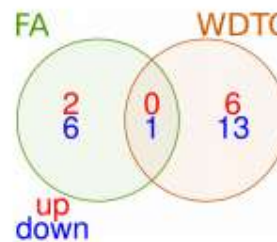


Fig. 2. Venn diagram of the upregulated, downregulated and overlapping miRNAs in follicular adenomas (FA) and well-distinguished thyroid cancer (WDTC)

expression was significantly lower in patients with WDTC than in those with FA (Table 3, Fig. 3).

### Validation of main findings using The Cancer Genome Atlas data

External data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) were used to validate the study findings. However, the TCGA repository lacked FA data, and the analysis was limited to papillary thyroid carcinoma (PTC) (follicular type: 14 tumors and matched healthy controls; classical type: 114 tumors and matched healthy controls). The miRNA signatures were determined using healthy tissue samples as a baseline, and the comparison to the current study cohort provided a WDTC signature with 20 significant miRNAs. The analysis of the data extracted from TCGA used methods identical to the current study and resulted in the identification of 188 significant miRNAs (Supplementary Table 4), from which the 2<sup>nd</sup> most significant hit was miR-146b, and the 15<sup>th</sup> most significant was miR-195. Overall, the WDTC signature had a 90% overlap (18 of 20 miRNAs) with the TCGA signature. Moreover,

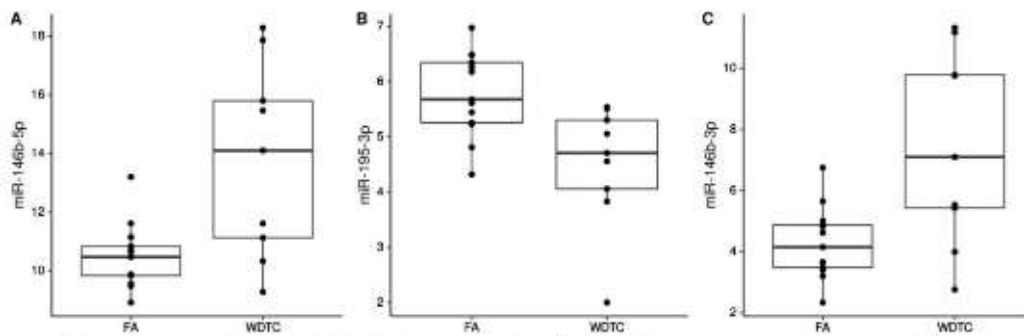


Fig. 3. Differential expression of 3 miRNA acids in follicular adenoma (FA) and well-distinguished thyroid cancer (WDTC) patient tissues. The differentially expressed miRNAs were miR-146b-5p (A), miR-195-3p (B) and miR-146b-3p (C).

the direction of change (upregulation or downregulation) matched perfectly, and the first hit in both cohorts was miR-221.

### Serum expression of miR-195

The presence of miR-195 was confirmed in serum using qPCR. The WDTC patients had higher expression levels (log fold change: 4.13,  $p = 0.039$ ) of circulating hsa-miR-195-3p than FA patients, contrary to findings of tissue miRNA expression analysis (Fig. 4). However, the serum analysis of the WDTC group used only 3 samples.

### Discussion

The current study evaluated miRNA signatures in patients with indeterminate FNAB cytology (Bethesda tier IV). According to the literature, such an approach has not been used in a clinical setting before. The miRNA signature in surgically excised specimens differed between

WDTC and FA patients. Indeed, the differential expression analysis between these groups highlighted 3 miRNAs (146b-5p, 146b-3p, 195-3p) which could act as biomarkers for thyroid malignancy testing.

Due to the absence of specific US features that can definitively predict malignancy, a standardized system for reporting US features, TIRADS, was developed<sup>54</sup> in 2009 by Horvath et al. and Park et al.<sup>52,53</sup> In 2017, the European Thyroid Association created the new and simplistic EU-TIRADS, in which classified scores stratify thyroid lesions in adults according to the risk of malignancy into benign, low-risk, intermediate-risk, and high-risk.<sup>47,52,53</sup> The current EU-TIRADS evaluates 5 lesion patterns and classifies the nodules into 1 of the 5 categories based on the number of suspicious features.

The NGS-based miRNA profiling is very sensitive and detects samples with different phenotypes (see outliers in Fig. 1). Numerous miRNA profiles have also been reported in distinct cancer types.<sup>54</sup> Recent studies demonstrated miRNA extraction from blood, urine and saliva samples,<sup>55,56</sup> and their expression levels provide information about ongoing physiological and pathological conditions.<sup>56</sup> This study differentiated between FA and WDTC based on 3 miRNAs, namely miR-146b-5p, miR-146b-3p and miR-195-3p.

The molecule miRNA-195 engages in various malignant cellular processes via complex mechanisms, including proliferation, apoptosis, invasion, angiogenesis, and metastasis. Indeed, the molecule may be involved in various signaling pathways, such as retinoblastoma-early region 2 binding factor (Rb-E2F) and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AK).<sup>57</sup> In a study by Wang et al., miR-195 was downregulated in thyroid tumor tissues. Moreover, the proto-oncogene *Raf1* is a target of miR-195, although its regulatory mechanisms are unclear.<sup>58-60</sup> In addition, the overexpression of miR-195 markedly suppressed the growth of TC cells.<sup>57,61</sup> The current study demonstrated the differential expression of hsa-miR-195-3p in tumor and thyroid tissues, which was also demonstrated in PCR analysis of serum samples.

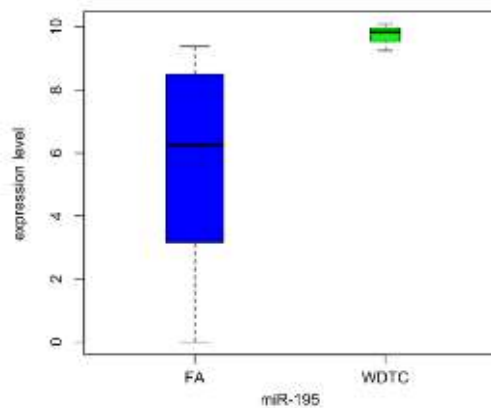


Fig. 4. Serum expression of miRNAs in follicular adenoma (FA) and well-distinguished thyroid cancer (WDTC) patients

The miRNA-146b plays a role in post-transcriptional gene silencing,<sup>62,63</sup> and its expression demonstrated a disparity between PTC tissue and normal thyroid tissue.<sup>64–66</sup> At the same time, several studies have implicated miRNA-146b dysregulation in the different variants of PTC, and recent investigations have revealed that diversity in miRNA-146b expression may be associated with advanced malignant tumor characteristics,<sup>67–69</sup> including extrathyroidal invasion and metastases by suppressing interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (*IRAK1*) expression.<sup>70,71</sup> In addition, other thyroid neoplasms such as follicular thyroid carcinoma (FTC) and poorly differentiated thyroid cancer (PDTC) encompass miR-146b, and its expression in these subtypes of TC has been described.<sup>72</sup>

The crucial point of this study was to confirm differences in miRNA expression between FA and WDTC tissues and matched serum. Among the 3 identified miRNAs, only miR-195-3p was expressed in serum, and its levels were higher in TC patients. However, the results should be interpreted carefully due to the low number of patients in both groups. There was a paradoxical hsa-miR-195-3p expression pattern between tissue and serum, as it was upregulated in serum and downregulated in the tissue of patients with WDTC compared to FA patients. A similar phenomenon has been documented in studies on other cancer variants.<sup>73–75</sup>

The precise mechanisms of miRNA release into the extracellular environment remain only partially explored. According to one hypothesis, damaged cells release miRNAs via microvesicles or directly through different types of proteins.<sup>76–79</sup> Another potential mechanism suggests that extracellular miRNAs originate from immunocytes in the tumor microenvironment.<sup>80</sup>

The focus of studies has shifted to altered miRNA expression in PTC, as FTC prevalence has decreased in recent decades.<sup>81</sup> The current study concentrated on discriminating between miRNAs in FA and FTC, though PTC occurred 4 times more frequently than FTC. Consequently, identifying miRNAs independently associated with PTC and FTC was impeded. Nonetheless, from our clinical experience in the surgical treatment of thyroid disorders, distinguishing between PTC and FTC in thyroid nodules verified as SFN is not obligatory. Also, the most recent recommendations for TC treatment allow to resign from elective central neck dissection in low-risk patients, including those with tumor size up to 4 cm. Indeed, differentiating FA from WDTC should be sufficient to apply an appropriate treatment.<sup>46,82</sup>

Detection of circulating miRNAs may be a useful diagnostic tool for TC. Circulating miRNAs appear to be a more promising biomarker than other RNAs due to their serum stability and tissue specificity. In this regard, serum-based identification of miRNAs released from the tumor during disease progression could lead to early cancer detection. The expression of miRNAs varies at different stages of malignant disease. Therefore, evaluating serum miRNA levels after thyroid resection may be a viable noninvasive patient follow-up method.<sup>83</sup> As such, improved standardization

of methods used to assay circulating miRNAs may result in an optimal miRNA diagnostic biomarker. In addition, miRNAs could become a promising strategy in cancer research, as several studies have demonstrated the silencing of overexpressed miRNAs and their downregulation using synthetic oligonucleotides.<sup>84–90</sup>

Next-generation sequencing miRNA profiling provides time- and pathophysiological state-specific miRNome information. As such, miRNA expression is an obvious biomarker, and a systems biology approach can delve deeper into the molecular pathophysiology of certain types of cancer and benign lesions. For example, the current study found miRNA upregulation in WDTC related to interleukin-7 (*IL-7*) regulation processes involving 2 genes, *IL-7* receptor (*IL7R*) and *IL-2* receptor subunit gamma (*IL2RG*). So far, no studies have described *IL7R* in the context of WDTC, although its connection with other thyroid pathologies, such as thyroid lymphoma and thymoma, has been demonstrated.<sup>91,92</sup> Therefore, the *IL7R* gene is a potential marker for differentiating FA from WDTC.

A literature search found no studies demonstrating differences in miRNA expression in thyroid nodules verified as SFN. Here, a set of 3 miRNAs were found, as was the differential serum expression of 1 miRNA in patients with SFN biopsy results. Further studies encompassing larger groups of patients are needed to verify these differential expression patterns. Hopefully, molecular diagnosis based on circulating miRNA will avoid unnecessary surgeries or even FNAB.

## Limitations

The study was limited by the low number of WDTC samples. It assessed and evaluated only 2 FTC patients due to low FTC incidence. Of these 2 patients, MDS analysis led to the exclusion of one. The group of patients with benign FA lesions was more numerous and histopathologically homogeneous compared to the cancer patient group, which had 3 subtypes of WDTC. Also, sampling was limited to the population of Lesser Poland Voivodeship. As such, the conclusions do not apply to other populations due to genetic differences.

## Conclusions

Conclusions and future perspectives:

1. The FA and WDTC had different miRNA signatures, with only miR-873 overlapping.
2. Three miRNAs, namely 146a, 146b and 195, could be used to diagnose patients as SFN.

## Supplementary files

The supplementary files are available at <https://doi.org/10.5281/zenodo.7576125>. The package contains the following files:

Supplementary Table. Pearson's  $\chi^2$  test results.

Supplementary Table 1. Measure of the quality of the regression model.

Supplementary Table 2. Phenotype of thyroid nodules according to EU-TIRADS scoring as well as pathology reports.

Supplementary Table 3. The miRNAs differentiate FA and WDTC from normal tissue.

Supplementary Table 4. Analysis of data extracted from TCGA compared with results obtained as a signature of 188 significant miRNAs.

Supplementary Fig. 1. Multidimensional scaling analysis.

Supplementary Fig. 1A. MDS\_tumor.

Supplementary Fig. 1B. MDS\_group.

Supplementary Fig. 1C. MDS\_WDTC.


Supplementary Fig. 1D. MDS\_FA.


Supplementary Fig. 2. Mean-variance trend of log-CPM values of data on adenoma and carcinoma.


#### ORCID iDs


Jarosław Szymon Swirta  <https://orcid.org/0000-0002-6031-8550>

Grażjan Wątor  <https://orcid.org/0000-0003-0794-7275>

Michał Seweryn  <https://orcid.org/0000-0002-9090-3435>

Przemysław Kapusta  <https://orcid.org/0000-0003-4467-1175>

Marcin Barczyński  <https://orcid.org/0000-0001-6062-1851>

Paweł Wolkow  <https://orcid.org/0000-0002-9322-5545>

#### References

- Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010;22(6):395–404. doi:10.1016/j.clon.2010.05.004
- Zevallos JR, Hartman CM, Kramer JR, Sturgis EM, Chiao EY. Increased thyroid cancer incidence corresponds to increased use of thyroid ultrasound and fine-needle aspiration: A study of the Veterans Affairs health care system. *Cancer*. 2015;121(5):741–746. doi:10.1002/cncr.29122
- Didkowska J, Wojciechowska U, Czaderny K, Olasek P, Ciuba A. *Najnowszy Złoty W Polsce 2017*. Warszawa, Poland: Centrum Onkologii-Instytut; 2019.
- Gharib H, Papini E, Garber JR, et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules – 2016 update. *Endocr Pract*. 2016;22(5):622–639. doi:10.4158/EP161208.GL
- Migda B, Migda M, Migda AM, et al. Evaluation of four variants of the thyroid imaging reporting and data system (TIRADS) classification in patients with multinodular goitre: initial study. *Endokrynol Pol*. 2015;69(2):156–162. doi:10.5603/EP.2018.0012
- Lee HJ, Yoon DY, Seo YL, et al. Intraobserver and interobserver variability in ultrasound measurements of thyroid nodules. *J Ultrasound Med*. 2018;37(1):173–178. doi:10.1002/jum.14316
- Burman KD, Wartofsky L. Thyroid nodules. *N Engl J Med*. 2015;373(24):2347–2356. doi:10.1056/NEJMc1415786
- Rago T, Vitti P. Risk stratification of thyroid nodules: From ultrasound features to TIRADS. *Cancers*. 2022;14(3):717. doi:10.3390/cancers14030717
- Trimboli P, Castellana M, Virili C, et al. Performance of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in assessing thyroid nodules: A systematic review and meta-analysis using histological standard of reference. *Radiol Med*. 2020;125(4):406–415. doi:10.1007/s11547-019-01129-2
- Kwak JY. Indications for fine needle aspiration in thyroid nodules. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013;28(2):81–85. doi:10.3803/EnM.2013.28.2.81
- Hoang JK, Middleton WD, Langer JE, et al. Comparison of thyroid risk categorization systems and fine-needle aspiration recommendations in a multi-institutional thyroid ultrasound registry. *J Am Coll Cardiol*. 2021;18(12):1605–1613. doi:10.1016/j.jacc.2021.07.019
- Brito JP, Gionfriddo MR, Al Nofal A, et al. The accuracy of thyroid nodule ultrasound to predict thyroid cancer: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):1253–1263. doi:10.1210/jc.2013-2928
- Remotti LR, Kramer CK, Leitão CB, Pinto LCF, Gross JL. Thyroid ultrasound features and risk of carcinoma: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Thyroid*. 2015;25(5):538–550. doi:10.1089/thy.2014.0353
- Campanella P, Ianni F, Rota CA, Corsello SM, Pontecorvi A. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R203–R211. doi:10.1530/EJE-13-0995
- Xu L, Zeng F, Wang Y, Bai Y, Shan X, Kong L. Prevalence and associated metabolic factors for thyroid nodules: A cross-sectional study in Southwest of China with more than 120 thousand populations. *BMC Endocr Disord*. 2021;21(1):175. doi:10.1186/s12902-021-00842-2
- Paskas S, Jankovic J, Zivaljevic V, et al. Malignant risk stratification of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology based on molecular testing. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(8):471–479. doi:10.1002/cncy.21554
- Yang X, Zhai D, Zhang T, Zhang S. Use of strain ultrasound elastography versus fine-needle aspiration cytology for the differential diagnosis of thyroid nodules: A retrospective analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2020;75:e1594. doi:10.6061/clinics/2020/e1594
- Valderrabano P, Mctver B. Evaluation and management of indeterminate thyroid nodules: The revolution of risk stratification beyond cytological diagnosis. *Cancer Control*. 2017;24(5):107327481772923. doi:10.1177/1073274817729231
- Faquin WC, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular patterned lesions of the thyroid: Diagnosis, management, and follow-up according to National Cancer Institute (NCI) recommendations. *Diagn Cytopathol*. 2010;38(10):731–739. doi:10.1002/dic.21292
- Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The diagnosis and management of thyroid nodules: A review. *JAMA*. 2018;319(9):914–924. doi:10.1001/jama.2018.0898
- Wong R, Farrell SG, Grossmann M. Thyroid nodules: Diagnosis and management. *Med J Aust*. 2018;209(2):92–98. doi:10.5694/mja17.01204
- Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med*. 2012;367(8):705–715. doi:10.1056/NEJMoA1203208
- Papanastasiou A, Sapalidis K, Goulis DG, et al. Thyroid nodules as a risk factor for thyroid cancer in patients with Graves' disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies in surgically treated patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;91(4):571–577. doi:10.1111/cen.14069
- Oczko-Wojciechowska M, Kotecka-Blicharz A, Krajewska J, et al. European perspective on the use of molecular tests in the diagnosis and therapy of thyroid neoplasms. *Gland Surg*. 2020;9(Suppl 2):S69–S76. doi:10.21037/gs.2019.10.26
- Lian L, Luo Y, Zhou M, et al. Comparison of diagnostic accuracy of thyroid cancer with ultrasound-guided fine-needle aspiration and core-needle biopsy: A systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:44. doi:10.3389/fendo.2020.00044
- Macerola E, Poma AM, Vignali P, et al. Molecular genetics of follicular-derived thyroid cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1139. doi:10.3390/cancers13051139
- Lamartina L, Grani G, Filetti S. Recent advances in managing differentiated thyroid cancer. *F1000Res*. 2018;7:86. doi:10.12688/f1000research.12811.1
- Wu D, Hu S, Hou Y, He Y, Liu S. Identification of potential novel biomarkers to differentiate malignant thyroid nodules with cytological indeterminate. *BMC Cancer*. 2020;20(1):199. doi:10.1186/s12885-020-6676-7
- Trimboli P, Virili C, Romanelli F, Crescenzi A, Giovannella L. Galectin-3 performance in histologic and cytologic assessment of thyroid nodules: A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1756. doi:10.3390/ijms18081756
- Zhao C, Zheng J, Sun L, Xu R, Wei Q, Xu H. BRAF<sup>V600E</sup> mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for diagnosis of thyroid nodules: The influence of false-positive and false-negative results. *Cancer Med*. 2019;8(12):5577–5589. doi:10.1002/cam4.2478
- Wang W, Chang J, Jia B, Liu J. The blood biomarkers of thyroid cancer. *Cancer Manag Res*. 2020;12:5431–5438. doi:10.2147/CMAR.S261170

30. Zhao C, Zheng J, Sun L, Xu R, Wei Q, Xu H. BRAF<sup>V600E</sup> mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for diagnosis of thyroid nodules: The influence of false-positive and false-negative results. *Cancer Med*. 2019;8(12):5577–5589. doi:10.1002/cam4.2478
31. Wang W, Chang J, Jia B, Liu J. The blood biomarkers of thyroid cancer. *Cancer Manag Res*. 2020;12:5431–5438. doi:10.2147/CMAR.S261170
32. Khan TM, Zeiger MA. Thyroid nodule molecular testing: Is it ready for prime time? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:590128. doi:10.3389/fendo.2020.590128
33. Zaballos MA, Santisteban P. Key signaling pathways in thyroid cancer. *J Endocrinol*. 2017;235(2):R43–R61. doi:10.1530/JOE-17-0266
34. Topf MC, Wang ZX, Tuluc M, Pribitkin EA. TERT, HRAS, and BRAF mutations in a patient with follicular adenoma. *Thyroid*. 2018;28(6):815–817. doi:10.1089/thy.2017.0504
35. Duan H, Liu X, Ren X, Zhang H, Wu H, Liang Z. Mutation profiles of follicular thyroid tumors by targeted sequencing. *Diagn Pathol*. 2019;14(1):39. doi:10.1186/s13000-019-0817-1
36. Jung CK, Kim Y, Jeon S, Jo K, Lee S, Bae JS. Clinical utility of EZH1 mutations in the diagnosis of follicular-patterned thyroid tumors. *Hum Pathol*. 2018;81:9–17. doi:10.1016/j.humpath.2018.04.018
37. Vojtechova Z, Zavadi J, Klozar J, Grega M, Tachezy R. Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLoS One*. 2017;12(5):e0179645. doi:10.1371/journal.pone.0179645
38. Sempere LF, Azmi AS, Moore A. MicroRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021;12(5):e1662. doi:10.1002/wrna.1662
39. Ye Q, Wang Q, Qi P, et al. Development and clinical validation of a 90-gene expression assay for identifying tumor tissue origin. *J Mol Diagn*. 2020;22(9):1139–1150. doi:10.1016/j.jmoldx.2020.06.005
40. Ghafouri-Fard S, Shirvani-Farsani Z, Taheri M. The role of microRNAs in the pathogenesis of thyroid cancer. *Noncoding RNA Res*. 2020;5(3):88–98. doi:10.1016/j.ncrna.2020.06.001
41. Pietrus M, Seweryn M, Kapusta P, Wolkow P, Pitynski K, Wator G. Low expression of miR-375 and miR-190b differentiates grade 3 patients with endometrial cancer. *Biomolecules*. 2021;11(2):274. doi:10.3390/biom11020274
42. Ward CM, To TH, Pederson SM. NgsReports: A Bioconductor package for managing FastQC reports and other NGS related log files. *Bioinformatics*. 2020;36(8):2587–2588. doi:10.1093/bioinformatics/btz937
43. Martin M. Cutadapt removes adaptor sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011;17(1):10. doi:10.14806/ej.17.1.200
44. Kazomara A, Bieganski M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D155–D162. doi:10.1093/nar/gky1141
45. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(1):37–52. doi:10.1093/nar/gkr688
46. Jarzab B, Dedejusz M, Slowitka-Klencza D, et al. Guidelines of Polish National Societies Diagnostics and Treatment of Thyroid Carcinoma: 2018 update. *Endokrynol Pol*. 2018;69(1):34–74. doi:10.5603/EP.2018.0014
47. Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for ultrasound malignancy risk stratification of thyroid nodules in adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J*. 2017;6(5):225–237. doi:10.1159/000478027
48. Law CW, Alhamdoush M, Su S, et al. RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Res*. 2016;5:1408. doi:10.12688/f1000research.9005.3
49. Costa-Silva J, Domingues D, Lopes FM. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS One*. 2017;12(12):e0190152. doi:10.1371/journal.pone.0190152
50. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014;15(2):R29. doi:10.1186/gb-2014-15-2-r29
51. Reading CC, Charboneau JW, Hay ID, Sebo TJ. Sonography of thyroid nodules: A “classic pattern” diagnostic approach. *Ultrasound Q*. 2005;21(3):157–165. doi:10.1097/Q01.rug.0000174750.27010.68
52. Horvath E, Majlis S, Rossi R, et al. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1748–1751. doi:10.1210/jc.2008-1724
53. Park SH, Kim SJ, Kim EK, Kim MJ, Son EJ, Kwak JY. Interobserver agreement in assessing the sonographic and elastographic features of malignant thyroid nodules. *AJR Am J Roentgenol*. 2009;193(5):W416–W423. doi:10.2214/AJR.09.2541
54. Vannini I, Fanini F, Fabbri M. Emerging roles of microRNAs in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;48:128–133. doi:10.1016/j.cgd.2018.01.001
55. Wei H, Pu X, Liu X, et al. The diagnostic value of circulating microRNAs as a biomarker for gastric cancer: A meta-analysis. *Oncol Rep*. 2019;41(1):87–102. doi:10.3892/or.2018.6782
56. Hoshino I, Ishigo F, Watabe Y, et al. Cell-free microRNA-1246 in different body fluids as a diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248016. doi:10.1371/journal.pone.0248016
57. Dasgupta I, Chatterjee A. Recent advances in miRNA delivery systems. *Methods Protoc*. 2021;4(1):10. doi:10.3390/mps4010010
58. Wang F, Jiang C, Sun Q, et al. miR-195 is a key regulator of Raf1 in thyroid cancer. *Oncol Targets Ther*. 2015;8:3021–3028. doi:10.2147/OTT.590710
59. Marques MM, Evangelista AF, Macedo T, et al. Expression of tumor suppressors miR-195 and let-7a as potential biomarkers of invasive breast cancer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73:e184. doi:10.6061/clinics/2018/e184
60. Ye S, Song W, Xu X, Zhao X, Yang L. IGF2BP2 promotes colorectal cancer cell proliferation and survival through interfering with RNF-1 degradation by miR-195. *FEBS Lett*. 2016;590(11):1641–1650. doi:10.1002/1873-3468.12205
61. Yin Y, Hong S, Yu S, et al. miR-195 inhibits tumor growth and metastasis in papillary thyroid carcinoma cell lines by targeting CCND1 and FGF2. *Int J Endocrinol*. 2017;2017:6180425. doi:10.1155/2017/6180425
62. Tahamtan A, Toymoori-Rad M, Nakstad B, Salimi V. Anti-inflammatory miRNAs and their potential for inflammatory diseases treatment. *Front Immunol*. 2018;9:3377. doi:10.3389/fimmu.2018.01377
63. Lambert KA, Roff AM, Panganiban RP, Douglas S, Ishmael FT. MicroRNA-146a is induced by inflammatory stimuli in airway epithelial cells and augments the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205434. doi:10.1371/journal.pone.0205434
64. Sun H, Cong D, He M, Chen S, Liu X, Liu X. Expression profiles of pivotal microRNAs and targets in thyroid papillary carcinoma: An analysis of The Cancer Genome Atlas. *Oncol Targets Ther*. 2015;8:2271–2277. doi:10.2147/OTT.585753
65. Sun M, Fang S, Li W, et al. Associations of miR-146a and miR-146b expression and clinical characteristics in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biomark*. 2015;15(1):33–40. doi:10.3233/CBM-140431
66. Laukane R, Jakubkovic V, Ambrozaityte L, Cimbalistiene L, Ulkus A. Dysregulation of microRNAs as the risk factor of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: Systematic review. *Endokrynol Pol*. 2021;72(2):145–152. doi:10.5603/EPa.2021.0010
67. Qiu J, Zhang W, Zang C, et al. Identification of key genes and miRNAs markers of papillary thyroid cancer. *Biol Res*. 2018;51(1):45. doi:10.1186/s40659-018-0188-1
68. Qiu Z, Li H, Wang J, Sun C. miR-146a and miR-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 2017;38(5):2735–2740. doi:10.3892/or.2017.5994
69. Yang SL, Choi YS. Expressions of miRNAs in papillary thyroid carcinoma and their associations with the BRAF<sup>V600E</sup> mutation and clinicopathological features. *KMJ*. 2020;35(1):1–14. doi:10.7180/kmj.2020.35.1.1
70. Lima CR, Geraldo MV, Fuzwara CS, Kimura ET, Santos MF. miRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different papillary thyroid carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2016;16:308. doi:10.1186/s12885-016-2146-z
71. Zhou C, Zhao L, Wang K, et al. MicroRNA-146a inhibits NF- $\kappa$ B activation and pro-inflammatory cytokine production by regulating IRAK1 expression in THP-1 cells. *Exp Ther Med*. 2019;18(4):3078–3084. doi:10.3892/etm.2019.7881
72. Li L, Lv B, Chen B, et al. Inhibition of miR-146b expression increases radiiodine sensitivity in poorly differentiated thyroid carcinoma via positively regulating NIS expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;462(4):314–321. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.134

75. Singh PK, Preus L, Hu Q, et al. Serum microRNA expression patterns that predict early treatment failure in prostate cancer patients. *Oncotarget*. 2014;5(3):824–840. doi:10.18632/oncotarget.1776
76. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From biomarkers to mediators of physiology and disease. *Cell Metab*. 2019;30(4):656–673. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.011
77. Thomas M, Fraser D, Bowen T. Biogenesis, stabilization, and transport of miRNAs in kidney health and disease. *Noncoding RNA*. 2018;4(4):30. doi:10.3390/nrna4040030
78. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402
79. Geekyanage H, Rayatpisheh S, Wohlschlegel JA, Brown R, Ambros V. Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(39):24213–24223. doi:10.1073/pnas.2008323117
80. Zhang Q, Wang W, Zhou Q, et al. Roles of circRNAs in the tumour microenvironment. *Mol Cancer*. 2020;19(1):14. doi:10.1186/s12943-019-1125-9
81. De Crea C, Raffaelli M, Sessa L, et al. Actual incidence and clinical behaviour of follicular thyroid carcinoma: An institutional experience. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:952095. doi:10.1155/2014/952095
82. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1–133. doi:10.1089/thy.2015.0020
83. Rosignolo F, Memeo L, Monzani F, et al. MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2017;50(5):1767–1777. doi:10.3892/ijo.2017.3960
84. Mazeh H, Deutch T, Karas A, et al. Next-generation sequencing identifies a highly accurate miRNA panel that distinguishes well-differentiated thyroid cancer from benign thyroid nodules. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(8):858–863. doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0055
85. Aquino-Jarquin G. Emerging role of CRISPR/Cas9 technology for miRNAs editing in cancer research. *Cancer Res*. 2017;77(24):6812–6817. doi:10.1158/0008-5472.CCR-17-2142
86. Silaghi CA, Lozovanu V, Silaghi H, et al. The prognostic value of miRNAs in thyroid cancers: A systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2608. doi:10.3390/cancers12092608
87. Simonson B, Das S. MicroRNA therapeutics: The next magic bullet? *Mini Rev Med Chem*. 2015;15(6):467–474. doi:10.2174/1389557515666150324123208
88. Mistak D, Hagemann S, Bell JL, et al. The miRNA landscape of MYCN-amplified neuroblastoma. *Front Oncol*. 2021;11:647737. doi:10.3389/fonc.2021.647737
89. Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, et al. MicroRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(13):20881–20894. doi:10.18632/oncotarget.14930
90. Reda El Sayed S, Cristante J, Guyon L, Denis J, Chabre O, Cherradi N. MicroRNA therapeutics in cancer: Current advances and challenges. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11):2680. doi:10.3390/cancers13112680
91. Guo F, Wang C, Wang S, et al. Alteration in gene expression profile of thymomas with or without myasthenia gravis linked with the nuclear factor-kappaB/autoimmune regulator pathway to myasthenia gravis pathogenesis. *Thorac Cancer*. 2019;10(3):564–570. doi:10.1111/1759-7714.12980
92. Takakuwa T, Nomura S, Matsuzuka F, Inoue H, Aozasa K. Expression of interleukin-7 and its receptor in thyroid lymphoma. *Lab Invest*. 2000;80(10):1483–1490. doi:10.1038/labinvest.3780157



## 7. Podsumowanie i wnioski

W pierwszej publikacji przeanalizowano kliniczne i ultrasonograficzne czynniki mające wpływ na ryzyko raka tarczycy w zmianach ogniskowych zweryfikowanych w BACC jak SFN. Obejmują one: wiek, płeć, średnicę guza, obecność choroby Hashimoto, podkategorię biopsyjną „podejrzanie nowotworu z komórek Hurthle’a” oraz sumę ultrasonograficznych i klinicznych czynników ryzyka. W badaniu pooperacyjnym u 18 chorych rozpoznano raka tarczycy, najczęstszy podtyp stanowił rak brodawkowaty (12,18; 66,6%). Spośród zmian łagodnych dominował gruczolak pęcherzykowy (45/92; 49%). Pacjentów podzielono na 2 grupy: ze zmianą łagodną (grupa 1) oraz z nowotworem złośliwym (grupa 2). W grupie chorych ze zmianą złośliwą, w porównaniu z grupą z gruczolakiem pęcherzykowym stwierdzono przewagę mężczyzn (16,6% vs. 13,1%,  $p=0,31$ ) większy odsetek biopsji zweryfikowanych jako *podejrzanie nowotworu z komórek Hurthle’a* (55,6% vs. 45,7%,  $p=0,075$ ), większy odsetek pacjentów z chorobą Hashimoto (33,3% vs. 31,5%,  $p=0,55$ ), większy odsetek klinicznych i ultrasonograficznych cech zwiększonego ryzyka złośliwości (1,4 vs. 1,29,  $p=0,71$ ), mniejszą średnicę guza (14,5 mm vs. 19,4 mm,  $p=0,15$ ) oraz fakt, że chorzy byli średnio o 2,3 roku młodsi (53,1 vs. 55,4 roku,  $p=0,42$ ). Wyniki te nie były istotne statystycznie.

W drugiej pracy oceniono wpływ elektywnej limfadenektomii przedziału VI szyi w grupie 80 zoperowanych chorych na pooperacyjny staging raka tarczycy oraz ryzyko wczesnych powikłań pooperacyjnych, takich jak krwawienie do rany, porażenie NKW oraz hipokalcemię. U 68 chorych zakres zabiegu polegał na całkowitym wycięciu tarczycy, a u 12 wykonano jedynie lobektomię. Stwierdzono łącznie 129 węzłów chłonnych (średnio 1,6 węzła chłonnego na 1 chorego) w preparacie pooperacyjnym, wszystkie węzły zostały zweryfikowane jako wolne od komórek nowotworowych. U 26 chorych nie znaleziono węzłów chłonnych w preparacie. W grupie chorych z rakiem tarczycy wykazano nieistotnie większą średnią liczbę węzłów chłonnych (2,2 vs. 1,5,  $p=0,13$ ) oraz nieistotnie częściej stwierdzano węzły chłonne w preparacie (90% vs. 64%,  $p=0,1$ ). Analiza pooperacyjnych powikłań chirurgicznych nie wykazała istotnych różnic w częstości ich występowania pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną: niedowładu NKW (3,38% vs. 1,49%,  $p=0,08$ ), krwawienia do rany pooperacyjnej (1,25% vs. 0,44%,  $p=0,29$ ) oraz hipokalcemii (5% vs. 5,4%,  $p=0,86$ ). Porównując częstość powikłań w zależności od zakresu zabiegu, wczesny pooperacyjny niedowład NKW oraz krwawienie do rany stwierdzono w grupie badanej jedynie u chorych poddanych całkowitemu wycięciu tarczycy.

Trzecia publikacja przedstawia wyniki badań molekularnych. Najważniejszym celem badania było znalezienie panelu miRNA, który umożliwiłby odróżnienie FA od WDTC na etapie diagnostyki przedoperacyjnej. Stwierdzono znamienne statystycznie nadekspresję 2 cząsteczek miRNA - miR-146b-5p ( $p=0,031$ ) oraz miR-146b-3p ( $p=0,034$ ), natomiast poziom ekspresji miR-195-3p ( $p=0,032$ ) okazał się istotnie niższy w grupie chorych z WDTC w porównaniu z grupą chorych z FA. Wyniki zostały zwalidowane porównując je z

zewnętrznymi danymi pochodzącymi z TCGA. Do określenia sygnatury miRNA wykorzystano próbki zdrowej tkanki tarczycy jako punktu odniesienia. Analiza kohorty Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pozwoliła uzyskać 20 istotnych miRNA, które stanowiły sygnaturę dla WDTC. Analogiczne obliczenia przeprowadzono na danych pozyskanych z TCGA otrzymując sygnaturę składającą się z istotnych 188 miRNAs. Podsumowując, sygnatura WDTC dla kohorty CMUJ pokrywa się w 90% (18 spośród 20 miRNA) z sygnaturą z bazy TCGA. Ponadto, kierunek zmienności ekspresji ( nadmierna lub obniżona) jest taki sam we wszystkich przypadkach.

Potwierdzono także obecność miRNA w osoczu. Zmienność ekspresji zbadano za pomocą metody qPCR. W badaniu stwierdzono wyższy poziom ekspresji miR-195-3p u pacjentów z WDTC. Uzyskany rezultat był istotny statystycznie ( $p = 0,039$ ). Reasumując, zaprezentowano miRNA, których zmiana ekspresji koreluje z ryzykiem nowotworu złośliwego. Potwierdzono również taką zależność dla jednego z wyizolowanych z guza miRNA również w osoczu.

### **Wnioski:**

1. W analizie czynników ryzyka nie stwierdzono pojedynczej cechy, która charakteryzowałaby się ze znamienne wyższym ryzykiem raka w zmianach ogniskowych zweryfikowanych w BACC „podejrzenie nowotworu pęcherzykowego”.
2. Poszerzenie zakresu o limfadenektomię przedziału VI szyi nie poprawia histopatologicznego stagingu, natomiast w doświadczonych ośrodkach w chirurgii tarczycy nie wiąże się z większym ryzykiem powikłań pooperacyjnych.
3. MiRNA jest obiecującym biomarkerem różnicującym gruczolaka pęcherzykowego i dobrze zróżnicowane raki tarczycy.
4. Zmienność ekspresji cząsteczek miRNA - miR-146b-5p oraz miR-146b-3p oraz miR-195-3p może być wykorzystana do odróżnienia zmiany łagodnej i złośliwej, natomiast miR-195-3p stanowi osoczowy biomarker, potencjalnie umożliwiający wykluczenie raka tarczycy na etapie przedoperacyjnym.

## 8. Piśmiennictwo

1. Mortensen JD, Woolner LB, Bennett WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab.* 1955;15(10):1270–80.
2. Singer PA. Evaluation and management of the solitary thyroid nodule. *Otolaryngol Clin North Am.* 1996;29(4):577–91.
3. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med.* 1994;154(16):1838–40
4. Cases JA, Surks MI. The changing role of scintigraphy in the evaluation of thyroid nodules. *Semin Nucl Med.* 2000;30(2):81–7
5. Borget I, Vielh P, Leboulleux S, et al. Assessment of the cost of fine-needle aspiration cytology as a diagnostic tool in patients with thyroid nodules. *Am J Clin Pathol* 2008;129:763-771
6. Mahony GT, Mahony BS. Low nondiagnostic rate for fine needle capillary sampling biopsy of thyroid nodules: a singular experience. *J Ultrasound Med* 2013;32:2155-2161
7. Choi YS, Hong SW, Kwak JY, et al. Clinical and ultrasonographic findings affecting nondiagnostic results upon the second fine needle aspiration for thyroid nodules. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2304-2309
8. Ali SZ, Cibas ES. Editors. *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes.* 2nd edition. New York: Wiley, 2017.
9. Cross P, Chandra A, Giles T, et al. *Guidance on the reporting of thyroid cytology specimens.* 2nd edition. London, United Kingdom: Royal College of Pathologists, 2016.
10. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, et al editors. *World health organization classification of tumours of endocrine organs.* Lyon: IARC, 2017:65-142.
11. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of “follicular neoplasm”: A gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41–44.
12. Tuttle RM, Lemar H, Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid* 1998;8:377–383.
13. Baloch ZW, Hendreen S, Gupta PK, et al. Interinstitutional review of thyroid fine-needle aspirations: Impact on clinical management of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 2001;25:231–234.
14. Belfiore A, La Rosa GL. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:361–400.
15. Jarząb B., Dedecjus M., Słowińska-Klencka D, et al. Guidelines of Polish National

- Societies Diagnostics and Treatment of Thyroid Carcinoma 2018 Update. *Endokrynol Pol* 2018; 69 (1): 34–74.
16. Inabnet WB 3rd, Palazzo F, Sosa JA, et al. Correlating the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology with Histology and Extent of Surgery: A Review of 21,746 Patients from Four Endocrine Surgery Registries Across Two Continents. *World J Surg*. 2020;44(2):426-435.
  17. Kilfoy BA, Devesa SS, Ward MH, et al. Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2009;18:1092–1100.
  18. Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988–2005. *Cancer*. 2009;115:3801–3807.
  19. Piccardo A, Puntoni M, Treglia G, et al. Thyroid nodules with indeterminate cytology: prospective comparison between 18F-FDG-PET/ CT, multiparametric neck ultrasonography, 99mTc-MIBI scintigraphy and histology. *Eur J Endocrinol* 2016;174:693-703.
  20. Hashimoto H. Zur Kenntniss der lymphomatosen veränderung der schilddrüse strumal lymphomatosa. *Arch Klin Chirurgie* 1912; 97: 218–48 (translated in Levit T. The thyroid: a physiological, clinical and surgical study. London: E. & S. Livingston, 1954 p. 547–61.
  21. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006;295:2164–2167.
  22. Dailey ME, Lindsay S, Skahan R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. *AMA Arch Surg*. 1955;2:291–7.
  23. Konturek A, Barczynski M, Wierzbowski W, et al. Coexistence of papillary thyroid cancer with Hashimoto thyroiditis. *Langenbecks Arch Surg*. 2013;3:389–94.
  24. Liu X, Zhu L, Cui D, et al. Coexistence of histologically confirmed Hashimoto's thyroiditis with different stages of papillary thyroid carcinoma in a consecutive Chinese cohort. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:769294.
  25. Paparodis R, Imam S, Todorova-Koteva K, et al. Hashimoto's thyroiditis pathology and risk for thyroid cancer. *Thyroid*. 2014;7:1107–14.
  26. Jankovic B, Le KT, Hershman JM. Clinical Review: Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma: is there a correlation?. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):474–482.
  27. Resende de Paiva C, Grønhøj C, Feldt-Rasmussen U, von Buchwald C. Association between Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer in 64,628 Patients. *Front Oncol*. 2017;7:53.
  28. Lai X, Xia Y, Zhang B, et al. A meta-analysis of Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma risk. *Oncotarget*. 2017;8(37):62414–62424.
  29. Kim ES, Lim DJ, Baek KH, et al. Thyroglobulin antibody is associated with increased cancer risk in thyroid nodules. *Thyroid*. 2010;8:885–91.
  30. Rago T, Fiore E, Scutari M, et al. Male sex, single nodularity, and young age are associated with the risk of finding a papillary thyroid cancer on fine-needle aspiration cytology in a large series of patients with nodular thyroid disease. *Eur J Endocrinol*. 2010;162:763–770.

31. Jarzab B, Handkiewicz-Junak D, Wloch J. Juvenile differentiated thyroid carcinoma and the role of radioiodine in its treatment: A qualitative review. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:773-803.
32. Haymart MR, Repplinger DJ, Levenson GE. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with greater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:809-814.
33. Cavallo A, Johnson DN, White MG, et al. Thyroid nodule size at ultrasound as a predictor of malignancy and final pathologic size. *Thyroid* 2017; 3:641–650
34. Davis NL, Gordaon M, Germann E, et al. Clinical parameters predictive of malignancy of thyroid follicular neoplasms. *Am J Surg* 1991;161:567–569.
35. Bronner MP, LiVolsi VA. Oxyphilic (Askanazy/Hurthle cell) tumors of the thyroid: microscopic features predict biologic behaviour. *Surg Pathol* 1988;1:137-50.
36. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1–133.
37. Tessler FN, Middleton WD, Grant EG, et al. ACR thyroid imaging, reporting and data system (TI-RADS): white paper of the ACR TI-RADS Committee. *J Am Coll Radiol.* 2017;14(5):587–595.
38. Remonti LR, Kramer CK, Leitão CB, et al. Thyroid ultrasound features and risk of carcinoma: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Thyroid.* 2015;25(5):538–550.
39. Trimboli P, Deandrea M, Mormile A, et al. American Thyroid Association ultrasound system for the initial assessment of thyroid nodules: use in stratifying the risk of malignancy of indeterminate lesions. *Head Neck.* 2018;40(4):722–727.
40. Tang AL, Falciglia M, Yang H, et al. Validation of American Thyroid Association ultrasound risk assessment of thyroid nodules selected for ultrasound fine-needle aspiration. *Thyroid.* 2017;27(8):1077–1082.
41. Middleton WD, Teefey SA, Reading CC, et al. Comparison of performance characteristics of American College of Radiology TI-RADS, Korean Society of Thyroid Radiology TI-RADS, and American Thyroid Association guidelines. *Am J Roentgenol.* 2018;210(5):1148–1154.
42. Barbosa TLM, Junior COM, Graf H, et al. ACR TI-RADS and ATA US scores are helpful for the management of thyroid nodules with indeterminate cytology. *BMC Endocr Disord.* 2019;19(1):112.
43. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7:569–580.
44. Bode-Lesniewska B, Cochand-Priollet B, Straccia P, et al. Management of thyroid cytological material, preanalytical procedures and bio-banking. *Cytopathology* 2019;30:7-16.
45. Patel KN, Angell TE, Babiarz J, et al. Performance of a Genomic Sequencing Classifier

- for the Preoperative Diagnosis of Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. *JAMA Surg* 2018; 153:817-24.
46. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977;7:481–493.
47. Morris LG, Sikora AG, Myssiorek D, DeLacure MD. The basis of racial differences in the incidence of thyroid cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2008;15:1169–1176
48. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol.* 2013;2013:965212.
49. Davies L, Ouellette M, Hunter M, Welch HG. The increasing incidence of small thyroid cancers: where are the cases coming from? *Laryngoscope*,2010; 120: 2446–2451.
50. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA*, 2006;295:2164–2167.
51. Morris LG, Myssiorek D. Improved detection does not fully explain the rising incidence of well-differentiated thyroid cancer: a populationbased analysis. *Am J Surg.* 2010;200:454–461
52. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie. [<http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 01.07.2019].
53. Jarzab B, Płaczekiewicz-Jankowska E. Zasady diagnostyki zmian ogniskowych tarczycy i ich kwalifikacji do leczenia operacyjnego zgodnie z rekomendacjami polskich towarzystw naukowych „Diagnostyka i leczenie raka tarczycy” 2018. *Med Prakt.* 2018;10:69–81.
54. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1–133.
55. Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid.* 2017;27(6):751–756.
56. Moynihan BG. The surgical treatment of cancer of the sigmoid flexure and rectum with especial reference to the principles to be observed. *Surg Gynecol Obstet.* 1908;6:463.
57. Giordano D, Gradoni P, Oretti G. Treatment and prognostic factors of papillary thyroid microcarcinoma. *Clin. Otolaryngol.* 2010;35:118–124.
58. Lombardi CP, Bellantone R, De Crea C. Papillary thyroid microcarcinoma: extrathyroidal extension, lymph node metastases, and risk factors for recurrence in a high prevalence of goiter area. *World J Surg.* 2010;34:1214–1221.
59. Mercante G, Frasoldati A, Pedroni C. Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients. *Thyroid* 2009;19:707–716.
60. Pisello F, Geraci G, Nigro CL. Neck node dissection in thyroid cancer. A review. *G Chir.* 2010;31:112–118.
61. Park JH, Lee YS, Kim BW. Skip lateral neck node metastases in papillary thyroid

- carcinoma. *World J Surg.* 2012;36:743–747.
62. Carty SE, Cooper DS, Doherty GM. Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19:1153–1158.
  63. Barczyński M, Konturek A, Stopa M, Nowak W. Prophylactic central neck dissection for papillary thyroid cancer. *Br J Surg.* 2013;100:410–418.
  64. Barczyński M, Konturek A, Stopa M, Nowak W. Nodal recurrence in the lateral neck after total thyroidectomy with prophylactic central neck dissection for papillary thyroid cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2014;399:237–244
  65. Barczyński M, Konturek A. Obserwacja chorych po leczeniu z powodu wybranych nowotworów złośliwych. Część VII: zróżnicowany rak tarczycy. *Med Prakt.* 2017;9:29–31.
  66. Kim HJ, Sohn SY, Jang HW. Multifocality, but not bilaterality, is a predictor of disease recurrence/persistence of papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2013;37:376–384.
  67. Ducci M, Appetecchia M, Marzetti M. Neck dissection for surgical treatment of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 1997;16:333–335.
  68. Coatesworth AP, MacLennan K. Cervical metastasis in papillary carcinoma of the thyroid: a histopathological study. *Int J Clin Pract.* 2002;56:241–242.
  69. Rotstein L. The role of lymphadenectomy in the management of papillary carcinoma of the thyroid. *J Surg Oncol.* 2009;99:186–188.
  70. Machens A, Hauptmann S, Dralle H. Prediction of lateral lymph node metastases in medullary thyroid cancer. *Br J Surg.* 2008;95:586–591.
  71. Dralle H, Machens A. Surgical management of the lateral neck compartment for metastatic thyroid cancer. *Curr Opin Oncol.* 2013;25:20–26.
  72. Thompson LD, Wieneke JA, Paal E. A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature. *Cancer* 2001;91:505–524.
  73. Jarzab B, Dedecjus M, Słowińska-Klencka D, et al. Rekomendacje Polskich Towarzystw Naukowych „Diagnostyka i leczenie raka tarczycy”. Aktualizacja na rok 2018. *Endokrynol Pol.* 2018;69(1);34–74.
  74. Deniwar A, Kandil E, Randolph G. Electrophysiological neural monitoring of the laryngeal nerves in thyroid surgery: Review of the current literature. *Gland Surg.* 2015;4:368–375.
  75. Deniwar A, Bhatia P, Kandil E. Electrophysiological neuromonitoring of the laryngeal nerves in thyroid and parathyroid surgery: A review. *World J Exp Med.* 2015;5:120–123.
  76. Pisanu A, Porceddu G, Podda M, Cois A, Uccheddu A. Systematic review with metaanalysis of studies comparing intraoperative neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves versus visualization alone during thyroidectomy. *J Surg Res.* 2014;188: 152–161.
  77. Gurrado A, Bellantone R, Cavallaro G, et al. Can total thyroidectomy be safely performed by residents?: A comparative retrospective multicenter study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e3241.
  78. Goretzki PE, Schwarz K, Brinkmann J, Wirowski D, Lammers BJ. The impact of thyroid diseases: Is it worth the effort? *World J Surg.* 2010;34:1274–1284

79. Jeannon JP, Orabi AA, Bruch GA, Abdalsalam HA, Simo R. Diagnosis of recurrent laryngeal nerve palsy after thyroidectomy: a systematic review. *Int J Clin Pract.* 2009;63(4): 624–9.
80. Duclos A, Lifante JC, Ducarroz S, Soardo P, Colin C, Peix JL. Influence of intraoperative neuromonitoring on surgeons' technique during thyroidectomy. *World J Surg.* 2011;35:773.
81. Barczyński M, Konturek A, Cichoń S. Randomized clinical trial of visualization versus neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves during thyroidectomy. *Br J Surg.* 2009;96(3):240-6.
82. Cirocchi R, Arezzo A, D'Andrea V, et al. Intraoperative neuromonitoring versus visual nerve identification for prevention of recurrent laryngeal nerve injury in adults undergoing thyroid surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;1:CD012483.
83. Nouraei SAR, Allen J, Kaddour H, et al. Vocal palsy increases the risk of lower respiratory tract infection in low-risk, low-morbidity patients undergoing thyroidectomy for benign disease: A big data analysis. *Clin Otolaryngol.* 2017;42(6):1259–1266.
84. Dobrinja C, Troian M, Cipolat-Mis T, et al. Rationality in prophylactic central neck dissection in clinically node-negative (cN0) papillary thyroid carcinoma: Is there anything more to say? A decade experience in a single-center. *Int J Surg.* 2017;41 Suppl 1:40–47.
85. Godballe C, Madsen AR, Sørensen CH, et al. Risk factors for recurrent nerve palsy after thyroid surgery: a national study of patients treated at Danish departments of ENT Head and Neck Surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(8):2267–76
86. Chen L, Wu YH, Lee CH, Chen HA, Loh EW, Tam KW. Prophylactic Central Neck Dissection for Papillary Thyroid Carcinoma with Clinically Uninvolved Central Neck Lymph Nodes: A Systematic Review and Metaanalysis. *World J Surg.* 2018;42(9):2846–2857.
87. Pattou F, Combemale F, Fabre S, et al. Hypocalcemia following Thyroid Surgery: Incidence and Prediction of Outcome. *World J Surg.* 1998;22(7):718–724.
88. Jessie WU, Harrison B. Hypocalcemia after Thyroidectomy: The Need for Improved Definitions. *World J Endoc Surg.* 2010;2(1):17–20.
89. Mehanna HM, Jain A, Randeva H, Watkinson J, Shaha A. Postoperative hypocalcemia - the difference a definition makes. *Head Neck.* 2010;32(3):279–83.
90. Debry C, Schmitt E, Senéchal G, Silisté CD, Quevauvilliers J, Renou G. Analysis of thyroid surgery: recurrent paralysis et hypoparathyroidism. On a series of 588 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cer vicofac.* 1995;112(5):211–7.
91. Lee YS, Chang HS, Chung WY, Nam KH, Park CS. Relationship between onset of hypocalcemic symptoms and the recovery time from transient hypocalcemia after total thyroidectomy. *Head Neck.* 2014;36(12):1732–6.
92. Lorenz K, Elwerr M, Dralle H. Postthyroidectomy hypocalcemia: the earlier it appears the longer it persists. *Chirurg.* 2015;86(3):286.
93. Winer KK, Ko CW, Reynolds JC, et al. Long-term treatment of hypoparathyroidism: a randomized controlled study comparing parathyroid hormone-(1-34) versus calcitriol and calcium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4214–4220.
94. Rubin MR, Sliney J, McMahon DJ, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Therapy of



- hypoparathyroidism with intact parathyroid hormone. *Osteoporos Int.* 2010;21:1927–1934.
95. Sikjaer T, Rejnmark L, Rolighed L, Heickendorff L, Mosekilde L et Hypoparathyroid Study Group. The effect of adding PTH (1-84) to conventional treatment of hypoparathyroidism: a randomized, placebocontrolled study. *J Bone Miner Res.* 2011;26:2358–2370.
96. Cusano NE, Rubin MR, McMahon DJ, et al. Therapy of hypoparathyroidism with PTH (1-84): a prospective four-year investigation of efficacy and safety. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:137–144.
97. Shoback D. Clinical practice. Hypoparathyroidism. *N Engl J Med.* 2008;359:391–403.
98. Guerrero MA. Cryopreservation of parathyroid glands. *Int J Endocrinol.* 2010;2010:829540.
99. Selberherr A, Scheuba C, Riss P, Niederle B. Postoperative hypoparathyroidism after thyroidectomy: efficient and cost-effective diagnosis and treatment. *Surgery.* 2015;157:349–353.
100. Giordano D, Valcavi R, Thompson GB. Complications of central neck dissection in patients with papillary thyroid carcinoma: results of a study on 1087 patients and review of the literature. *Thyroid.* 2012;22:911–917
101. Lee YS, Kim SW, Kim SW, et al. Extent of routine central lymph node dissection with small papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2007;31:1954–1959
102. Cichoń S, Anielski R, Orlicki P, Krzesiwo-Stempak K. Krwotok po operacji wola. *Przegl Lek.* 2002;59:489–492.
103. Promberger R, Ott J, Kober F, Koppitsch C, Seemann R. et al: Risk factors for postoperative bleeding after thyroid surgery. *Br J Surg.* 2012; 99: 373-379.
104. Campbell MJ, Mc Coy KL, Shen WT, Carty SE, Lubitz C. et al: A multiinstitutional international study of risk factors for hematoma after thyroidectomy. *Surgery* 2013; 154: 1283-1291.
105. Shindo M, Stern A. Total thyroidectomy with and without selective central compartment dissection: a comparison of complication rates. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 136(6): 584-7.
106. Dehal A, Abbas A, Hussain F, Johna S. Risk factors for neck hematoma after thyroid or parathyroid surgery: ten-year analysis of the nationwide inpatient sample database. *Perm J.* 2015; 19(1): 22-8.
107. Suzuki S, Yasunaga H, Matsui H, Fushimi K, Saito Y, Yamasoba T. Factors Associated With Neck Hematoma After Thyroidectomy: A Retrospective Analysis Using a Japanese Inpatient Database. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(7):e2812.
108. Bergenfelz A, Jansson S, Kristoffersson A, et al. Complications to thyroid surgery: results as reported in a database from a multicenter audit comprising 3,660 patients. *Langenbecks Arch Surg.* 2008;393:667–673.
109. Edge SB, Byrd DR, Compton CC., Fritz AG., Greene FL., Trotti A. *AJCC Cancer Staging Handbook From the AJCC Cancer Staging Manual, 7<sup>th</sup> edn.* New York Dordrecht Heidelberg London: Springer 2010; ch. 8, pp. 88-96

110. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol*. 2010;22(6):395-404. doi:10.1016/j.clon.2010.05.004.
111. Zevallos JP, Hartman CM, Kramer JR, Sturgis EM, Chiao EY. Increased thyroid cancer incidence corresponds to increased use of thyroid ultrasound and fine-needle aspiration: a study of the Veterans Affairs health care system. *Cancer*. 2015;121(5):741-6. doi:10.1002/cncr.29122.
112. Didkowska J, Wojciechowska U, Czaderny K, Olasek P, Ciuba A. Nowotwory złośliwe w Polsce 2017. Centrum Onkologii-Instytut, Warszawa 2019. ISSN 0867–8251. [http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory\\_2017.pdf](http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory_2017.pdf). Accessed January 01, 2019.
113. Gharib H, Papini E, Garber JR, et al. AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid Nodules. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules – 2016 update. *Endocr Pract*. 2016;22(5):622-39. doi:10.4158/EP161208.GL.
114. Migda B, Migda M, Migda AM, et al. Evaluation of Four Variants of the Thyroid Imaging Reporting and Data System (TIRADS) Classification in Patients with Multinodular Goitre - initial study. *Endokrynol Pol*. 2018;69(2):156-162. doi:10.5603/EP.a2018.0012.
115. Lee HJ, Yoon DY, Seo YL, et al. Intraobserver and interobserver variability in ultrasound measurements of thyroid nodules. *J Ultrasound Med*. 2018;37:173–178. doi:10.1002/jum.14316
116. Burman KD, Wartofsky L. Thyroid nodules. *N Engl J Med*. 2015;373:2347–2356. doi:10.1056/NEJMcp1415786
117. Rago T, Vitti P. Risk Stratification of Thyroid Nodules: From Ultrasound Features to TIRADS. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3):717. doi:10.3390/cancers14030717.
118. Trimboli P, Castellana M, Virili C, et al. Performance of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in assessing thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis using histological standard of reference. *Radiol Med*. 2020;125(4):406-415. doi:10.1007/s11547-019-01129-2.
119. Kwak JY. Indications for fine needle aspiration in thyroid nodules. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013;28(2):81-85. doi:10.3803/EnM.2013.28.2.81
120. Hoang JK, Middleton WD, Langer JE, et al. Comparison of Thyroid Risk Categorization Systems and Fine-Needle Aspiration Recommendations in a Multi-Institutional Thyroid Ultrasound Registry. *J Am Coll Radiol*. 2021;18(12):1605-1613. doi:10.1016/j.jacr.2021.07.019.
121. Brito JP, Gionfriddo MR, Al Nofal A, et al. The accuracy of thyroid nodule ultrasound to predict thyroid cancer: systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:1253–1263. doi:10.1210/jc.2013-2928
122. Remonti LR, Kramer CK, Leitão CB, Pinto LC, Gross JL. Thyroid ultrasound features and risk of carcinoma: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Thyroid*. 2015;25:538–550. doi:10.1089/thy.2014.0353

123. Campanella P, Ianni F, Rota CA, Corsello SM, Pontecorvi A. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2014;170:203–211. doi:[10.1530/EJE-13-0995](https://doi.org/10.1530/EJE-13-0995)
124. Xu L, Zeng F, Wang Y, Bai Y, Shan X, Kong L. Prevalence and associated metabolic factors for thyroid nodules: a cross-sectional study in Southwest of China with more than 120 thousand populations. *BMC Endocr Disord*. 2021;21(1):175. doi:[10.1186/s12902-021-00842-2](https://doi.org/10.1186/s12902-021-00842-2)
125. Paskas S, Jankovic J, Zivaljevic V, et al. Malignant risk stratification of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology based on molecular testing. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(8):471-479. doi:[10.1002/cncy.21554](https://doi.org/10.1002/cncy.21554)
126. Yang X, Zhai D, Zhang T, Zhang S. Use of strain ultrasound elastography versus fine-needle aspiration cytology for the differential diagnosis of thyroid nodules: a retrospective analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2020;75:e1594. doi:[10.6061/clinics/2020/e1594](https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1594)
127. Valderrabano P, McIver B. Evaluation and Management of Indeterminate Thyroid Nodules: The Revolution of Risk Stratification Beyond Cytological Diagnosis. *Cancer Control*. 2017;24(5):1073274817729231. doi:[10.1177/1073274817729231](https://doi.org/10.1177/1073274817729231)
128. Faquin WC, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular patterned lesions of the thyroid: diagnosis, management, and follow-up according to National Cancer Institute (NCI) recommendations. *Diagn Cytopathol*. 2010;38:731–739. doi:[10.1002/dc.21292](https://doi.org/10.1002/dc.21292)
129. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *JAMA*. 2018;319(15):1622. doi:[10.1001/jama.2018.0898](https://doi.org/10.1001/jama.2018.0898)
130. Wong R, Farrell SG, Grossmann M. Thyroid nodules: diagnosis and management. *Med J Aust*. 2018;209(2):92-98. doi:[10.5694/mja17.01204](https://doi.org/10.5694/mja17.01204)
131. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med*. 2012;367(8):705-715. doi:[10.1056/NEJMoa1203208](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203208)
132. Papanastasiou A, Sapalidis K, Goulis DG, et al. Thyroid nodules as a risk factor for thyroid cancer in patients with Graves' disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies in surgically treated patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;91(4):571-577. doi:[10.1111/cen.14069](https://doi.org/10.1111/cen.14069)
133. Oczko-Wojciechowska M, Kotecka-Blicharz A, Krajewska J, et al. European perspective on the use of molecular tests in the diagnosis and therapy of thyroid neoplasms. *Gland Surg*. 2020;9:69-76 doi:[10.21037/gs.2019.10.26](https://doi.org/10.21037/gs.2019.10.26)
134. Lan L, Luo Y, Zhou M, et al. Comparison of Diagnostic Accuracy of Thyroid Cancer With Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration and Core-Needle Biopsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:44. doi:[10.3389/fendo.2020.00044](https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00044)
135. Macerola E, Poma AM, Vignali P, et al. Molecular Genetics of Follicular-Derived Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1139. doi:[10.3390/cancers13051139](https://doi.org/10.3390/cancers13051139)
136. Lamartina L, Grani G, Durante C, Filetti S. Recent advances in managing differentiated thyroid cancer. *F1000Res*. 2018;7:86. doi:[10.12688/f1000research.12811.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.12811.1)

137. Wu D, Hu S, Hou Y, He Y, Liu S. Identification of potential novel biomarkers to differentiate malignant thyroid nodules with cytological indeterminate. *BMC Cancer*. 2020;20(1):199. doi:10.1186/s12885-020-6676-z.
138. Trimboli P, Virili C, Romanelli F, Crescenzi A, Giovanella L. Galectin-3 Performance in Histologic a Cytologic Assessment of Thyroid Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1756. doi:10.3390/ijms18081756.
139. Zhao CK, Zheng JY, Sun LP, Xu RY, Wei Q, Xu HX. BRAF<sup>V600E</sup> mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for diagnosis of thyroid nodules: The influence of false-positive and false-negative results. *Cancer Med*. 2019;8(12):5577-5589. doi:10.1002/cam4.2478.
140. Wang W, Chang J, Jia B, Liu J. The Blood Biomarkers of Thyroid Cancer . *Cancer Manag Res*. 2020;12:5431-5438. doi:10.2147/CMAR.S261170
141. Khan TM, Zeiger MA. Thyroid Nodule Molecular Testing: Is It Ready for Prime Time? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:590128. doi:10.3389/fendo.2020.590128.
142. Zaballos MA, Santisteban P. Key signaling pathways in thyroid cancer. *J Endocrinol*. 2017;235(2):43-61. doi:10.1530/JOE-17-0266.
143. Topf MC, Wang ZX, Tuluc M, Pribitkin EA. TERT, HRAS, and EIF1AX Mutations in a Patient with Follicular Adenoma. *Thyroid*. 2018;28:815–817. doi:10.1089/thy.2017.0504
144. Duan H, Liu X, Ren X, Zhang H, Wu H, Liang Z. Mutation profiles of follicular thyroid tumors by targeted sequencing. *Diagn. Pathol*. 2019;14:39. doi:10.1186/s13000-019-0817-1
145. Jung CK, Kim Y, Jeon S, Jo K, Lee S, Bae JS. Clinical utility of EZH1 mutations in the diagnosis of follicular-patterned thyroid tumors. *Hum. Pathol*. 2018;81:9–17. doi:10.1016/j.humpath.2018.04.018
146. Vojtechova Z, Zavadil J, Klozar J, Grega M, Tachezy R. Comparison of the MiRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179645. doi:10.1371/journal.pone.0179645.
147. Sempere LF, Azmi AS, Moore A. MiRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021;12(6):e1662. doi:10.1002/wrna.1662.
148. Ye Q, Wang Q, Qi P, et al. Development and Clinical Validation of a 90-Gene Expression Assay for Identifying Tumor Tissue Origin. *J Mol Diagn*. 2020;22(9):1139-1150. doi:10.1016/j.jmoldx.2020.06.005
149. Ghafouri-Fard S, Shirvani-Farsani Z, Taheri M. The role of MiRNAs in the pathogenesis of thyroid cancer. *Non-coding RNA Res*. 2020;5(3):88-98. doi:10.1016/j.ncrna.2020.06.001
150. Pietrus M, Seweryn M, Kapusta P, Wołkow P, Pityński K, Wątor G. Low Expression of miR-375 and miR-190b Differentiates Grade 3 Patients with Endometrial Cancer. *Biomolecules*. 2021;11(2):274. doi:10.3390/biom11020274
151. Ward CM, To TH, Pederson SM. ngsReports: a Bioconductor package for managing FastQC reports and other NGS related log files. *Bioinformatics*. 2020;36(8):2587-2588. doi:10.1093/bioinformatics/btz937
152. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j*. 2011;17(1):10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200

153. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141
154. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(1):37-52. doi: 10.1093/nar/gkr688.
155. Jarzab B, Dedecjus M, Słowińska-Klencka D, et al. Guidelines of Polish National Societies Diagnostics and Treatment of Thyroid Carcinoma 2018 Update. *Endokrynol Pol.* 2018;69(1):34–74. doi:10.5603/EP.2018.0014
156. Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J.* 2017;6(5):225-237. doi:10.1159/000478927
157. Law CW, Alhamdoosh M, Su S, Dong X, Tian L et al. RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Res.* 2016 Jun 17;5:ISCB Comm J-1408. doi: 10.12688/f1000research.9005.3
158. Costa-Silva J, Domingues D, Lopes FM. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS One.* 2017 Dec 21;12(12):e0190152. doi: 10.1371/journal.pone.0190152.
159. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 2014 Feb 3;15(2):R29. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r29.
160. Reading CC, Charboneau JW, Hay JD, Sebo T. Sonography of thyroid nodules: a “classic pattern” diagnostic approach. *Ultrasound Q.* 2005;21:157–165. [https://www.researchgate.net/publication/7663118\\_Sonography\\_of\\_thyroid\\_nodulesA\\_classic\\_pattern\\_diagnostic\\_approach](https://www.researchgate.net/publication/7663118_Sonography_of_thyroid_nodulesA_classic_pattern_diagnostic_approach). Accessed October 01, 2005.
161. Horvath E, Majlis S, Rossi R, et al. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1748–1751. doi:10.1210/jc.2008-1724
162. Park SH, Kim SJ, Kim EK, Kim MJ, Son EJ, Kwak JY. Interobserver agreement in assessing the sonographic and elastographic features of malignant thyroid nodules. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;193:416–423. doi:10.2214/AJR.09.2541.
163. Vannini I, Fanini F, Fabbri M. Emerging roles of MiRNAs in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2018;48:128-133. doi:10.1016/j.gde.2018.01.001.
164. Wei H, Pu K, Liu XG, et al. The diagnostic value of circulating MiRNAs as a biomarker for gastric cancer: A meta-analysis. *Oncol Rep.* 2019;41(1):87-102. doi:10.3892/or.2018.6782.
165. Hoshino I, Ishige F, Iwatate Y, et al. Cell-free MiRNA-1246 in different body fluids as a diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2021;16(3):e0248016. doi:10.1371/journal.pone.0248016.
166. Dasgupta I, Chatterjee A. Recent Advances in MiRNA Delivery Systems. *Methods Protoc.* 2021;4(1):10. doi:10.3390/mps4010010.
167. Wang F, Jiang C, Sun Q, et al. MiRNA-195 is a key regulator of Raf1 in thyroid cancer. *Onco Targets Ther.* 2015;8:3021–3028. doi:10.2147/OTT.S90710

168. Marques MM, Evangelista AF, Macedo T, et al. Expression of tumor suppressors MiRNA-195 and let-7a as potential biomarkers of invasive breast cancer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73:e184. doi:10.6061/clinics/2018/e184
169. Ye S, Song W, Xu X, Zhao X, Yang L. IGF2BP2 promotes colorectal cancer cell proliferation and survival through interfering with RAF-1 degradation by MiRNA-195. *FEBS Lett*. 2016;590(11):1641-50. doi:10.1002/1873-3468.12205.
170. Yin Y, Hong S, Yu S, et al. MiR-195 Inhibits Tumor Growth and Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma Cell Lines by Targeting CCND1 and FGF2. *Int J Endocrinol*. 2017;2017:6180425. doi:10.1155/2017/6180425
171. Tahamtan A, Teymoori-Rad M, Nakstad B, Salimi V. Anti-Inflammatory MiRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment. *Front Immunol*. 2018;9:1377. doi:10.3389/fimmu.2018.01377
172. Lambert KA, Roff AN, Panganiban RP, Douglas S, Ishmael FT. MiRNA-146a is induced by inflammatory stimuli in airway epithelial cells and augments the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205434. doi:10.1371/journal.pone.0205434.
173. Cong D, He M, Chen S, Liu X, Sun H. Expression profiles of pivotal MiRNAs and targets in thyroid papillary carcinoma: An analysis of The Cancer Genome Atlas. *Oncotargets Ther*. 2015;8:2271–2277. doi:10.2147/OTT.S85753
174. Sun M, Fang S, Li W, et al. Associations of MiRNA-146a and MiRNA-146b expression and clinical characteristics in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biomark*. 2015;15:33–40. doi:10.3233/CBM-140431
175. Laukiene R, Jakubkevicius V, Ambrozaityte L, Cimbaliene L, Utkus A. Dysregulation of microRNAs as the risk factor of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: systematic review. *Endokrynol Pol*. 2021;72(2):145-152. doi:10.5603/EP.a2021.0010.
176. Qiu J, Zhang W, Zang C, et al. Identification of key genes and miRNAs markers of papillary thyroid cancer. *Biol Res*. 2018;51(1):45. doi:10.1186/s40659-018-0188-1.
177. Qiu Z, Li H, Wang J, Sun C. MiRNA-146a and MiRNA-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 2017;38(5):2735-2740. doi:10.3892/or.2017.5994.
178. Yang SI, Choi YS. Expressions of miRNAs in Papillary Thyroid Carcinoma and Their Associations with the BRAF<sup>V600E</sup> Mutation and Clinicopathological Features. *Kosin Med J*. 2020;35(1):1-14. doi:https://doi.org/10.7180/kmj.2020.35.1.1
179. Lima CR, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kimura ET, Santos MF. MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different Papillary Thyroid Carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2016;16:108. doi:10.1186/s12885-016-2146-z.
180. Zhou C, Zhao L, Wang K, et al. MiRNA-146a inhibits NF-κB activation and pro-inflammatory cytokine production by regulating IRAK1 expression in THP-1 cells. *Exp Ther Med*. 2019;18(4):3078-3084. doi:10.3892/etm.2019.7881.
181. Li L, Lv B, Chen B, et al. Inhibition of miR-146b expression increases radioiodine-sensitivity in poorly differentiated thyroid carcinoma via positively regulating NIS expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2015;462:314–321. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.134

182. Zedan AH, Hansen TF, Assenholt J, et al. MiRNA expression in tumour tissue and plasma in patients with newly diagnosed metastatic prostate cancer. *Tumour Biol.* 2018;40(5):1010428318775864. doi:10.1177/1010428318775864.
183. Garrido-Cano I, Constâncio V, Adam-Artigues A, et al. Circulating miR-99a-5p Expression in Plasma: A Potential Biomarker for Early Diagnosis of Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7427. doi:10.3390/ijms21197427.
184. Singh, PK, Preus, L, Hu, Q, et al. Serum MiRNA expression patterns that predict early treatment failure in prostate cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5:824–840. doi:10.18632/oncotarget.1776
185. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular MiRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* 2019;30(4):656-673. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.011
186. Thomas MJ, Fraser DJ, Bowen T. Biogenesis, Stabilization, and Transport of MiRNAs in Kidney Health and Disease. *Noncoding RNA.* 2018;4(4):30. doi:10.3390/ncrna4040030.
187. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MiRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
188. Geekiyanage H, Rayatpisheh S, Wohlschlegel JA, Brown R Jr, Ambros V. Extracellular MiRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(39):24213-24223. doi:10.1073/pnas.2008323117.
189. Zhang Q, Wang W, Zhou Q, et al. Roles of circRNAs in the tumour microenvironment. *Mol Cancer.* 2020;19(1):14. doi:10.1186/s12943-019-1125-9
190. De Crea C, Raffaelli M, Sessa L, et al. Actual incidence and clinical behaviour of follicular thyroid carcinoma: an institutional experience. *Sci. World. J.* 2014;2014:952095. doi:10.1155/2014/952095
191. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1-133. doi:10.1089/thy.2015.0020
192. Rosignolo F, Memeo L, Monzani F, et al. MiRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. *Int J Oncol.* 2017;50(5):1767-1777. doi:10.3892/ijo.2017.3960.
193. Mazeh H, Deutch T, Karas A, et al. Next-generation sequencing identifies a highly accurate MiRNA panel that distinguishes well-differentiated thyroid cancer from benign thyroid nodules. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American association for cancer research. Cosponsored. Am. Soc. Prev. Oncol.* 2018;27(8):858–863. doi:10.1158/1055-9965
194. Aquino-Jarquín G. Emerging Role of CRISPR/Cas9 Technology for MiRNAs Editing in Cancer Research. *Cancer Res.* 2017;77:6812–6817. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2142
195. Silaghi CA, Lozovanu V, Silaghi H, et al. The Prognostic Value of MiRNAs in Thyroid Cancers-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel).* 2020;12(9):2608. doi:10.3390/cancers12092608

196. Simonson B, Das S. MiRNA Therapeutics: The Next Magic Bullet? *Mini Rev. Med. Chem.* 2015;15:467–474. doi:[10.2174/1389557515666150324123208](https://doi.org/10.2174/1389557515666150324123208)
197. Misiak D, Hagemann S, Bell JL, et al. The MiRNA Landscape of MYCN-Amplified Neuroblastoma. *Front Oncol.* 2021;11:647737. doi:10.3389/fonc.2021.647737.
198. Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, et al. MiRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(13):20881–20894. doi: [10.18632/oncotarget.14930](https://doi.org/10.18632/oncotarget.14930)
199. Reda El, Sayed S, Cristante J, et al. MiRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers (Basel).* 2021;13(11):2680. doi:10.3390/cancers13112680
200. Guo F, Wang CY, Wang S, et al. Alteration in gene expression profile of thymomas with or without myasthenia gravis linked with the nuclear factor-kappaB/autoimmune regulator pathway to myasthenia gravis pathogenesis. *Thorac Cancer.* 2019;10(3):564-570. doi:[10.1111/1759-7714.12980](https://doi.org/10.1111/1759-7714.12980).
201. Takakuwa T, Nomura S, Matsuzuka F, Inoue H, Aozasa K. Expression of interleukin-7 and its receptor in thyroid lymphoma. *Lab Invest.* 2000;80(10):1483-90. doi:[10.1038/labinvest.3780157](https://doi.org/10.1038/labinvest.3780157).



## 9. Opinia Komisji Bioetycznej

### OPINIA

**nr. 122.6120.17.2016 z dnia 28 stycznia 2016 roku**

Na zebraniu w dniu 28 stycznia 2016 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 15.01.2016 r.

złożonym:

przez kierownika tematu: **dr hab. med. Marcin Barczyński**

zatrudnionego w:

**III Katedra i Klinika**

**Chirurgii Ogólnej UJCM**

**31 – 202 Kraków, ul. Prądnicka 35-37**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Ocena ekspresji miRNA w osoczu oraz w tkance guza u chorych z rozpoznaniem biopsyjnym *podejrzenie nowotworu pęcherzykowego tarczycy* w poszukiwaniu biomarkerów różnicujących zmiany łagodne i złośliwe przed zabiegiem operacyjnym.

#### Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania.
2. Protokół zabezpieczenia materiału.
3. Informacja dla uczestnika badania – grupa badana.
4. Świadoma i dobrowolna zgoda pacjenta na udział w badaniu.
5. Formularz zgody na wykonywanie badań genetycznych.
6. Lista piśmiennictwa.
7. Życiorys naukowy wnioskodawcy.
8. Formularz zgody pacjenta odnośnie ochrony danych osobowych.
9. Ankieta genetyczna
10. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJ/UJCM.

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanych badań - na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

1/ obowiązek uzyskania pisemnej zgody każdej osoby wyrażającej wolę (gotowość) udziału w danym eksperymencie, zgodnie z obowiązującym przepisami,

2/ obowiązek przedstawienia Komisji:

- wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
- zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
- sprawozdania w toku przeprowadzanych badań - co sześć miesięcy,
- raportu końcowego.

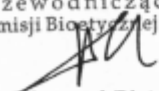
**Badanie może być prowadzone do dnia 28 stycznia 2017 roku.**

**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi.**

**Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, dnia 28 stycznia 2016 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

  
Prof. dr hab. n. med. Piotr Thor



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

ul. Grzegorzeczka 20

PL 31-531 Kraków

tel. +48 (12) 433 27 39

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ UJ  
DO WYŁĄCZNEGO WYKORZYSTANIA  
DLA CELÓW STATUTOWYCH  
UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

## 10. Oświadczenia współautorów

Kraków, dnia 20.03.2023r

Prof. dr hab. n. med. Marcin Barczyński  
Klinika Chirurgii Endokrynologicznej  
III Katedra Chirurgii Ogólnej UJ CM  
.....  
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: .....  
Świrta J, Romaniszyn M, Barczyński M. Czynniki ryzyka złośliwości zmian ogniskowych tarczycy zweryfikowanych w biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej jako „podejrzanie nowotworu pęcherzykowego”. Wiad Lek. 2020;73(7):1323-1329. PMID: 32759413  
.....

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

- opracowaniu koncepcji pracy
- weryfikacji danych i ich analizy statystycznej
- opracowaniu i interpretacji wyników
- korekcie tekstu pracy
- finalnej akceptacji tekstu pracy

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek Jarosława Szymona Świrte jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jarosława Szymona Świrty polegający na\*\*:

- opracowaniu koncepcji pracy
- zbieraniu danych i ich analizie statystycznej
- opracowaniu wyników i napisaniu pracy
- korekcie manuskryptu i jego finalizacji

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 20.03.2023r

Prof. dr hab. n. med. Marcin Barczyński  
Klinika Chirurgii Endokrynologicznej  
III Katedra Chirurgii Ogólnej UJ CM

.....  
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*.....  
Świrta J, Romaniszyn M, Barczyński M. Wpływ elektywnej limfadenektomii przedziału VI  
szy u chorych z rozpoznaniem cytologicznym podejrzenie nowotworu pęcherzykowego  
tarczycy na ocenę stopnia zaawansowania choroby nowotworowej i ryzyko powikłań  
chirurgicznych. Wiad Lek. 2020;73(4):629-637. PMID: 32731688

.....  
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie  
badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

- opracowaniu koncepcji pracy
- weryfikacji danych i ich analizy statystycznej
- opracowaniu i interpretacji wyników
- korekcie tekstu pracy
- finalnej akceptacji tekstu pracy

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek Jarosława Szymona Świrte  
jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych  
w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje  
indywidualny wkład lek Jarosława Szymona Świrty polegający na\*\*:

- opracowaniu koncepcji pracy
- zbieraniu danych i ich analizie statystycznej
- opracowaniu wyników i napisaniu pracy
- korekcie manuskryptu i jego finalizacji

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, March 20, 2023

Prof. Marcin Barczyński, MD, PhD  
Department of Endocrine Surgery  
Third Chair of General Surgery JU MC

.....  
(title, name and surname, affiliation)

#### Co-authorship statement

As a co-author of the publication\*: .....  
Świrta JS, Wątor G, Seweryn M, Kapusta P, Barczyński M, Wolkow P. Expression of micro-  
ribonucleic acids in thyroid nodules and serum to discriminate between follicular  
adenoma and cancer in patients with a fine needle aspiration biopsy classified as suspicious  
for follicular neoplasm: A preliminary study [published online as ahead of print  
on March 10, 2023]. Adv Clin Exp Med. 2023. doi:10.17219/acem/160003

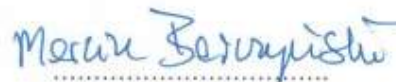
.....  
I declare that my own substantial contribution to this publication consists of\*\*:

- Research concept and design,
- Data analysis and interpretation,
- Critical revision of the article,
- Final approval of the article,

Hereby, I agree to submit the above-mentioned publication by **Jarosław Szymon Świrta, MD**  
as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published  
in scientific journals.

I declare that an independent and identifiable part of the abovementioned publication shows  
individual contribution of **Jarosław Szymon Świrta, MD** consisting of\*\*:

- Research concept and design
- Collection and/or assembly of data,
- Data analysis and interpretation,
- Writing the article,
- Final approval of the article.



.....  
(co-author's signature)

Kraków, 22.02.2023 r.

Dr Przemysław Kapusta  
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: *Expression of micro-RNA in thyroid nodules and serum to discriminate follicular adenoma and cancer in patients with fine needle aspiration biopsy verified as "suspicious for follicular neoplasm" - preliminary study* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

- analizie danych i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu
- zatwierdzenie ostatecznej wersji manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek **Jarosław Szymon Świrta** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych

w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek **Jarosław Szymon Świrta** polegający na\*\*:

- opracowaniu pomysłu badań i stworzeniu hipotezy badawczej
- opracowaniu koncepcji badań
- pobraniu próbek oraz danych klinicznych od pacjentów, wykonaniu pomiarów
- opracowaniu i interpretacji wyników
- przygotowaniu manuskryptu pracy



(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Miejscowość, dnia 22 II 2023

Dr n. med. Gracjan Wątor, Ośrodek Genomiki Medycznej – OMICRON, UJCM

.....  
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*:

"Expression of micro-ribonucleic acids in thyroid nodules and serum to discriminate between follicular adenoma and cancer in patients with a fine needle aspiration biopsy classified as suspicious for follicular neoplasm: A preliminary study" .

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

- zaplanowanie badania
- zebranie i opracowanie danych
- analiza danych i interpretacja
- pisanie artykułu
- ostateczna korekta artykułu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek Jarosława Świrę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jarosława Świrę polegający na\*\*\*:

- zaplanowanie badania
- zebranie i opracowanie danych
- analiza danych i interpretacja
- pisanie artykułu
- ostateczna korekta artykułu

  
.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Kraków, dnia 13 marca 2023

Dr med. Paweł Wołkow  
Ośrodek Genomiki Medycznej OMICRON  
Wydział Lekarski UJ CM

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "Expression of micro-ribonucleic acids in thyroid nodules and serum to discriminate between follicular adenoma and cancer in patients with a fine needle aspiration biopsy classified as suspicious for follicular neoplasm: A preliminary study" Jarosław Szymon Świrta, Gracjan Wątor, Michał Seweryn, Przemysław Kapusta, Marcin Barczyński, Paweł Wołkow; Adv Clin Exp Med. 2023 Mar 10. doi: 10.17219/acem/160003

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

- analizie i interpretacji danych
- krytycznej rewizji tekstu artykułu
- końcowej aprobacie artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr/lek Jarosława Szymona Świrte jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr/lek Jarosława Szymona Świrty polegający na\*\*:

- opracowaniu koncepcji i projektu badań
- zebraniu danych i przygotowaniu ich do analizy
- napisaniu artykułu
- końcowej aprobacie artykułu



.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Place/date...Kraków, 13. Feb. 2023..

.....Michał Romaniszyn, MD, PhD...  
(title, name and surname, affiliation)

#### Co-authorship statement

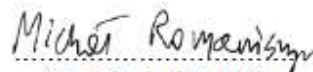
As a co-author of the publication\*: RISK FACTORS OF MALIGNANCY IN PATIENTS WITH FINE NEEDLE ASPIRATION BIOPSY RESULTS INTERPRETED AS "SUSPICIOUS FOR FOLLICULAR NEOPLASM", Wiađ Lek. 2020;73(7):1323-1329, I declare that my own substantial contribution to this publication consists of\*\*:

- Work concept and design,
- Data collection and analysis,
- statistical analysis,

Hereby, I agree to submit the above-mentioned publication by MSc/ MD...Jarosław Szymon Świrta...as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published in scientific journals.

I declare that an independent and identifiable part of the abovementioned publication shows individual contribution of MSc/ MD ... Jarosław Szymon Świrta.....consisting of\*\*:

- Work concept and design,
- Data collection and analysis,
- Responsibility for statistical analysis,
- Writing the article,
- Critical review,

  
(co-author's signature)

\* provide title, journal, volume, year, pages

\*\*e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript



Place/date...Kraków, 13. Feb. 2023..

.....Michał Romaniszyn, MD, PhD...  
(title, name and surname, affiliation)

#### Co-authorship statement

As a co-author of the publication\*: THE IMPACT OF ELECTIVE CENTRAL LYMPH NODE DISSECTION ON POSTOPERATIVE PATHOLOGICAL STAGING AND SURGICAL COMPLICATION RATE IN PATIENTS WITH RESULTS OF FINE NEEDLE ASPIRATION BIOPSY SUSPICIOUS FOR FOLLICULAR NEOPLASM OF THYROID, Wiad Lek. 2020;73(4):629-637, I declare that my own substantial contribution to this publication consists of\*\*:

- Work concept and design,
- Data collection and analysis,
- Responsibility for statistical analysis,
- Creation of figures
- Writing the article

Hereby, I agree to submit the above-mentioned publication by MSc/ MD...Jarosław Szymon Świrta...as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published in scientific journals.

I declare that an independent and identifiable part of the abovementioned publication shows individual contribution of MSc/ MD .....Jarosław Szymon Świrta.....consisting of\*\*:

- Work concept and design,
- Data collection and analysis,
- Responsibility for statistical analysis,
- Writing the article,
- Critical review,

*Michał Romaniszyn*  
(co-author's signature)

\* provide title, journal, volume, year, pages

\*\*e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript