



ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

მედიცინის ფაკულტეტი

სადოქტორო პროგრამა: „კლინიკური და ტრანსლაციური მედიცინა“

**თამუნა გვიანიშვილი**

**ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური მიკროკარცინომა:**

**ჰისტოპათოლოგია, იმუნოჰისტოქიმია, პროგნოზი**

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

წარმოდგენილი დისერტაციის

**ავტორეფერატი**

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი პროფესორი ლიანა გოგიაშვილი

თბილისი

2022 წელი

## შესავალი

### საკითხის კვლევის აქტუალობა

ფარისებრი ჯირკვლის ავადობის მაჩვენებლები ბოლო წლებში საგრძნობლად იზრდება, რასაც იწვევს: ბიოსფეროს რადიაციული დაბინძურება, ტექნოლოგიური პროგრესი; იოდის დეფიციტი სასმელ წყალსა და საკვებში; მედიკამენტების, განსაკუთრებით იოდის შემცველი პრეპარატების უსაფუძვლო ფართო მოხმარება; რადიოთერაპია სიმსივნური წარმონაქმნების მკურნალობის პროცესში; ავადობის მაჩვენებლების ზრდას ასევე ხელს უწყობს სადიაგნოსტიკო ტექნოლოგიების დანერგვა, როგორცაა: სკრინინგის სახელმწიფო პროგრამები, წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსია (FNA), ულტრაბგერითი გამოკვლევა და სხვა არაინვაზიური კვლევის მეთოდები [Kakudo,2013; Dikbas,2019].

ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნეები, სხვა ორგანოების სიმსივნეებთან შედარებით, უფრო იშვიათია. სტატისტიკურად: ყველა ლოკალიზაციის კიბოს შორის დაფიქსირდა <1%, ლეტალობის მაჩვენებელი არ აღემატება 0,5%-ს. 100 000 მოსახლეზე ყოველწლიურად აღინიშნება 0,5-10 ახალი შემთხვევა. American Cancer Society-ის მონაცემებით აშშ-ში ყოველწლიურად დიაგნოსტირდება 18000 შემთხვევა, კვდება 1200 ადამიანი.

ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნეები, ძირითადად, ვლინდება კვანძოვანი ჩიყვის მქონე პაციენტების გამოკვლევის დროს, ნოდულური წარმონაქმნების შემთხვევათა 1-4%-ში.

დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის საქართველოს ეროვნული ცენტრის სტატისტიკური ცნობარის თანახმად, 2020 წელს ენდოკრინული სისტემის ორგანოებზე ჩატარდა 2131 ოპერაცია, აქედან 2007 ჩარევა განხორციელდა ფარისებრი ჯირკვალზე. ქალებში რეგისტრირებული ავთვისებიანი ახალწარმონაქმნებიდან ფარისებრი ჯირკვლის ნეოპლაზია მეორე ადგილს იკავებს მუშუს კიბოს შემდეგ, ხოლო 2015 წლიდან კი ფარისებრი ჯირკვლის კიბო სტაბილურად მეორე ადგილზეა კიბოს ახალი შემთხვევების ყოველწლიურ მონაცემებში. 2020 წელს

კიბოს აღრიცხული 9435 ახალი შემთხვევიდან 821 შემთხვევა არის ფარისებრი ჯირკვლის კარცინომა ( $\approx 8,7\%$ ) [საქართველო სტატისტიკური ცნობარი 2020, 2021].

ლიტერატურის მონაცემებით, პაპილურ კარცინომას (PTC) სიხშირით უჭირავს პირველი ადგილი ფარისებრი ჯირკვლის ყველა ავთვისებიან სიმსივნეთა შორის, ყველაზე ხშირია ორივე სქესის 20-50 წლის ასაკობრივ ჯგუფში, ხშირად წინ უძღვის როგორც ბუნებრივი, ასევე სამედიცინო რადიაციული კონტაქტი. PTC-ს ძირითად სტრუქტურულ ელემენტებს წარმოადგენს ატიპური ფოლიკულური უჯრედები და ცისტურად ტრანსფორმირებული დვრილისებრი (პაპილური) გამონაზარდები. ეს უკანასკნელი შეიძლება ჩაზრდილი იყოს ცისტის კედელში, სიმსივნის კაფსულაში, კისრის რბილ ქსოვილებში [Berber, 2014].

თანამედროვე კვლევების მიხედვით, ფარისებრი ჯირკვლის არასიმსივნური და ანთებითი დაავადებების პათომორფოზის საკითხები კლინიკური ენდოკრინოლოგიისა და პათოლოგიის აქტუალურ პრობლემად რჩება. მრავალრიცხოვან მიმოხილვით სტატიებში საკმარისად დაწვრილებით და სხვადასხვა პოზიციებიდან განხილულია კლინიკური თავისებურებანი, დიაგნოსტიკის საკითხები და მკურნალობა. ინტენსიურია კვლევები ზრდის ფაქტორების (growth factors) როლის შესახებ ფარისებრი ჯირკვლის „კლასიკური“ და აუტოიმუნური კვანძოვანი პროცესების განვითარებაში [Zimmermann, 2004; McHenry, 2011; Rurua, 2013; Eszlinger, 2001; Mc Henry, 1998].

პაპილური მიკროკარცინომა (PTMC) არის მცირე ზომის პაპილური თიროიდული კარცინომა (PTC), რომლის დიამეტრიც 1 სმ. ან უფრო ნაკლებია. უკანასკნელი რამდენიმე ათწლეულის მანძილზე მკვეთრად გაიზარდა PTC-ის სიხშირე, ამასთან PTMC-ის გამოვლენაც ზრდის მაღალი მაჩვენებელით ხასიათდება. მკვლევარების უმრავლესობა ასახავს სუბკლინიკური ფორმების გამოვლენათა ზრდას, როგორცაა დაბალი რისკის კარცინომების ულტრაბგერითი და ასპირაციულ-ბიოფსიური მეთოდით (FNA) აღებული მასალის ციტოლოგიური დიაგნოსტიკა. ამდენად, პაპილური მიკროკარცინომა (PTMC) განიხილება როგორც პაპილური თიროიდული კარცინომის (PTC) ყველაზე გავრცელებული კლინიკურ-მორფოლოგიური ვარიანტი და ქირურგიული გზით ნამკურნალები ყველა თიროიდული კარცინომის შემთხვევათა

თითქმის 50% [Kakudo, 2013].

PTMC წარმოადგენს ავთვისებიან სიმსივნეს, რომლის დროსაც მეტასტაზები ლიმფურ კვანძში ვლინდება შემთხვევათა 50%-ში. კარცინომის მიკროკერები ხშირად გვხვდება, როგორც ინტრათიროიდული მეტასტაზების, ასევე მულტიფოკალური ექსტრათიროიდული კერების სახით, აღწერილია ასევე სიმსივნური ქსოვილის იმპლანტები ფარისებრი ჯირკვლის მოპირდაპირე წილში. წარმოადგენს რა მაღალდიფერენცირებულ სიმსივნეს, ლეტალობის მაჩვენებელი საკმაოდ დაბალია, დიაგნოზის დასმიდან მომდევნო 10 წლის განმავლობაში შეადგენს 1%-ზე ნაკლებს.

ინტრათიროიდული მეტასტაზებისა და ფარისებრი ჯირკვლის ნარჩენ ქსოვილში მულტიფოკალური PTMC-ის განვითარების მაღალი სიხშირე განაპირობებს ქირურგიულ ტაქტიკას - უპირატესობა მიენიჭოს ტოტალურ თიროიდექტომიას, ნაცვლად ლობექტომიისა [Kakudo, 2013].

ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნეების უმნიშვნელოვანესი დიაგნოსტიკური კრიტერიუმია პაპილური თიროიდული კარცინომის უჯრედთა ბირთვის თვისებები (Papillary thyroid carcinoma (PTC) nuclear features (PTC-N)). PTC-N არის PTC-ის დიაგნოზის „ოქროს“ სტანდარტი, მაშინაც კი, თუ კერის დიამეტრი 1მმ-ზე ნაკლებია. PTC-ს ბიოლოგიური მახასიათებლების და კლინიკური სტადიის დადგენა დიდწილად განსაზღვრავს სიმსივნის ბიოლოგიურ „ქცევას“. PTMC-ის უმრავლესობა შემოსაზღვრულია ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილით, ახასიათებს კეთილსაიმედო პროგნოზი [Kakudo, 2012; LiVolsi, 2004; Kakudo, 2013; Pacini, 2012; Liu, 2011; Noguchi, 2008].

მნიშვნელოვანია, რომ WHO (World Health Organization) მიერ შემუშავებული კლასიფიკაციით, არ არსებობს პაპილური თიროიდული კარცინომის ცნობილი წინასწარი დაზიანება ე.წ. „პრეკანცერი“. ადრეული მცირე PTC შეიძლება წარმოიქმნას ორ სხვადასხვა სიტუაციაში: ფარისებრი ჯირკვლის ნორმულ პარენქიმაში (de novo cancer) ან ფარისებრი ჯირკვლის კვანძში (cancer in adenoma). PTMC, ჩვეულებრივ, არის მცირე PTC, რომელიც ვითარდება ფარისებრი ჯირკვლის ნორმულ პარენქიმაში ან ფარისებრი ჯირკვლის არანეოპლაზიური დაზიანების დროს, როგორცაა ჰამიმოტოს დაავადება. ფოკალური PTC-N ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებისას,

ჩვეულებრივ, გამორიცხავს PTMC-ს, რადგან ყველა კვანძი, ტრადიციულად, დიაგნოსტიკურად, როგორც კაფსულირებული პაპილური კარცინომა (როგორც ზოგადი ტიპი ან ფოლიკულური ვარიანტი) ან ე.წ. მაღალდიფერენცირებული სიმსივნე გაურკვეველი ავთვისებიანი პოტენციალით (well-differentiated tumors of uncertain malignant potential (WDT-UMP)). აქედან გამომდინარე, PTMC-ები, მცირე სიმსივნეები PTC-N-ით არაკვანძოვან ფარისებრ ჯირკვალში, შეიძლება განხილული იყოს როგორც PTC-ის ადრეული ფაზა ან PTC-ის წინამორბედი დაზიანება (პრეკანცერული, მოსაზღვრე დაზიანება ან grey zone lesion). ამგვარად, PTMC კონცეფცია წარმოდგება როგორც დაზიანება, რომელიც წინ უსწრებს PTC-ის კლასიკურ ვარიანტს ლეტალობის „ფიქსირებული“ (1-4%) მაჩვენებლებით [LiVolsi, 2004;Kakudo, 2013; Liu, 2011].

ზოგიერთი მკვლევარი თვლის, რომ ჰაშიმოტოს თიროიდიტი (HT) არის პაპილური თიროიდული კარცინომის (PTC) შესაძლო რისკ-ფაქტორი, ასევე შეიძლება იყოს ავთვისებიანი ლიმფომის პრედიქტივ. PTC-სა და ფოლიკულური ნეოპლაზიების დამახასიათებელი ციტოლოგიური ნიშნები ხშირად ვლინდება HT-ის დროს, სახელდობრ, ფარისებრი ჯირკვლის ასპირაციულ-ბიოფსიური (FNA) მასალის ციტოლოგიური ან პოსტოპერაციული ჰისტოლოგიური კვლევის დროს. თუმცა, მექანიზმები და თეორიული ბაზისი ასეთი ცვლილებებისა უცნობია. ეს ეხება ატიპური უჯრედების არსებობას HT-ის პარენქიმაში. მით უმეტეს, რომ ფოლიკულური ეპითელიუმის დისპლაზიის (FED) საკითხები და მოლეკულური მარკერები არ არის დასაბუთებული კონკრეტული კვლევების შედეგებით [Wakasa, 2013].

PTMC-ს კლინიკური დიაგნოზი ძირითადად დამოკიდებულია ჰისტოპათოლოგიურ სურათზე. თუმცა, ასეთი გამოკვლევის სპეციფიკა და სიზუსტე ჩვეულებრივ დაბალია PTMC-ს ინვაზიურობის გამო. ამდენად, აუცილებელია სენსიტიური და სპეციფიური სიმსივნური მარკერებისა და პრედიქტორების გამოვლენა და დასაბუთება PTMC-ს დიაგნოსტიკისა და პროგნოზიკული შეფასების დროს.

## კვლევის მიზანი

ზემოაღნიშნულის გათვალისწინებით, განისაზღვრა კვლევის მიზანი:

ფარისებრი ჯირკვლის მიკროკარცინომის ჰისტოპათოლოგიური და მოლეკულურ-ბიოლოგიური პროფილის შესწავლა/სისტემატიზაცია ფარისებრი ჯირკვლის პირობით პრეკანცერული ფონური პროცესების სტრუქტურული დასაბუთებისა და პროგნოზირების მიზნით.

## ამოცანები:

1. იმუნოჰისტოქიმიური მარკერების ექსპრესიის შედარებითი შეფასების გზით ლიმფოციტური და აუტოიმუნური თიროიდიტების ფონზე განვითარებული PTMC-ის პროგნოზული კრიტერიუმების შერჩევა (ინვაზია, მეტასტაზი, რეციდივი).
2. გამოვლენა და დასაბუთება შესაძლო სტრუქტურული წინაპირობებისა, ასევე ფოლიკულური ეპითელიუმის დისპლაზიის (FED) შეფასება აუტოიმუნურ თიროიდიტსა და მის ფონზე განვითარებული პაპილური მიკროკარცინომის ქსოვილში.

## გამოკვლევის მასალა და მეთოდები

გამოკვლევის მონაცემთა ბაზას წარმოადგენს ორივე სქესის პაციენტებიდან მიღებული ოპერაციული მასალა ტოტალური თიროიდექტომიის, ფარისებრი ჯირკვლის ცალმხრივი ლობექტომიის და ნაწილობრივი რეზექციის შემდეგ (n=68). ასევე გამოყენებულია რეტროსპექტული მასალა (n=48). მასალა მიღებულია თბილისის კლინიკებიდან და დასავლეთ საქართველოს ინტერვენციული მედიცინის ეროვნული ცენტრიდან.

პაციენტებს ჩაუტარდათ ტოტალური თიროიდექტომია სხვადასხვა მიზეზით. მათ შორის: ფარისებრი ჯირკვლის ზომაში მომატება, ტრაქეის სტენოზი სუნთქვის გაძნელებით გადიდებული ფარისებრი ჯირკვლის გამო, ტკივილი, კვანძოვანი დაზიანება, პაპილური კარცინომა.

კლინიკური მონაცემები, ლაბორატორიული და ულტრასონოგრაფიული მაჩვენებლები, მკურნალობისა და ოპერაციული ჩარევის მეთოდები მიღებულია შესაბამისი კლინიკური დოკუმენტებიდან პაციენტის წერილობითი ინფორმირებული თანხმობით. ყველა დაკვირვება და მანიპულაცია ჩატარდა ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოეთიკური კომისიის მოთხოვნების შესაბამისად ჰელსინკის ეთიკური პრინციპების დეკლარაციაზე დაყრდნობით [WMA, 2013].

### **ჰისტოლოგიური კვლევის მეთოდები**

ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა უბნებიდან აღებული ქსოვილოვანი ნიმუშები ფიქსირდებოდა 10% ფორმალინის ბუფერულ ხსნარში (pH=7.35), აღმავალი კონცენტრაციის სპირტებში. დეჰიდრატაციის შემდეგ მასალის ჩაყალიბება ხდებოდა პარაფინის ბლოკებში. სერიული ანათლები სისქით 5-7mm იღებებოდა ჰემატოქსილინითა და ეოზინით (H&E).

### **იმუნოჰისტოქიმიური კვლევის მეთოდები**

იმუნოჰისტოქიმიური კვლევა ჩატარდა p63, CD56, TTF-1, Cyclin D1 და S-100 ცილის ექსპრესიის აქტივობის გამოსავლენად ფარისებრი ჯირკვლის ყველა შესწავლილი დაზიანების დროს.

ცრუ დადებითი და ცრუ უარყოფითი შედეგების გამორიცხვის მიზნით იმუნოჰისტოქიმიური რეაქციები ჩატარდა განმეორებით რეჟიმში.

ჩვენს მასალაში ყველა შესწავლილი თიროიდული პათოლოგია დაყოფილია 6 ჯგუფად (ცხრილი N1).

ცხრილი N1. შემთხვევების რაოდენობა შესწავლილ ჯგუფებში.

პათოლოგია	შემთხვევების რაოდენობა
PTC	14
PTMC	12
HT	32
HT+PTC	8
RT	5
დტბ	45

ყველა ანათალი, როგორც წესი, აღებულია poly-L-lysine-თ დაფარულ სასაგნე მინაზე. იმუნოჰისტოქიმიური პროცედურები განხორციელდა ანტისხეულების მწარმოებლის პროტოკოლების დაცვით:

- 1) p63(ინკუბაციის დრო 20 წთ; clone 7JUL; განზავება 1:25; cat. no. PA0103; Leica Biosystems Newcastle Ltd.);
- 2) CD56 (ინკუბაციის დრო20 წთ; clone CD564; განზავება 1:25; cat. no. PA0191; Leica Biosystems Newcastle Ltd.);
- 3) TTF-1 antibodies (ინკუბაციის დრო30 წთ; clone SPT24;განზავება 1:100; Newcastle Ltd.);
- 4) CyclinD1 (ინკუბაციის დრო20 წთ; clone D-6; განზავება 1:25; Dako, Denmark);
- 5) ცილა S-100 (ინკუბაციის დრო30 წთ; clone RTU-S100p;განზავება 1:100; Leica Biosystems Newcastle Ltd.).

p63, CD56, TTF-1, CyclinD1 და ცილა S-100 ექსპრესიის ინტენსივობას ვითვლიდით ნახევრად რაოდენობრივი მეთოდით, შემდეგი სქემით: უარყოფითი (0), 1= $\leq$ 10%; 2=11-50%; 3=51-80%; 4= $>$ 80%



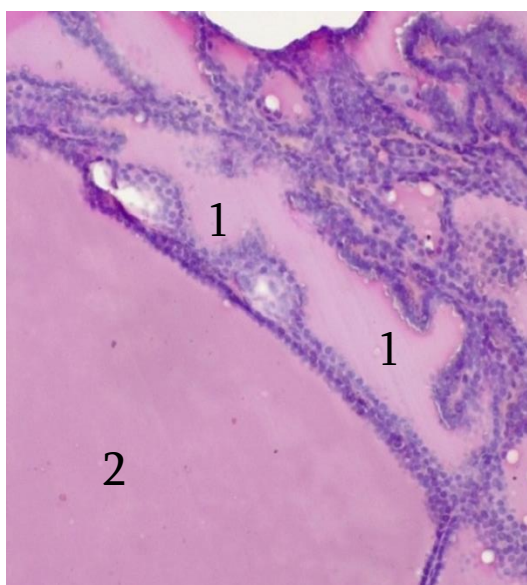
## სტატისტიკური ანალიზის მეთოდები

სტატისტიკური ანალიზისთვის გამოიყენებოდა პროგრამა Microsoft Excel 7.0, ასევე SPSS/PS ვერსია 21.0 Windows-თვის, ჯგუფებს შორის მონაცემების შედარებითი ანალიზი ჩატარდა სტიუდენტის t-ტესტის საშუალებით. კორელაციური კავშირები შესწავლილია პირსონის კოეფიციენტის გამოყენებით. თვისობრივი პარამეტრების სტატისტიკურად განაალიზებისთვის ჩართული იყო  $X^2$  კრიტერიუმი, Mann-Whitney „U“ ტესტი, ასევე მულტილინეარული რეგრესიული ანალიზის მეთოდი. შესადარებელ ჯგუფებს შორის ზღვარი  $p \leq 0.05$  ითვლებოდა სტატისტიკურად სარწმუნოდ.

## საკუთარი გამოკვლევის შედეგები

### დიფუზურ-ტოქსიკური ჩიყვის (დტჩ) ჰისტოლოგიური კვლევის შედეგები

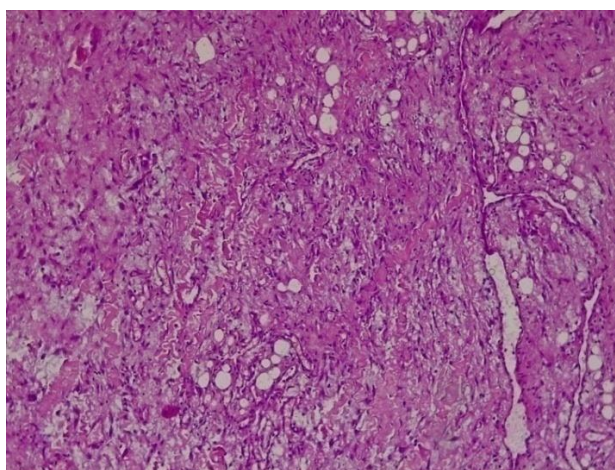
ჰემატოქსილინითა და ეოზინით (H&E) შეღებილ მასალაში დიფუზურ-ტოქსიკური ჩიყვის (დტჩ) დროს ფოლიკულების ზომების მკვეთრად გამოხატულ ჰეტეროგენობასთან ერთად აღსანიშნავია ფოლიკულების ამომფენი A-ტიპის თირეოციტების ჰიპერპლაზია, მსხვილი ბირთვი, ბირთვაკები. დამახასიათებელ ნიშანს წარმოადგენს ფოლიკულის სანათურის გაფართოება, ფოლიკულების ბაზალური მემბრანის გასქელება და უჯრედის პლაზმური მემბრანის მოდიფიკაცია, რაც გულისხმობს ზედაპირული მიკროხაოების, წანაზარდების, პაპილებისა და დატოტვილი სტრუქტურების ფორმირებას (სურათი N1).



სურათი N1. დიფუზურ-ტოქსიკური ჩიევი. 1 - პლაზმური მემბრანის მოდიფიკაცია - მიკროხაოები, წანაზარდები, პაპილები. 2 - ფოლიკულის სანათურის გაფართოება. H&E, X200.

### რიდელის თიროიდიტის (RT) ჰისტოლოგიური კვლევის შედეგები

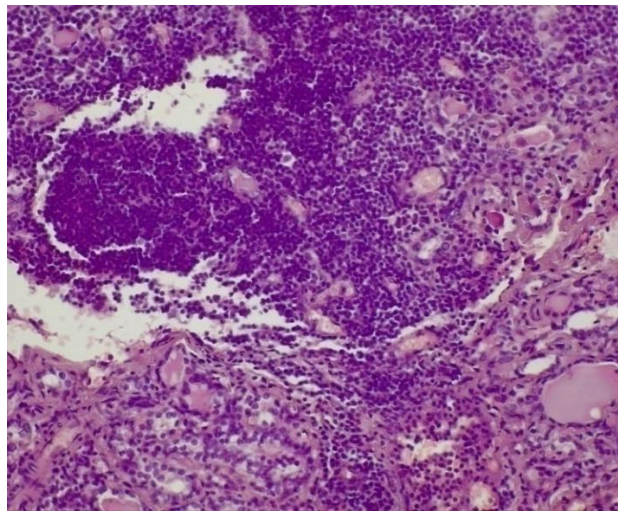
რიდელის თიროიდიტის უმნიშვნელოვანესი ჰისტოპათოლოგიური ნიშანია ფარისებრი ჯირკვლის პარენქიმის მიზანმიმართული ჩანაცვლება უხეში ფიბროზული შემაერთებელი ქსოვილით თანმხლები ჰორმონმაპროდუცირებელი უჯრედების რიცხვისა და ზომების შემცირება, ინვოლუცია. დამახასიათებელია მცირე ფოლიკულური სტრუქტურები, ზოგადი ძლიერი ფიბროზი (სურათი N2).



სურათი N2. რიდელის თიროიდიტი. ფარისებრი ჯირკვლის ფოლიკულების ინვოლუცია, პარენქიმის ჩანაცვლება უხეშობკოვანი ფიბროზული ქსოვილით. H&E, X100.

### ჰაშიმოტოს თიროიდიტის (HT) ჰისტოლოგიური კვლევის შედეგები

ჰაშიმოტოს თიროიდიტის H&E შედეგებში პრეპარატებზე აღინიშნება დიდი რაოდენობით ექსტენსიური ლიმფოციტური ინფილტრაციის კერები, რომლებიც აგრესიულად ჩაანაცვლებდნენ ჯირკვლოვან ელემენტებს, სჭარბობდნენ პლაზმური უჯრედები. პარალელურად, წარმოდგენილი იყო სტრომის მკვეთრი, უხეშოქკოვანი ფიბროზი, რაც მნიშვნელოვან განმასხვავებელ ნიშნებს წარმოადგენს HT-ის ფიბროზულ და ლიმფოციტურ ფორმებს შორის (სურათი N3).



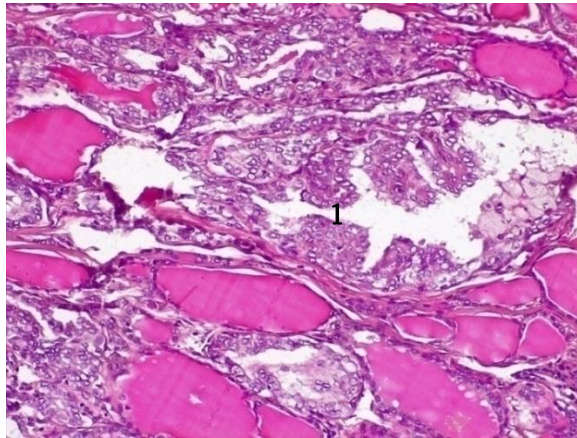
*სურათი N3. ჰაშიმოტოს თიროიდიტი. ლიმფოციტური უჯრედოვანი ინფილტრაციის მსხვილი კერა ფოლიკულებს შორის, სტრომის ფიბროზი ფოლიკულების ინვოლუციით და კომპრესიით. H&E, X200.*

### ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური კარცინომის (PTC) და მიკროკარცინომის (PTMC) ჰისტოლოგიური კვლევის შედეგები

H&E შედეგებში მასალაში პაპილური კარცინომისთვის დამახასიათებელია შემდეგი ცვლილებები:

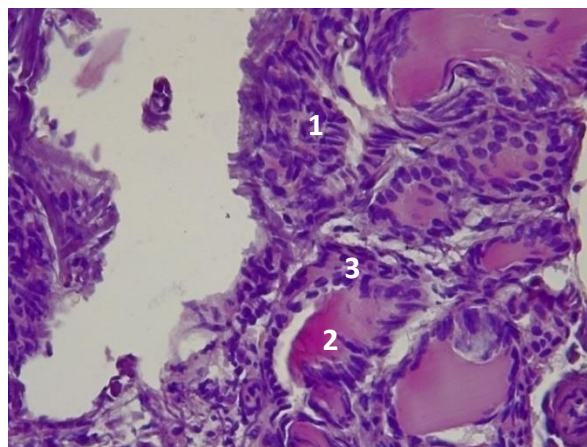
- ბირთვის ცვლილებები: ბირთვის ზომისა და ფორმის შეცვლა (გაფართოება, დაგრძელება).
- ქრომატინის მახასიათებლები: გამჭვირვალე ქრომატინი, მინისებური ბირთვები (Orphan Annie nuclei) (სურათი N4).
- ბირთვის მემბრანის რღვევა: არარეგულარული კონტური, ბირთვული ღარები და

ბირთვში ფსევდოინკლუზიები (ციტოპლაზმური ინვაგინაციები).



სურათი N4. ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური კარცინომა (კლასიკური ვარიანტი). გამჭვირვალე, მინისებრი ბირთვები (1) პაპილური ფორმის სტრუქტურებში. H&E, X200.

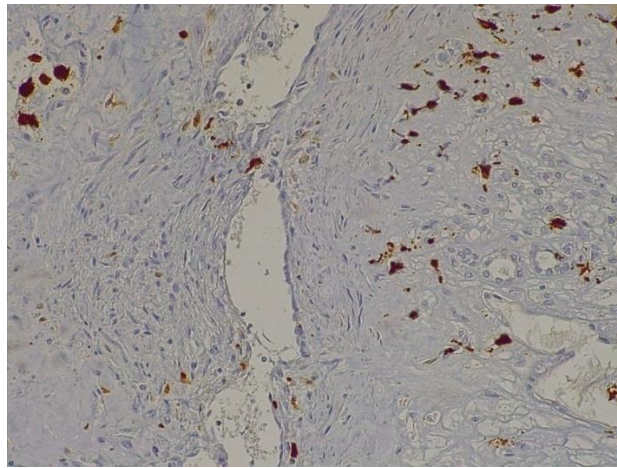
PTC-ს მასალაში გამოვლინდა აგრესიულ მიმდინარეობასთან ასოცირებული სიმსივნური უჯრედების ვარიანტები: როგორც ლურსმნისებრი, ასევე სვეტისებრი და თითისტარისებრი უჯრედები სიმსივნურ ველში პროლიფერაციის უბანში (სურათი N5), თუმცა, ზოგადად, მასალის ანალიზმა გვიჩვენა, რომ სჭარბობდა მაღალი უჯრედები და „ტრამვას ლიანდაგის“ მსგავსი სურათი. დასახელებული ცვლილებები მაქსიმალურად დემონსტრირებული იყო პაციენტებში, რომლებსაც აღენიშნებოდათ ე. წ. „ჰაშიმოტო-ტოქსიკოზის“ კლინიკური სურათი, მაღალი anti-TPO ანტისხეულების ტიტრის ფონზე.



სურათი N5. ჰაშიმოტოს თიროიდიტის ფონზე განვითარებული პაპილური კარცინომა.

სიმსივნურ ველში აღინიშნება მალიგნიზაციის რისკისთვის დამახასიათებელი უჯრედები: მაღალი (1), თითისტარისებრი (2), „მეწაღის ლურსმნისებრი“ (3) უჯრედები. H&E, X400.

ე. წ. B-უჯრედები, ონკოციტები (Hürthle cell) - სიმსივნური უჯრედები უხვი ეოზინოფილური ციტოპლაზმით, რომელიც ექსპრესირებს ნეიროექტოდერმულ მარკერს S100 ცილას (სურათი N6), რადგან ონკოციტები წარმოადგენენ ნერვული ქედიდან (neural crest) განვითარებულ სტრუქტურებს.



სურათი N6. S100 ცილის დიფუზურ-შერეული ექსპრესია პარაფოლიკულურ დომენში. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X200.

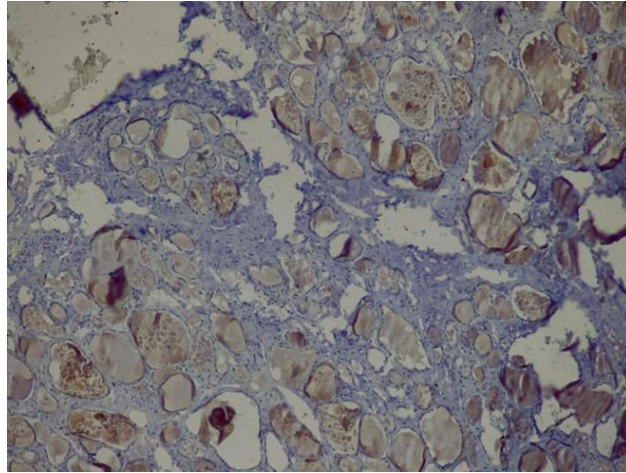
### დიფუზურ-ტოქსიკური ჩიყვის იმუნოჰისტოქიმიური კვლევის შედეგები

დტჩ-ს დროს ვლინდება p63-ის ნეგატიური ჩართვა. როგორც სხვა კვლევებიც გვიჩვენებს [Unger, 2003] p63-დადებითი უბნები, ჩვეულებრივ, გვხვდება ჰაშიმოტოს თიროიდიტის დროს, მაგრამ იშვიათია გრეივისის დაავადების შემთხვევაში.

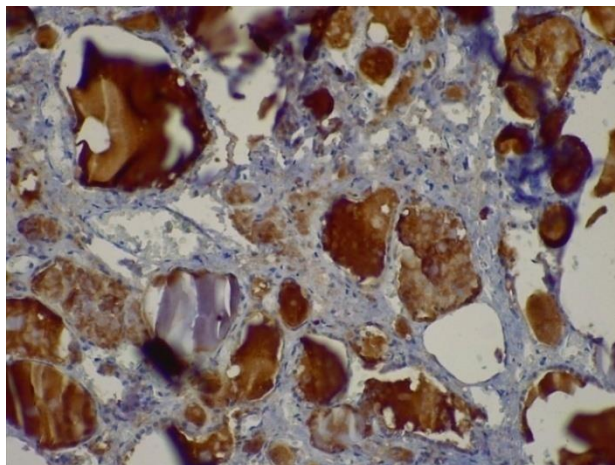
დიფუზური ტოქსიკური ჩიყვის დროს TTF-1 შეღებვის ინტენსივობა შეფასდა, როგორც თირეოციტების ბირთვებში ინტენსიური ექსპრესია (ჰაშიმოტოს თიროიდიტისგან განსხვავებით) და შეესაბამებოდა თირეოტროპული ჰორმონის (TSH) დაქვეითებულ რაოდენობას იმავე პაციენტების სისხლის შრატში.

## რიდელის თიროიდიტი (RT) იმუნოჰისტოქიმიური კვლევის შედეგები

RT-ის შემთხვევები (n=5) p63-ის და CD56-ის მიმართ პრაქტიკულად არეაქტიული იყო, შეიძლება ითქვას, რომ დაფიქსირდა სუსტი ფონური რეაქცია (სურათები N7;N8), რადგან ქსოვილში წარმოდგენილი იყო ექსტენსიური ფიბროზი.



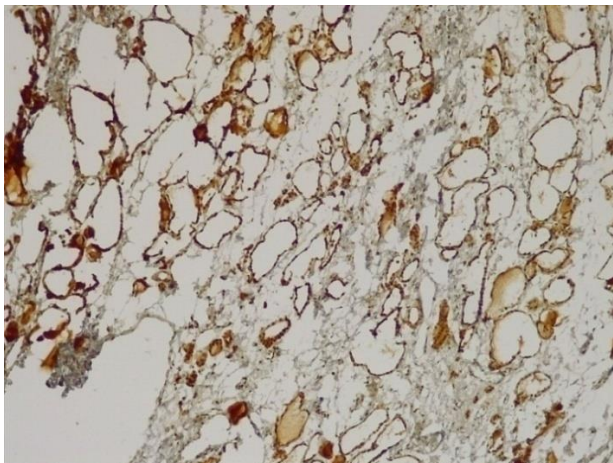
*სურათი N7. რიდელის თიროიდიტი. p63-ის უარყოფითი რეაქცია თირეოციტებში. ექსტენსიური ფიბროზის ცენტრში არის ნოდულური ჰიპერპლაზია p63-ის ფონური ექსპრესიით კოლოიდში. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X100.*



*სურათი N8. რიდელის თიროიდიტი. CD56-ის უარყოფითი რეაქცია ფარისებრი გირკვლის ქსოვილში, დიფუზური ექსპრესია კოლოიდში. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X200.*

RT-ის ხუთივე შესწავლილ შემთხვევაში დაფიქსირდა TTF-1-ის ფოკალური და დიფუზური ექსპრესიის კერები სტრომულ ფიბრობლასტებსა და კაპილარული კედლის

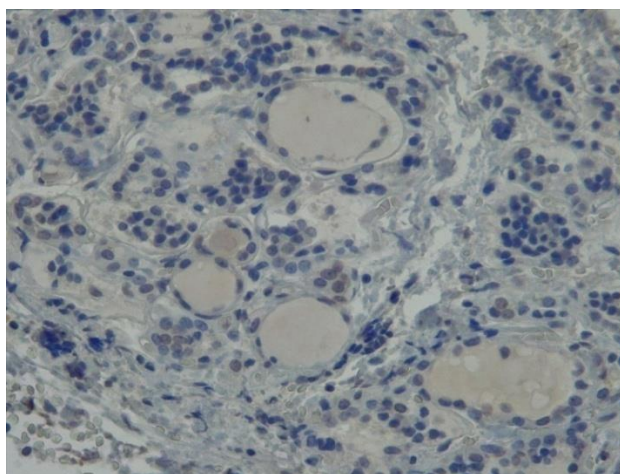
ენდოთელურ უჯრედებში კლასტერების სახით (სურათი N9).



სურათი N9. რიდელის თიროიდიტი. ფოლიკულურ უჯრედებში TTF-1-ის ძლიერი ექსპრესია. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X200.

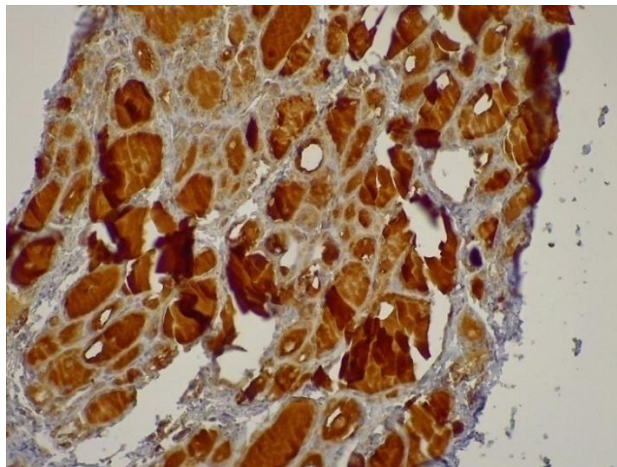
### ჰაშიმოტოს თიროიდიტი (HT) იმუნოჰისტოქიმიური კვლევის შედეგები

HT-ის 32 შემთხვევიდან 9 შემთხვევაში უჯრედების 70%-ში დაფიქსირდა p63-ის დიფუზური, სუსტი ზომიერამდე ექსპრესია, უპირატესად, კოლოიდში. 7 შემთხვევაში ჯირკვლის ქსოვილი იყო p63-ის მიმართ არეაქტიული (სურათი N10), ხოლო 16 შემთხვევაში (შემთხვევების 50%) ექსპრესია იყო ფოკალური დადებითი.



სურათი N10. ჰაშიმოტოს თიროიდიტი. ცილა p63-ის რეაქცია უარყოფითი ფოლიკულურ უჯრედებში. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X400.

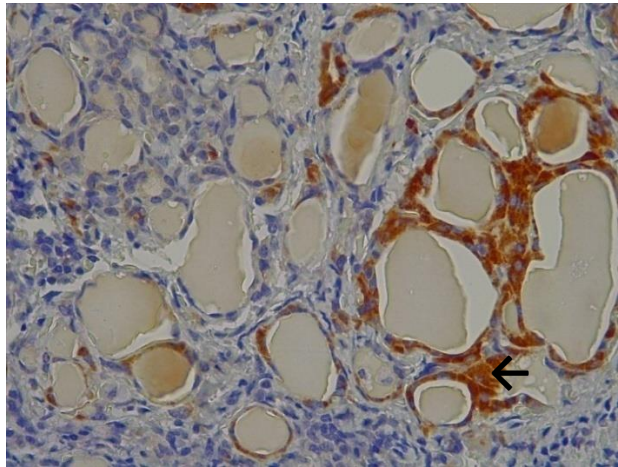
აღინიშნა CD56-ის მაღალი დიფუზური რეაქტიულობა თირეოციტებში და ძლიერი ჩართვა კოლოიდში (სურათი N11), ცალკეულ ფოლიკულურ უჯრედში გამოვლინდა სუსტი ზომიერამდე რეაქცია, განსაკუთრებით, კოლოიდსა და უჯრედის პრიმემბრანულ ზონებში.



*სურათი N11. ჰაშიმოტოს თიროიდიტი. CD56-ის დიფუზური მაღალი ექსპრესია თირეოციტებში, ფოლიკულთა კოლოიდში და კეროვანი ნოდულური ჰიპერტროფიის ცენტრში. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X200.*

Cyclin D1-ის კვლევაჲ ჰაშიმოტოს თიროიდიტის შემთხვევებში, როგორც წესი, გამოავლინა ნეგატიური ან ერთეული პოზიტიური უჯრედები. 32 შემთხვევიდან 25 შემთხვევაში გამოვლინდა მაღალი - ზომიერამდე ფოკალური აქტივობა, რომელიც დაემთხვა H&E შედეგებზე ნიმუშებს, რომლებშიც დადასტურებული იყო ფოლიკულური ეპითელიუმის დისპლაზიის (FED) უბნები. აღსანიშნავია ფოლიკულური ეპითელიური უჯრედების ბუდობრივი განლაგების უბნებში Cyclin D1-ის მაღალი ფოკალური აქტივობა (სურათი N12).

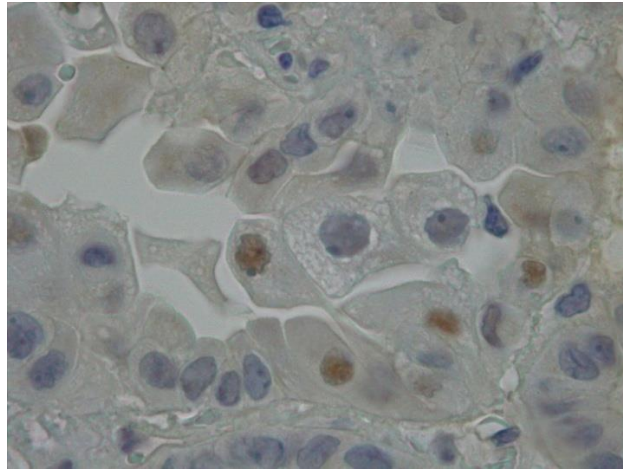




სურათი N12. ჰაშიმოტოს თიროიდიტი. ეპითელიუმის რეაქტიული ატიპიის უბნებში მაღალი უჯრედები მკვეთრად Cyclin D1 დადებითი (ისრით). იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X400.

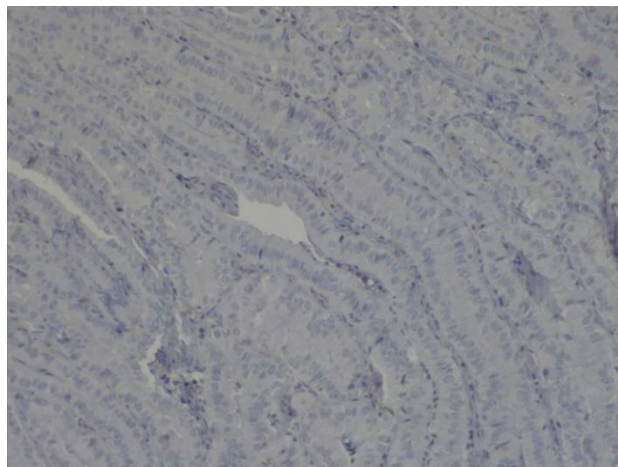
### ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური კარცინომის (PTC) და მიკროკარცინომის (PTMC) იმუნოჰისტოქიმიური კვლევის შედეგები

კლასიკური ტიპის პაპილური კარცინომის 26 შესწავლილ შემთხვევაში ნეოპლაზიური უჯრედების სტრუქტურა 9 შემთხვევაში წარმოდგენილი იყო უპირატესად მაღალი უჯრედებით. p63-ის აქტივობა შეფასდა როგორც ზომიერი. მიკროკარცინომის შემთხვევაში უჯრედების სტრუქტურის კერაში გამოვლინდა ბირთვების განსაკუთრებით მაღალი რეაქტიულობა p63 ცილის მიმართ, რაც, ლიტერატურის მონაცემებით, მიუთითებს პროცესის აგრესიული მიმდინარეობის რისკზე. მიკროსკოპის დიდ გადიდებაზე თვალსაჩინოა მიკროკარცინომის სიმსივნურ ველში ფოლიკულურ უჯრედთა ბირთვების პოლიმორფიზმი (სურათი N13).



სურათი N13. ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური მიკროკარცინომა. სიმსივნური უჯრედები გამსხვილებული, p63 მკვეთრად დადებითი. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X1000.

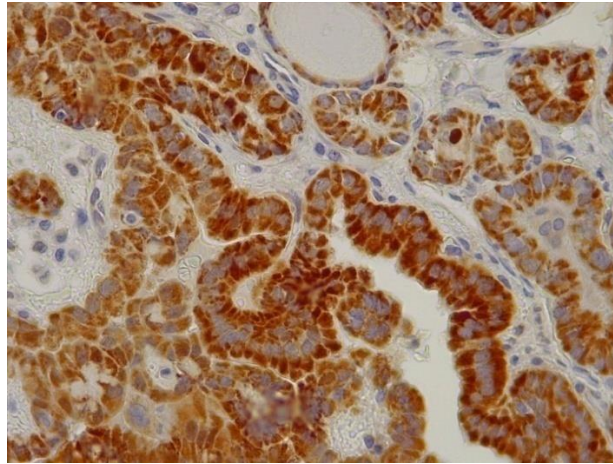
12 შემთხვევაში PTC-ის ქსოვილში გამოვლინდა CD56-ის არეაქტიული უბნები, განსაკუთრებით მაღალი უჯრედებისა (Tall cell) და ე.წ. „ტრამვას ლიანდაგის“ ("tram-track") მსგავსი განლაგების უბნებში (სურათი N14). დანარჩენ 14 შემთხვევაში CD56 გამოვლინდა კოლოიდში, ხოლო ფოლიკულური უჯრედები დარჩა არეაქტიული.



სურათი N14. ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური კარცინომა. CD56-ის არეაქტიული უბნები; „ტრამვას ლიანდაგი“. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X100.

Cyclin D1-ის კვლევა PTMC-ის სიმსივნურ ველში გამოავლინა დიფუზური მაღალი რეაქტიულობა პარენქიმული ქსოვილის უჯრედებში, ხოლო სტრომის ქსოვილი იყო

არეაქტიული (სურათი N15). იმუნომარკერის მაღალი ჩართულობა გამოვლინდა ფოლიკულურ ეპითელიუმში; სტრომა, კლასიკურ კარცინომაში, როგორც PTMC-ის შემთხვევაშიც, იყო უარყოფითი.



*სურათი N15. ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური მიკროკარცინომა. Cyclin D1 დიფუზური მაღალი რეაქტიულობა ფოლიკულური უჯრედების ციტოპლაზმაში. იმუნოპეროქსიდაზული რეაქცია, X400.*

## კვლევის შედეგების განხილვა

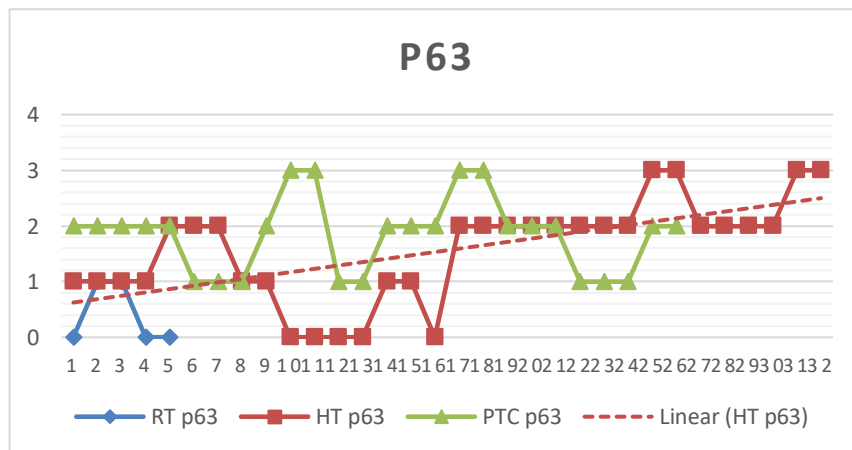
ჩვენს კლინიკურ მასალაში შესწავლილია PTC-ს 26 შემთხვევა (აქედან, 14 - PTC, 12 - PTMC). PTMC-ის 12 კლინიკური შემთხვევიდან 4 იყო სპორადული კიბო, ხოლო 8 შემთხვევა ჰაშიმოტოს თიროიდიტის (HT) ფონზე განვითარებული, რამაც განაპირობა ამ ორი პათოლოგიური პროცესისადმი განსაკუთრებული ინტერესი.

ჰაშიმოტოს თიროიდიტი, აუტოიმუნური ბუნების დაზიანება, ფარისებრი ჯირკვლის ყველაზე გავრცელებული ანთებითი დაავადება და ამავდროულად, ჰიპოთირეოზის ყველაზე გავრცელებული მიზეზი მოზრდილებში, არაერთი მკვლევარის აზრით, HT არის პაპილური თიროიდული კარცინომის (PTC) და ავთვისებიანი ლიმფომის რისკ ფაქტორი [Wakasa, 2013].

ჰაშიმოტოს თიროიდიტისას განვითარებული კეთილთვისებიანი ფოლიკულური უჯრედების მორფოლოგიური ცვლილებები შეიძლება დაემსგავსოს პაპილური თიროიდული კარცინომის დროს განვითარებულ ცვლილებებს. ჩვენს მასალაში

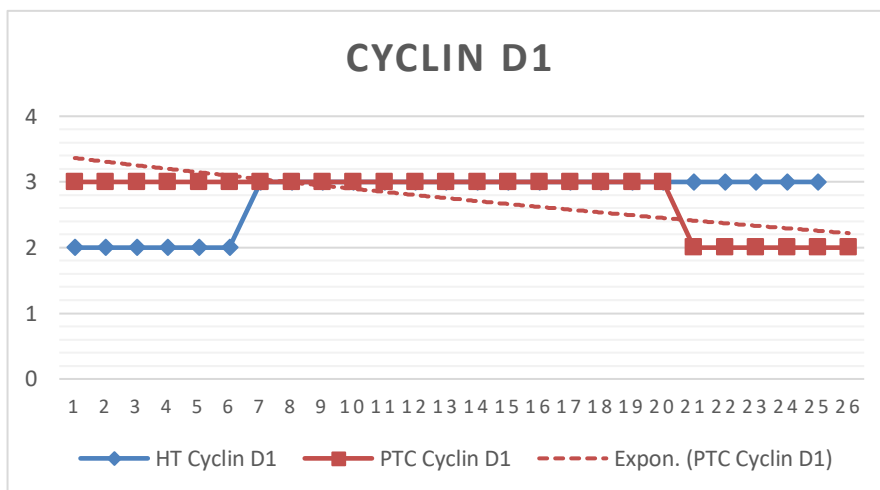
სწორედ ფარისებრი ჯირკვლის ნიმუშებში გვხვდება ატიპური უჯრედი ორი ტიპის - 1) უმწიფარი ფოლიკულური უჯრედები cord-like სტრუქტურებში და 2) სოლიდური ბაზალური უჯრედები. ორივე ტიპის უჯრედს ფოლიკულური უჯრედების ბუნება გააჩნია და ვლინდება პოზიტიური იმუნორეაქტიულობა TTF-1-ზე (Thyroid Transcription Factor 1). ასევე სოლიდური ბაზალური უჯრედები აღმოჩნდა p63-ზე პოზიტიური, მაგრამ უმწიფარი ფოლიკულური უჯრედები cord-like სტრუქტურებში იყო ნეგატიური, რაც მიუთითებს, რომ სოლიდურმა ბაზალურმა უჯრედებმა შეინარჩუნეს ღეროვანი უჯრედების ბუნება. მიღებული შედეგები სრულ თანხვედრაშია ლიტერატურის მონაცემებთან [Wakasa, 2013].

ჩვენს მასალაზე HT-ის მქონე პაციენტის ფარისებრი ჯირკვლის შესწავლით აღმოჩნდა, რომ პარენქიმაში ფიქსირდება უმწიფარი ფოლიკულური უჯრედების რაოდენობის ზრდა. აღსანიშნავია, რომ ზოგიერთი უმწიფარი უჯრედი ხასიათდება p63 ცილის ექსპრესიით (დიაგრამა N1). ვლინდება SCN-თან (solid cell nests) მსგავსება, სავარაუდოა, რომ, ლიტერატურის მონაცემებით, ეს უჯრედები შეიძლება იყოს ფარისებრი ჯირკვლის ღეროვანი/წინამორბედი უჯრედები. ამ დასკვნებმა შეიძლება დააზუსტოს განმარტება იმის შესახებ, თუ რატომ არის ჰაშიმოტოს დაავადების დროს გამოვლენილი ატიპური ფოლიკულური უჯრედები საექვო პაპილურ თიროიდულ კარცინომაზე და რატომ შეიძლება გაკეთდეს ციტოლოგიური დიაგნოზის მცდარი ინტერპრეტაცია, რაზედაც მიუთითებს არაერთი მკვლევარი [Kakudo, 2013;Kakudo, 2013;Wakasa, 2013].



დიაგრამა N1. p63 ცილის აქტივობა ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა პათოლოგიის დროს.

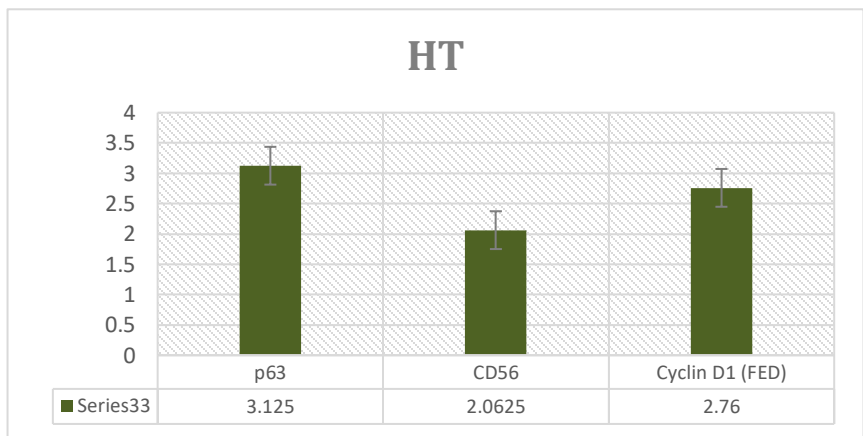
უჯრედულ გაყოფას აკონტროლებს ჰომოლოგიური სერინ-თრეონინ კინაზას (ანუ Cyclin-დამოკიდებული კინაზების) ჯაჭვის შეთანხმებული მოქმედება (Cdk). თეორიულ საფუძველს ქმნის წარმოდგენა, რომ ჩვენს მასალაზე გამოიკვეთა პროტეინ Cyclin D1-ის შემდეგი ცვლილებები, რომლებიც აჩვენებენ, რომ ეს მნიშვნელოვანი უჯრედული ციკლის მაკონტროლებელი ცილა სარწმუნოდ იცვლება HT და PTC უჯრედული ციკლის დომენში (დიაგრამა N2).



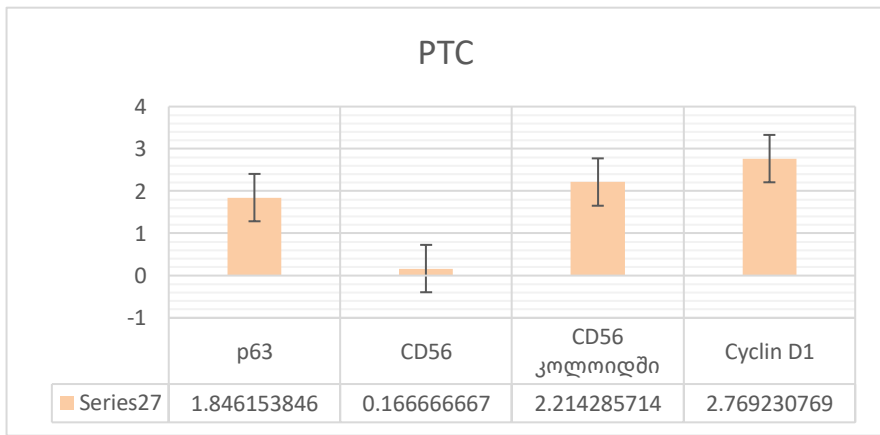
დიაგრამა N2. Cyclin D1-ის აქტივობა ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა პათოლოგიის დროს.

ჩვენი კვლევის ძირითადი ინტერესიდან გამომდინარე, განსაკუთრებულ ყურადღებას ვუთმობთ HT და PTMC ურთიერთკავშირის საკითხებს. სახელდობრ, HT-ის დროს თიროიდალ პარენქიმაში ატიპური, დისპლაზიური ცვლილებების მქონე ფოლიკულური უჯრედების არსებობის ფაქტებს. მითუმეტეს, რომ არსებობს სათანადო ლიტერატურის მონაცემებიც. Wakasa და თანაავტორებმა [Wakasa, 2013] გამოიკვლიეს რა ჰაშიმოტოს თიროიდიტით დაავადებული პაციენტის ფარისებრი ჯირკვალი, აღმოაჩნდა პარენქიმაში უმწიფარი ფოლიკულური უჯრედების გაზრდილი რაოდენობა. საინტერესოა, რომ ზოგიერთი უმწიფარი უჯრედის რეაქცია p63 ცილაზე იყო დადებითი, ამავდროულად სტრუქტურულად მსგავსი იყო Solid Cell Nest-თან, რაც ვარაუდობს, რომ ეს უჯრედები შეიძლება იყოს ფარისებრი ჯირკვლის დეროვანი/წინამორბედი უჯრედები. ჩვენი კვლევის შედეგები ამ მიმართულებით ჰაშიმოტოს პარენქიმაში გვიჩვენებენ სწორედ p63 პროტეინზე გამოკვეთილ დადებით

რეაქციას, უფრო მეტიც, ექსპრესია ვლინდებოდა არა მარტო ბირთვულ და ციტოპლაზმურ დომენში, არამედ მოიცავდა ფოლიკულის სანათურში არსებულ კოლოიდურ სუბსტრატსაც, ხოლო PTC სიმსივნურ ქსოვილში უჯრედთა 70%-ში (დიაგრამები N3; N4). ამ დასკვნებმა შეიძლება დასაბუთებული ახსნა მოგვცეს იმის შესახებ, თუ რატომ ჩნდება ატიპური ფოლიკულური უჯრედები ჰაშიმოტოს თიროიდიტის საექვო პაპილური ფარისებრი კარცინომის ტიპის ბირთვული მახასიათებლებით რამაც შეიძლება განაპირობოს ასევე არასწორი ინტერპრეტაცია ციტოლოგიურ დიაგნოზში.



დიაგრამა N3. HT-ის პარენქიმაში სხვადასხვა მარკერის იმუნორეაქტიულობა.



დიაგრამა N4. PTC-ის პარენქიმაში სხვადასხვა მარკერის იმუნორეაქტიულობა.

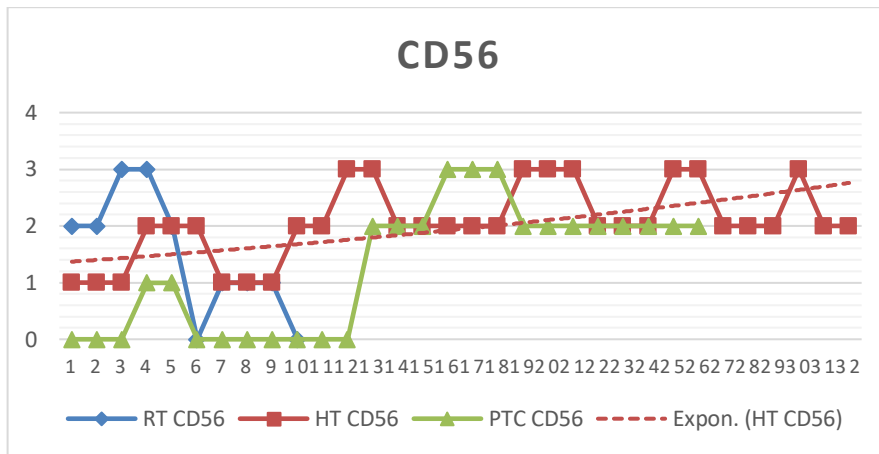
FED-ის დროს აღინიშნება პროტეინი p63, რაც ჩვენს მიერ არ დაფიქსირდა HT-ის

დროს, მაგრამ გამოიკვეთა HT-ის ფონზე განვითარებული PTC-ის და სპორადული PTC-ის დროს, რაც იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდებით გამოვლინდა.

აღსანიშნავია, რომ კეთილთვისებიანი კვანძების მქონე პაციენტებში ქირურგიული ჩარევის შესამცირებლად შეიძლება გამოყენებული იყოს მოლეკულური გაფართოებული ანალიზი და შესაბამისად უფრო ორგანოშემანარჩუნებელი ოპერაციები. სწორედ ამ მიმართულებით ინფორმაციის მოძიებასა და იდენტიფიკაციას ითვალისწინებს ჩვენი კვლევის ძირითადი მიზანი - ამოვიცნოთ პრეკანცერული დაზიანებები ფარისებრი ჯირკვლის აუტოიმუნური დაზიანების დროს, ასევე ისეთ წარმონაქმნებში, სადაც ეს დაზიანებები შეიძლება არასწორად იყოს კლასიფიცირებული, როგორც კეთილთვისებიანი ფოლიკულური ადენომა, ადენომატოზი ან დაბალი დიფერენციაციის ავთვისებიანი სიმსივნე. ამავე დროს, პარალელურად გამოვყოთ პროგნოზულად აგრესიული მიმდინარეობის შესატყვისი უჯრედული ვარიანტები.

ჩვენი დაკვირვებით, HT-თან ასოცირებულ PTC მასალაზე სწორედ CD56-ის კლებადი იმონოექსპრესია მიუთითებს სიმსივნური პროცესის პროგრესიაზე, რაც უკუკავშირშია p53/p63/p73-ის ოჯახის სუპრესორული ცილების აქტივობასთან. CD56 ცილის ექსპრესია დაქვეითებულია და თითქმის დაკარგულია პაპილური კარცინომების, ფოლიკულური კარცინომების, ხოლო ლიტერატურის მიხედვით, ასევე ანაპლაზიური კარცინომების დროს [Demellawy, 2008].

ამ მსჯელობასთან შესაბამისობაში, განვიხილეთ რა იმუნოჰისტოქიმიური რეაქციის და მათი გრაფიკული გამოსახვის შედეგები, გაირკვა, რომ CD56 გლიკოპროტეინის თვალსაჩინო გადახრები ვლინდება ჰაშიმოტოს თიროიდიტის დროს დიფუზური მაღალი ექსპრესიიდან არეაქტიული უბნების იდენტიფიკაციამდე. პაპილური კარცინომის შემთხვევაში, CD56-ის მაღალი აქტივობა იყო კოლოიდში, მაგრამ არ დადასტურდა სიმსივნური უჯრედების ბირთვისა და ციტოპლაზმაში (დიაგრამა N5), რაც გარკვეული ალბათობით მიუთითებს კოლოიდის სუბსტრატში თირეოგლობულინის, როგორც Hürthle-ის უჯრედის პროდუქტის არსებობაზე; ეს მოსაზრება მომავალი კვლევის საგანს შეიძლება წარმოადგენდეს.



დიაგრამა N5. CD56-ის აქტივობა ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა პათოლოგიის დროს.

CD56-ის სუსტი ექსპრესია (დეფიციტი) განსაკუთრებით პაპილური კარცინომის დროს შეიმჩნევა, ეს ფაქტი ეთანხმება ჩვენი კვლევის შედეგებს, რომელთა თანახმად, საგრძნობია CD56-ის ექსპრესიის შემცირება პაპილური კარცინომების დროს, ხოლო რიდელის თიროიდიტის დროს კი ნაჩვენებია იქნა მონაცემების მკვეთრი სხვაობა, სახელდობრ, ზომიერი და მაღალი ექსპრესია, რაც ეთანხმება ზოგადჰისტოლოგიური და მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის მონაცემებს, რომ რიდელის აუტოიმუნურ თიროიდიტში, განსხვავებით ჰაშიმოტოს თიროიდიტისგან, არ აღინიშნება FED, ამიტომაც არ წარმოადგენს პრეკანცერული ცვლილებების პოტენციურ რისკს.

ჩვენი კვლევის ამოცანებიდან გამომდინარე, სპეციალური ყურადღება დავუთმეთ აუტოიმუნური თიროიდიტის სხვადასხვა კლინიკური ვარიანტის შედარებით კვლევას, ჰაშიმოტოსდარიდელის თიროიდიტის კლინიკური მასალის პოსტოპერაციულ შემთხვევების მაგალითზე (ცხრილი N2). როგორც ზემოთ აღინიშნა, მიუხედავად აზრთა სხვადასხვაობისა, არსებობს ერთმნიშვნელოვანი შეხედულება, რომ რიდელის თიროიდიტი არის აუტოიმუნური თიროიდიტის შედარებით იშვიათი ვარიანტი, ხასიათდება ფარისებრი ჯირკვლის პარენქიმის ჩანაცვლებით უხეშფიბროზული კერებით. ამ დროს, როგორც წესი, ფარისებრი ჯირკვალი დიფუზურად არის დაზიანებული, ხოლო კისრის წინა ზედაპირზე აღინიშნება უმტკივნეულო ქსოვილოვანი „მასა“, რაც ავლენს ანაპლაზიური ფარისებრი ჯირკვლის კარცინომის



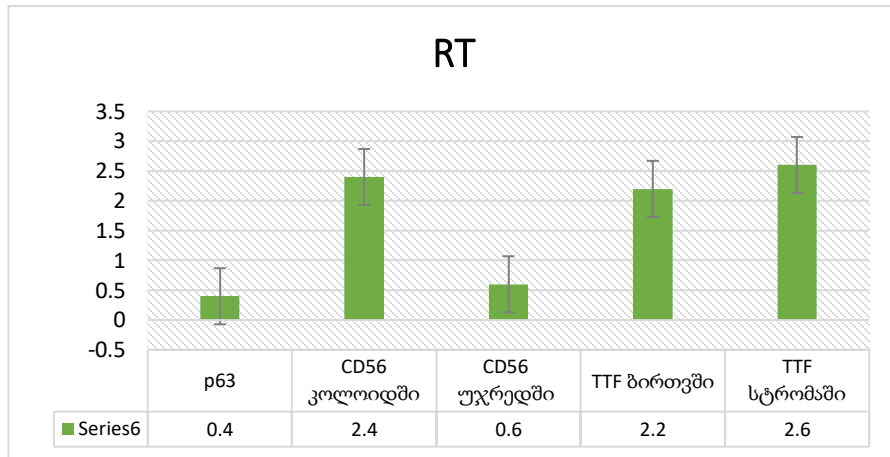
ანალოგიურ კლინიკურ მახასიათებლებს: სწრაფად მზარდი, მყარი („რკინისებური ჩიყვი“), ფიქსირებული ჯირკვალი; და სიმპტომები, როგორცაა დისფაგია, დისფონია და ქოშინი. ლიტერატურაში აღწერილი რიდელის თიროიდიტის საბოლოო დიაგნოზი დაისვა მიკროსკოპული დასკვნებით და იმუნოჰისტოქიმიური კვლევებით [Won, 2006]. ჩვენს შემთხვევაში ჩატარდა იმუნოპეროქსიდაზული რეაქციები p63, CD56 და TTF-1-ის გამოსაკვლევად.

*ცხრილი N2. აუტოიმუნური თიროიდიტის სხვადასხვა კლინიკური ვარიანტის შედარებითი შეფასება იმუნომარკერების მიხედვით.*

პათოლოგია		p63	CD56	TTF1	CyclinD1
RT	M	0	2	3	
	StD	0.4	1.5	2.2	
HT	M	2	2		3
	StD	3.12	2.06		2.76
PTC	M	2	0		3
	StD	1.8461	1.2692		2.7692
		p63	CD56	TTF1	CyclinD1
	p1-2	0.3	0.2	0.001	0.001
	p1-3	0.001	0.001	0.001	0.001
	p2-3	0.001	0.2	0.001	0.001

ჩვენ დავაკვირდით ცილა S100 ციტოპლაზმურ შეღებვასაც, აღვნიშნეთ პარაფოლიკულურ დომენში Hürthle-ის უჯრედების შეღებვა. კლასიკური პაპილური კარცინომისგან განსხვავებით, აღვნიშნებოდა პრომოტორულ რეგიონებში რეაქციის პროდუქტის შეცვლილი განაწილება როგორცაა დიფუზური ციტოპლაზმური შეღებვა. სპეციალისტთა აზრით, ეს არის უჯრედების აბერანტული სიგნალიზაციის შედეგი, როგორც ალტერნატიული რეაქცია თიროიდულ ტრანსკრიპციის ფაქტორზე [Choi, 2005]. სწორედ ამ თვალსაზრისით, ჩვენ გამოვიკვლიეთ თიროიდული ტრანსკრიპციის ფაქტორის (TTF-1) აქტივობა, როგორც თირეოგლობულინის და თირეოპეროქსიდაზის გენების ტრანსლაციის შეფასება. საყურადღებოა, რომ TTF-1 აჩვენებს იმუნორეაქტიულობის სრულ შენარჩუნებას რიდელის თიროიდიტის დროს (დიაგრამა

N6), ადასტურებს რა ფარისებრი ჯირკვლის ფენოტიპურ სტაბილურობას და მის არეაქტიულობას როგორც „პრეკანცერული“ მდგომარეობისა.



დიაგრამა N6. RT-ის პარენქიმაში სხვადასხვა მარკერის იმუნორეაქტიულობა.

ამის საპირისპიროდ, პარენქიმის რეაქტიულობის შემცირება პაპილური კარცინომის (PTC ან PTMC) უმეტესობაში გვიჩვენებს, რომ TTF-1 აქტივობა სრულ კორელაციაშია ჰაშიმოტოს თიროიდიტის და PTC სიმსივნურ პარენქიმაში უჯრედული ციკლის ფაზებთან, სახელდობრ, Cyclin D1 ექსპრესიასთან (დიაგრამა N4). როგორც კინაზა, Cyclin D1 ასტიმულირებს ბირთვის ტრანსკრიპციულ პროცესებს TTF-1 მაგალითზე, რაც შეიძლება განიმარტოს, როგორც ფარისებრი ჯირკვლის კარცინომის დიფერენციაციის მარკერი [Choi, 2005; Katoh, 2000].

## დასკვნები

1. ფარისებრი ჯირკვლის პაპილური კარცინომისა (PTC) და მიკროკარცინომის (PTMC) სიმსივნურ ქსოვილში წარმოდგენილია როგორც კლასიკური ვარიანტის, ასევე აგრესიულ მიმდინარეობასთან ასოცირებული სიმსივნური უჯრედების ვარიანტები: კლასიკური ვარიანტები - კომპაქტური განშტოებული პაპილური სტრუქტურები ფიბროვასკულური გულგულით, ვრცელი ლიმფოციტური ინფილტრაციით; „ყურძნის მტევნის“ მსგავსი და უჯრედების ბუდობრივი აგრეგაციის არქიტექტონიკით.
  2. PTMC-ის და PTC-ის აგრესიულ მიმდინარეობასთან ასოცირებული უჯრედების ციტოლოგიურ ტიპებს მიეკუთვნება: მაღალი უჯრედები (Tall cell), „ტრამვაის ლიანდაგი“ ("tram-track"), „მეწადის ლურსმნისებრი“ (Hobnail), ასევე სვეტისებრი (Columnar) უჯრედული ტიპი.
  3. ჰაშიმოტოს აუტოიმუნურ თიროიდიტის ფონზე განვითარებული PTMC-ისა და PTC-ის სიმსივნური ველის არქიტექტონიკაში მაქსიმალურად წარმოდგენილია აგრესიული ციტოლოგიური ვარიანტები, ექვივალენტური, ე.წ. „ჰაშიმოტო-ტოქსიკოზის“ კლინიკურ სურათთან და მაღალ anti-TPO ანტისხეულების ტიტრთან, რაც არაკეთილსაიმედო პროგნოზთან შეიძლება იყოს ასოცირებული.
  4. ჰაშიმოტოს თიროიდიტისა და მის ფონზე განვითარებულ PTC და PTMC რეცეპტორული სტატუსის გაძლიერება გამოხატულია Cyclin D1-ის მიმართ, რაც პროცესის აგრესიულ ბიოლოგიურ ქცევასა და მეტასტაზურ პოტენციალზე მიუთითებს.
- სტატისტიკური ანალიზის შედეგები, Mann–Whitney U ტესტი, დისპერსიულ პარამეტრებზე დაყრდნობით, ადასტურებს აუტოიმუნური ჰაშიმოტოს თიროიდიტის პარენქიმაში ფოლიკულური ეპითელიუმის დისპლაზიისა (FED) და არქიტექტონიკის დეზორგანიზაციის არსებობას, უმწიფარი ფოლიკულური უჯრედების რიცხვის კეროვან ზრდას. იმავდროულად ვლინდება Cyclin D1-ის მაღალი და p63 ცილის ზომიერი ექსპრესია, სოლიდურ ბუდობრივ უჯრედებთან მაღალი იდენტურობა. იმუნოექსპრესია როგორც უჯრედულ, ასევე კოლოიდის დომენში.

5. ფარისებრი ჯირკვლის არაინვაზიური სიმსივნის (მიკროკარცინომის) უჯრედთა ბირთვული პაპილური მახასიათებლები იმუნოჰისტოქიმიური გამოკვლევითა და ჰისტოლოგიური სურათით წარმოადგენს კრიტერიუმს, ე.წ. „პრეკანცერული“ და „Gray Zone“-ის უჯრედთა იდენტიფიკაციისათვის.
- ა) ჰაშიმოტოს თიროიდიტთან ასოცირებული PTC მასალაზე CD56 ცილის კლებადი იმუნოექსპრესია მიუთითებს სიმსივნის პროგრესიაზე, რაც უკუკავშირშია p63 ცილის აქტივობასთან. CD56 ცილის ექსპრესია შესუსტებულია და თითქმის დაკარგულია პაპილურ კარცინომაში, მაღალია ჰაშიმოტოს თიროიდიტის პარენქიმაში.
- ბ) CD56 ცილის ზომიერი და მაღალი ექსპრესია აუტოიმუნურ რიდელის თიროიდიტის ქსოვილში, TTF-1-ის მაღალ ექსპრესიასთან ერთად, სტაბილურად მიუთითებს ფენოტიპის შენარჩუნებაზე და პრეკანცერული რისკის არ არსებობაზე.
6. თიროიდული ტრანსკრიპციის ფაქტორის (TTF-1) კვლევა, მისი აქტივობა, როგორც თირეოგლობულინისა და თირეოპეროქსიდაზას გენების ტრანსლაციის შეფასება, აჩვენებს TTF-1-ის მიმართ რეცეპტორული სტატუსის შენარჩუნებას რიდელის თიროიდიტის დროს.
7. CD56 და p63, დიდი ალბათობით, არის მარკერი ფარისებრი ჯირკვლის დიფერენცირებული კარცინომისთვის. ხოლო Cyclin D1-ის ექსპრესია ფარისებრი ჯირკვლის კარცინომის დიფერენციაციის მარკერის სახით შეიძლება იყოს წარმოდგენილი.

## გამოქვეყნებული შრომები:

1. CHEMOTHERAPY, HYPOTHYROIDISM AND ORAL DYSBIOSIS AS A NOVEL RISK FACTOR OF CARDIOVASCULAR PATHOLOGY DEVELOPMENT. Current Problems in Cardiology. IF 5.2. Available online 18 November 2021, 101051. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2021.101051>
2. Follicular epithelial dysplasia of the thyroid gland on the background of Hashimoto Thyroiditis. 23rd European Congress of Endocrinology (ECE) 2021, Endocrine Abstracts May 2021 Volume 73:360. DOI: 10.1530/endoabs.73.AEP711
3. Correlation of Thyroid Autoimmunity with Atherosclerosis Evaluation in Hashimoto's Thyroiditis. Georgian Medical News. 2021 №1 (310):142-149
4. A study of the relationship between RET/PTC and Cyclin D1 expression of the thyroid under autoimmune thyroiditis and Papillary thyroid carcinoma (PTC): Clinical-pathological correlation. 22nd European Congress of Endocrinology (ECE) 2020, Endocrine Abstracts September 2020 Volume 70:384. DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP955
5. Coexistent presentation of Graves' disease and a Riedel's thyroiditis - Diagnostic dilemma. TRANSLATIONAL AND CLINICAL MEDICINE - GEORGIAN MEDICAL JOURNAL. Vol 5, No 1 (2020):27-30.
6. Molecular-biological thyroid profile during autoimmune disease - Hashimoto and Riedel's Thyroiditis. Georgian Medical News. 2019 , №5 (290):116-120.
7. Comparative analysis of Hashimoto's and Riedel's Thyroiditis morphology and immunohistochemistry. 21st European Congress of Endocrinology 2019 (ECE) 2019, Endocrine Abstracts May 2019 Volume 63:293. DOI: 10.1530/endoabs.63.P376
8. Autoimmune thyroid disease (Hashimoto thyroiditis) discussions as possible predicting of thyroid papillary microcarcinoma (MPTC). 20th European Congress of Endocrinology (ECE) 2018, Endocrine Abstracts May 2018 Volume 56: 624. DOI: 10.1530/endoabs.56.EP191
9. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) correlates with the degree of papillary thyroid carcinoma (PTC). Archiv Euromedica 2017, vol. 7, num. 2:64.



Ivane Javakhishvili Tbilisi State University

Faculty of Medicine

Doctoral Program: "Clinical and translational medicine"

**Tamuna Gvianishvili**

**Papillary thyroid microcarcinoma (PTMC):  
Histopathology, immunohistochemistry, prognosis**

**The Thesis**

of the dissertation submitted for the academic degree of

Doctor of Medicine (PhD)

Scientific supervisor:

Professor Liana Gogiashvili

Tbilisi

2022

## Introduction

### Relevance of the issue research

Thyroid disease rates have been increasing significantly in recent years, which is caused by: radiation pollution of the biosphere, technological progress; Iodine deficiency in water and food; Unreasonable wide use of medicines, especially iodine-containing preparations; radiotherapy in the process of tumor treatment; The increase in morbidity rates is also facilitated by the introduction of diagnostic technologies such as: screening programs, fine-needle aspiration biopsy (FNA), ultrasonography and other non-invasive research methods [Kakudo, 2013; Dikbas, 2019].

Thyroid tumors are rarer than tumors of other organs. Statistically: among cancers of all localizations, <1% was observed, the mortality rate does not exceed 0.5%. There are 0.5-10 new cases per 100,000 people every year. According to the American Cancer Society, 18,000 cases are diagnosed in the US every year, and 1,200 people die.

Thyroid tumors are mainly detected during examination of patients with nodular goiter, in 1-4% of cases of nodular formations.

According to the statistical reference of the Georgian National Center for Disease Control and Public Health, in 2020, 2,131 operations were performed on the endocrine system organs, of which 2,007 operations were performed on the thyroid gland. Thyroid neoplasia is the second most common malignancy in women after breast cancer, and since 2015, thyroid cancer has been consistently second in the annual data on new cancer cases. Of the 9,435 new cancer cases reported in 2020, 821 cases are thyroid carcinomas (~8.7%) [NCDC 2020, 2021].

According to literature data, papillary thyroid carcinoma (PTC) ranks first among all malignant tumors of the thyroid gland. It is most common in the 20-50 age group of both gender, often preceded by both natural and medical radiation exposure. The main structural elements of PTC are atypical follicular cells and cystically transformed papillary outgrowths. Which can be embedded in the cyst wall, in the tumor capsule, or in the soft tissues of the neck [Berber, 2014].

According to modern researches, the pathomorphological issues of the thyroid gland non-cancerous and inflammatory diseases remain an actual problem of clinical endocrinology and pathology. Clinical features, diagnostic issues and treatment are discussed in sufficient detail and from different position in numerous review articles. There are intensive studies on the role of growth factors in the development of "classical" and autoimmune nodular processes of the thyroid gland [Zimmermann, 2004; McHenry, 2011; Rurua, 2013; Eszlinger, 2001; Mc Henry, 1998].

Papillary thyroid microcarcinoma (PTMC) is a small papillary thyroid carcinoma (PTC) less than 1 cm in diameter. Over the last few decades, the frequency of PTC has increased dramatically and the incidence of PTMC is also characterized by a high growth rate. The majority of researchers report an increase in detection of subclinical forms, such as cytological diagnosis of low-risk carcinomas by ultrasonography and fine-needle aspiration biopsy (FNA) material. Thus, papillary thyroid microcarcinoma (PTMC) is considered as the most common clinical-morphological variant of papillary thyroid carcinoma (PTC) and accounts for almost 50% of all thyroid carcinoma cases [Kakudo, 2013].

PTMC is a malignant tumor, in which metastases in the lymph node occur in 50% of cases. Carcinoma microfoci are often found as intrathyroidal metastases and multifocal extrathyroidal foci, tumor tissue implants in the opposite lobe of the thyroid gland have also been described. It is a well-differentiated cancer, the mortality rate is quite low, less than 1% in the next 10 years after the diagnosis.

The high incidence of intrathyroidal metastases and the development of multifocal PTMC in the residual thyroid tissue dictates the surgical tactics - to give preference to total thyroidectomy instead of lobectomy [Kakudo, 2013].

Papillary thyroid carcinoma nuclear features (PTC-N) are the most important diagnostic criteria for thyroid tumors. PTC-N is the "gold" standard for the diagnosis of PTC, even if the diameter of the foci is less than 1 mm. Determining the biological characteristics and clinical stage of PTC determines the biological "behaviour" of the tumor. The majority of PTMC are confined to the



thyroid tissue, has a good prognosis [Kakudo, 2012; LiVolsi, 2004; Kakudo, 2013; Pacini, 2012; Liu, 2011; Noguchi, 2008].

It is important that according to the classification developed by the WHO (World Health Organization), there is no known preliminary lesion of papillary thyroid carcinoma - "precancer". Early small PTC can arise in two different situations: in normal thyroid parenchyma (de novo cancer) or in a thyroid nodule (cancer in adenoma). PTMC is usually a small PTC that develops in normal thyroid parenchyma or in a non-neoplastic thyroid lesion such as Hashimoto's disease. Focal PTC-N in thyroid nodular lesions usually excludes PTMC, as all nodules are traditionally diagnosed as encapsulated papillary carcinoma (as general type or follicular variant) or so-called well-differentiated tumors of uncertain malignant potential (WDT-UMP). Therefore, PTMCs, small tumors with PTC-N in the nodular thyroid gland, can be considered as an early phase of PTC or a precursor lesion of PTC (precancerous, borderline lesion or gray zone lesion). Thus, PTMC is conceptualized as a lesion that precedes the classical variant of PTC with "fixed" (1-4%) mortality rates [LiVolsi, 2004; Kakudo, 2013; Liu, 2011].

Some researchers believe that Hashimoto's thyroiditis (HT) is a possible risk factor for papillary thyroid carcinoma (PTC) and may also be a predictor of malignant lymphoma. Cytological features characteristic of PTC and follicular neoplasms are often seen during HT, namely, during cytological or postoperative histological examination of thyroid FNA biopsy material. However, the mechanisms and theoretical basis of such changes are unknown. This refers to the presence of atypical cells in the parenchyma of HT. Especially since the issues and molecular markers of follicular epithelial dysplasia (FED) are not substantiated by the results of specific studies [Wakasa, 2013].

Clinical diagnosis of PTMC mainly depends on histopathological examination. However, the specificity and accuracy of such testing are usually low due to the invasiveness of PTMC. Thus, it is necessary to identify and validate sensitive and specific tumor markers and predictors in the diagnosis and preoperative evaluation of PTMC.

## **Aim of the study**

Taking into account the above, the purpose of the research was determined:

Study/systematization of the histopathological and molecular-biological profile of thyroid gland microcarcinoma in order to structurally justify and predict precancerous background processes of the thyroid gland.

## **The objectives of the study:**

1. Selection of prognostic criteria (invasion, metastasis, recurrence) of PTMC developed against the background of lymphocytic and autoimmune thyroiditis by means of comparative evaluation of the expression of immunohistochemical markers.
2. Detection and substantiation of possible structural prerequisites, as well as assessment of follicular epithelial dysplasia (FED) in autoimmune thyroiditis and developed in its background papillary thyroid microcarcinoma's tissue.

## **Materials and methods of the Study**

The database of the study is the operative material obtained from patients of both gender after total thyroidectomy, lobectomy and partial resection (n=68). Retrospective material (n=48) was also used. The material was obtained from Tbilisi clinics and the West Georgia National Center of Interventional Medicine.

Patients underwent total thyroidectomy for various reasons: an increase in the size of the thyroid gland, tracheal stenosis with difficulty breathing due to an enlarged thyroid gland, pain, nodular lesions, papillary carcinoma.

Clinical data, laboratory and ultrasonographic indicators, methods of treatment and operative intervention were obtained from relevant clinical documents with written informed consent of the patient. All observations and manipulations were performed In accordance with the

requirements of the bioethical commission of Tbilisi State University based on the declaration of ethical principles of Helsinki [WMA,2013].

### **Histological examination methods**

Tissue samples taken from different areas of the thyroid gland were fixed in 10% formalin buffer solution (pH=7.35), in alcohols of increasing concentration. After dehydration, the material was embedded in paraffin blocks. Serial slides with a thickness of 5-7 mm were stained with hematoxylin and eosin (Leica Biosystems Newcastle Ltd.).

### **Immunohistochemical examination methods**

Immunohistochemical examination was performed to detect p63, CD56, TTF-1, Cyclin D1 and S-100 protein expression activity in all studied thyroid lesions.

In order to exclude false positive and false negative results, immunohistochemical reactions were performed in repeated mode.

In our material, all studied thyroid pathologies are divided into 6 groups (Table N1).

*Table N1. Number of cases in the studied groups.*

Pathology	Number of cases
PTC	14
PTMC	12
HT	32
HT+PTC	8
RT	5
Diffuse toxic goiter	45

All samples were typically taken on poly-L-lysine-coated slides. Immunohistochemical procedures were performed following the protocols of the antibody manufacturer:

- 1) p63 (incubation time, 20 min; clone 7JUL; dilution 1:25; cat. no. PA0103; Leica Biosystems Newcastle Ltd.);
- 2) CD56 (incubation time, 20 min; clone CD564; dilution 1:25; cat. no. PA0191; Leica Biosystems Newcastle Ltd.);
- 3) TTF-1 antibodies (incubation time, 30 min; clone SPT24; dilution 1:100; Newcastle Ltd.);
- 4) CyclinD1 (incubation time, 20 min; clone D-6; dilution 1:25; Dako, Denmark);
- 5) protein S-100 (incubation time, 30 min; clone RTU-S100p; dilution 1:100; Leica Biosystems Newcastle Ltd.).

We calculated the expression intensity of p63, CD56, TTF-1, CyclinD1 and protein S-100 using a semi-quantitative method, with the following scheme: negative (0), 1= $\leq$ 10%; 2=11-50%; 3=51-80%; 4= $\gt$ 80%

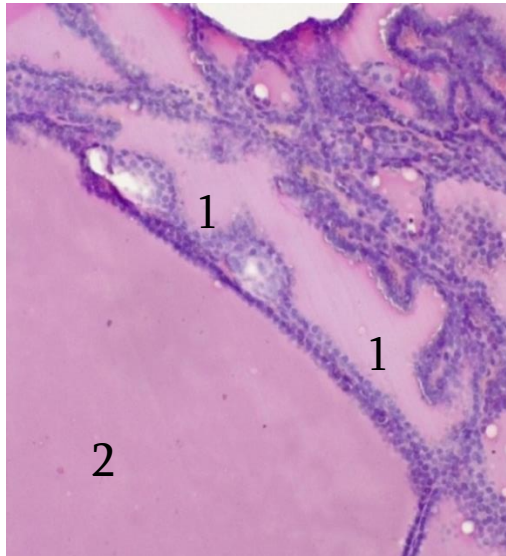
### **Statistical Analysis**

Microsoft Excel 7.0 and SPSS/PS version 21.0 for Windows were used for statistical analysis, and comparative analysis of data between groups was performed using Student's t-test. Correlation relationships were studied using Pearson's coefficient. The  $X^2$  criterion, the Mann-Whitney "U" test, and the multilinear regression analysis method were used to statistically analyze the qualitative parameters. A threshold of  $p \leq 0.05$  between comparable groups was considered statistically significant.

## Study results

### Histological study results of diffuse-toxic goiter

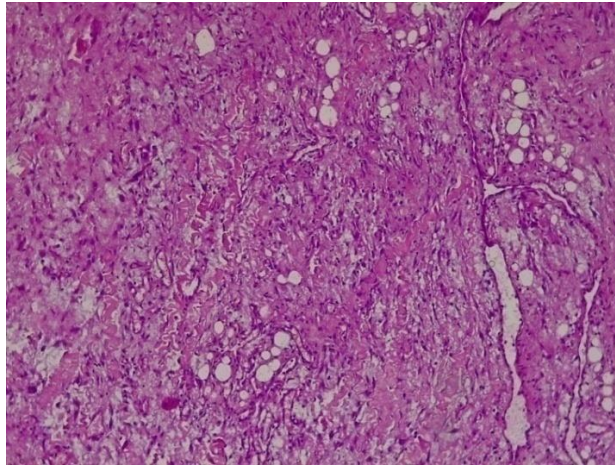
In the material stained with hematoxylin and eosin (H&E) in diffuse-toxic goiter, along with the pronounced heterogeneity of follicle sizes, It is worth noting the hyperplasia of the A-type thyrocytes of the follicles; large nucleus, nucleolus. A characteristic sign is the enlargement of the follicle lumen, thickening of the basal membrane of follicles and modification of the plasma membrane of the cell, which involves the formation of surface microcavities, outgrowths, papillae and branched structures (Figure N1).



*Figure N1. Diffuse-toxic goiter. 1 - Plasma membrane modification - microcavities, outgrowths, papillae. 2 - enlargement of the lumen of the follicle. H&E, X200.*

### Histological study results of Riedel's Thyroiditis (RT)

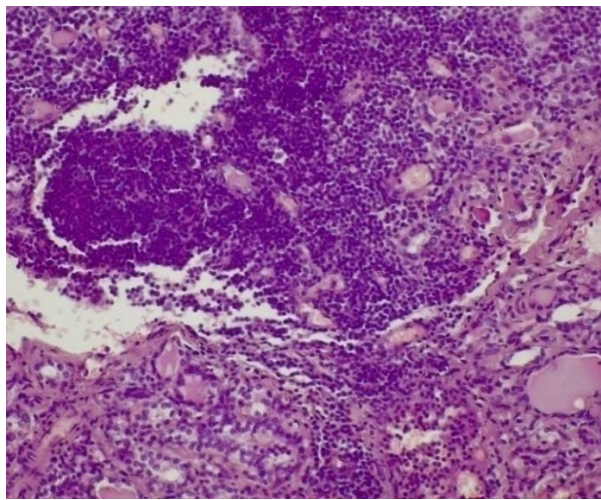
The most important histopathological sign of Riedel's thyroiditis is the deliberate replacement of the thyroid parenchyma with dense fibrous connective tissue, accompanied by a decrease in the number and size of hormone-producing cells, involution. Small follicular structures, general strong fibrosis are characteristic (Figure N2).



*Figure N2. Riedel's thyroiditis. Involution of thyroid follicles, replacement of parenchyma with dense fibrous tissue. H&E, X100.*

### **Histological study results of Hashimoto's Thyroiditis (HT)**

H&E stained preparations of Hashimoto's thyroiditis showed a large number of foci of extensive lymphoid infiltration, aggressively replacing the glandular elements, with a predominance of plasma cells. At the same time, marked, dense fibrosis of the stroma was present, which is an important distinguishing feature between fibrotic and lymphoid forms of HT (Figure N3).

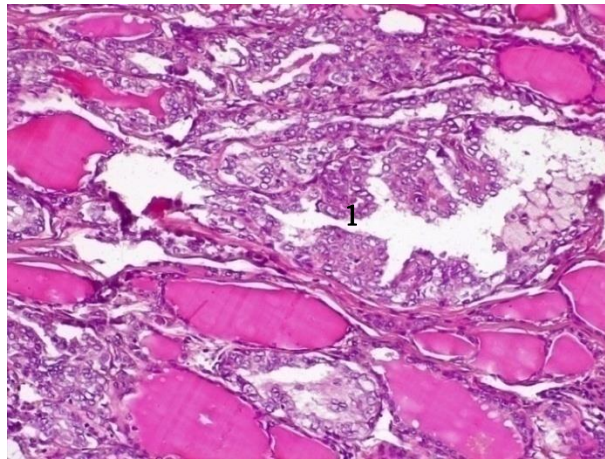


*Figure N3. Hashimoto's thyroiditis. Large foci of lymphoid cell infiltration between follicles, stromal fibrosis with involution and compression of follicles. H&E, X200.*

## Histological study results of Papillary thyroid carcinoma (PTC) and Papillary thyroid microcarcinoma (PTMC)

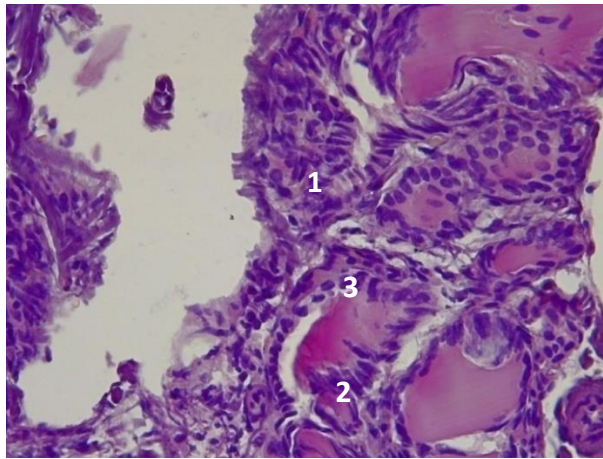
The following changes are characteristic of papillary carcinoma in H&E-stained material:

- Changes in the nucleus: change in the size and shape of the nucleus (enlargement, lengthening).
- Chromatin features: dispersed chromatin, ground glass appearance nuclei (Orphan Annie nuclei) (Figure N4).
- Disruption of the nuclear membrane: Nuclear membrane irregularities, nuclear grooves and pseudoinclusions (cytoplasmic invaginations) in the nucleus.



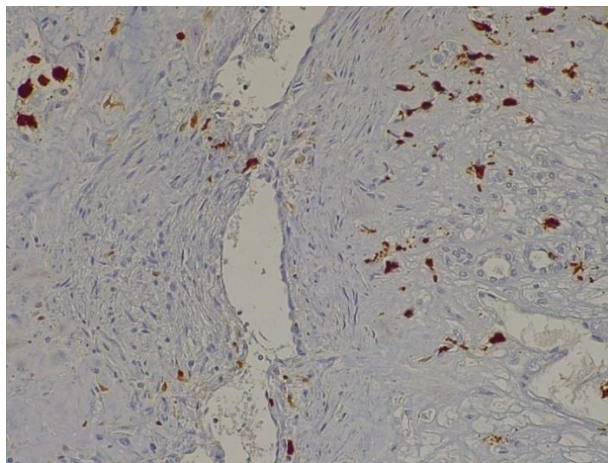
*Figure N4. Papillary thyroid carcinoma (classic variant). Ground glass appearance nuclei (1) in papillary-shaped structures. H&E, X200.*

Tumor cell variants associated with an aggressive behaviour were identified in the PTC material: Hobnail, Columnar, and Spindle cells in the tumor field in the area of proliferation (Figure N5), however, in general, analysis of the material showed a predominance of Tall cells and a "tram track"-like picture. The named changes were maximally demonstrated in patients with the so-called "Hashimoto-toxicosis" clinical picture, against the background of high anti-TPO antibody titer.



*Figure N5. Papillary carcinoma developed on the background of Hashimoto's thyroiditis. In the tumor field, there are cells characteristic of the risk of malignancy: Tall (1), Spindle (2), Hobnail (3) cells. H&E, X400.*

So-called B-cells, oncocytes (Hürthle cell) - tumor cells with abundant eosinophilic cytoplasm that express the neuroectodermal marker S100 protein (Figure N6), because oncocytes are structures developed from the neural crest.



*Figure N6. Diffuse expression of S100 protein in the parafollicular domain. Immunoperoxidase reaction, X200.*

### **Immunohistochemical study results of diffuse-toxic goiter**

Negative involvement of p63 is seen in diffuse toxic goiter. As shown by other studies [Unger, 2003] p63-positive areas are commonly found in Hashimoto's thyroiditis but are rare in Graves'

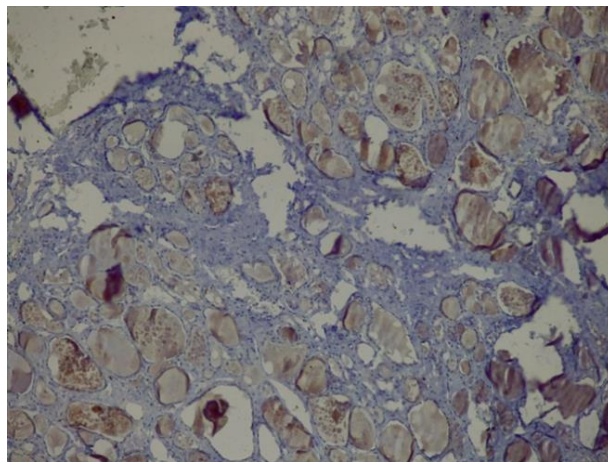


disease.

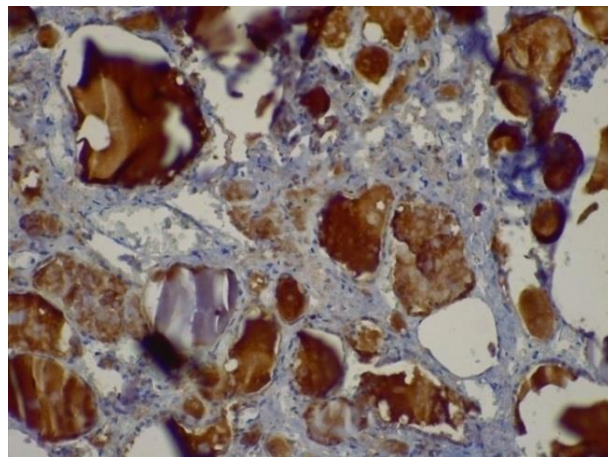
In diffuse toxic goiter, the intensity of TTF-1 staining was evaluated as intense expression in the nuclei of thyrocytes (in contrast to Hashimoto's thyroiditis) and corresponded to the decreased amount of thyrotropin-stimulating hormone (TSH) in the blood serum of the same patients.

### **Immunohistochemical study results of Riedel's Thyroiditis (RT)**

RT cases (n=5) were non-reactive for p63 and CD56, fixed a weak background reaction (Figures N7; N8) as the tissue showed extensive fibrosis.

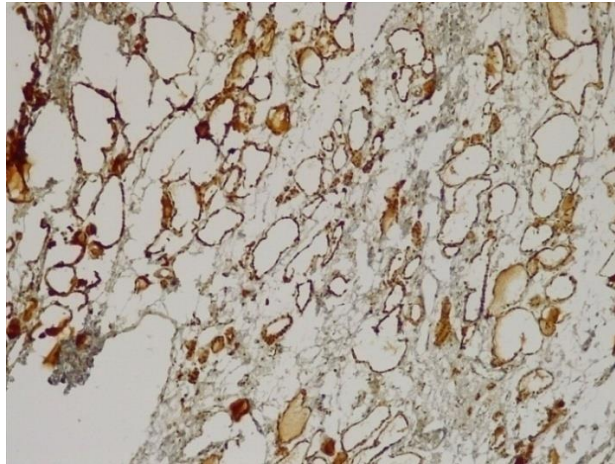


*Figure N7. Riedel's thyroiditis. p63 negative reaction in thyrocytes. At the center of extensive fibrosis is nodular hyperplasia with background expression of p63 in the colloid. Immunoperoxidase reaction, X100.*



*Figure N8. Riedel's thyroiditis. Negative reaction of CD56 in thyroid tissue, diffuse expression in colloid. Immunoperoxidase reaction, X200.*

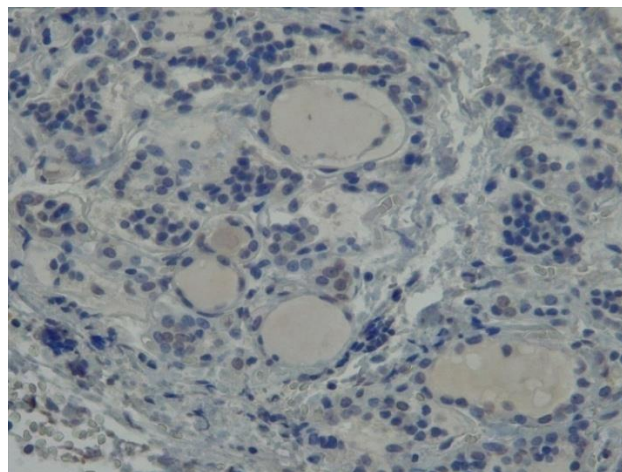
Foci of focal and diffuse expression of TTF-1 in stromal fibroblasts and endothelial cells of the capillary wall in the form of clusters were observed in all five RT studied cases (Figure N9).



*Figure N9. Riedel's thyroiditis. Strong expression of TTF-1 in follicular cells. Immunoperoxidase reaction, X200.*

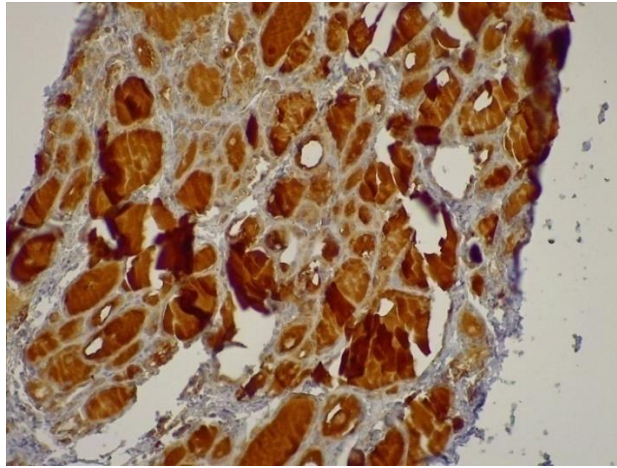
#### **Immunohistochemical study results of Hashimoto's Thyroiditis (HT)**

In 9 of 32 cases of HT, diffuse, weak to moderate expression of p63 was observed in 70% of the cells, predominantly in the colloid. In 7 cases, glandular tissue was non-reactive for p63 (Figure N10), and in 16 cases (50% of cases), the expression was focally positive.



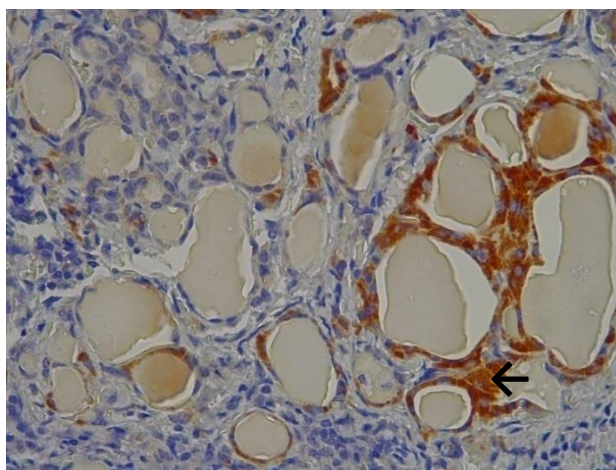
*Figure N10. Hashimoto's thyroiditis. Protein p63 negative reaction in follicular cells. Immunoperoxidase reaction, X400.*

A high diffuse reactivity of CD56 was noted in thyrocytes and a strong involvement in colloid (Figure N11), weak to moderate reaction was detected in an individual follicular cells, especially in the colloid and perimembrane zones of the cell.



*Figure N11. Hashimoto's thyroiditis. Diffuse high expression of CD56 in thyrocytes, colloid and in the center of focal nodular hypertrophy. Immunoperoxidase reaction, X200.*

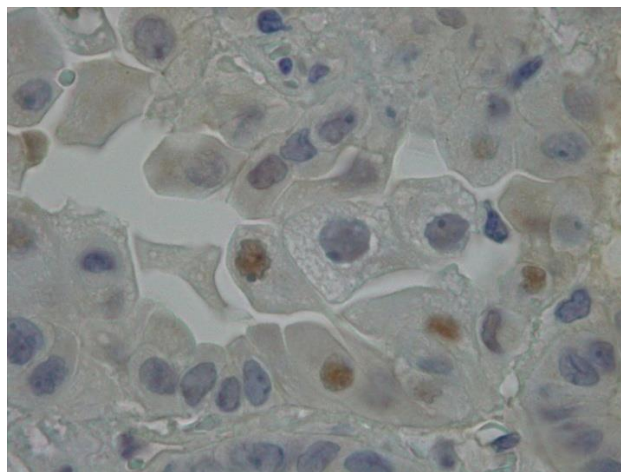
Cyclin D1 studies in cases of Hashimoto's thyroiditis typically show negative or single positive cells. 25 of 32 cases showed high-to-moderate focal activity that coincided with H&E-stained specimens that demonstrated areas of follicular epithelial dysplasia (FED). Noteworthy the high focal activity of Cyclin D1 in the follicular epithelial nest cells (Figure N12).



*Figure N12. Hashimoto's thyroiditis. In areas of epithelial reactive atypia, Tall cells are strongly Cyclin D1 positive (arrow). Immunoperoxidase reaction, X400.*

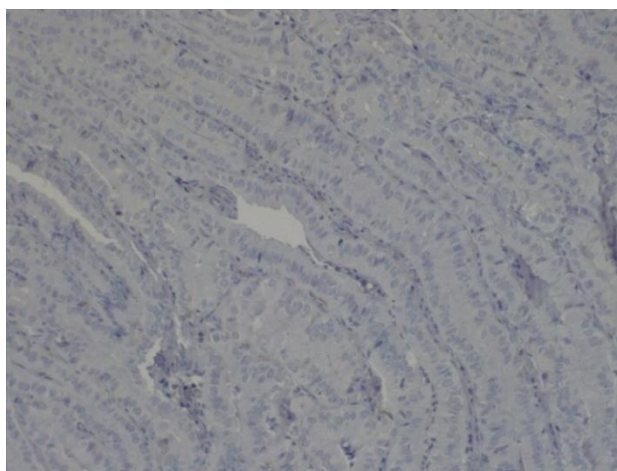
### **Immunohistochemical study results of Papillary thyroid carcinoma (PTC) and Papillary thyroid microcarcinoma (PTMC)**

In 26 studied cases of classical papillary carcinoma, the structure of neoplastic cells in 9 cases was represented by predominantly Tall cells. p63 activity was assessed as moderate. In the case of microcarcinoma, in the center of cell stratification, particularly high reactivity of the nuclei towards the p63 protein was detected, which, according to the literature, indicates the risk of an aggressive behaviour of the process. Polymorphism of follicular cell nuclei in the tumor field of microcarcinoma is visible at high magnification of the microscope (Figure N13).



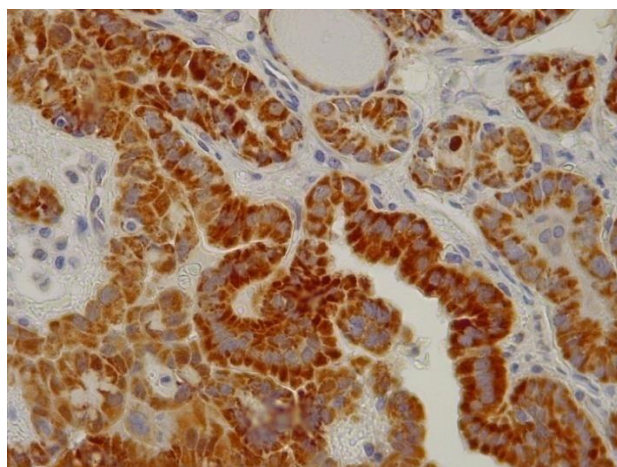
*Figure N13. Papillary thyroid microcarcinoma. Tumor cells enlarged, p63 strongly positive. Immunoperoxidase reaction, X1000.*

In 12 cases, non-reactive areas of CD56 were detected in PTC tissue, especially tall cells and the so-called in areas with a "tram-track"-like arrangement (Figure N14). In the remaining 14 cases, CD56 was detected in the colloid, while the follicular cells remained non-reactive.



*Figure N14. Papillary thyroid carcinoma. non-reactive areas of CD56; "Tram track". Immunoperoxidase reaction, X100.*

Cyclin D1 examination in the tumor field of PTMC revealed diffuse high reactivity in parenchymal tissue cells, while stromal tissue was unreactive (Figure N15). High involvement of the immunomarker was detected in the follicular epithelium; The stroma, in classic carcinoma as in PTMC, was negative.



*Figure N15. Papillary thyroid microcarcinoma. Cyclin D1 diffuse high reactivity in the cytoplasm of follicular cells. Immunoperoxidase reaction, X400.*

## Discussion of study results

In our clinical material 26 cases of PTC were studied (14 - PTC, 12 - PTMC). Among them, 4 were sporadic cancers, and 8 cases developed in the background of Hashimoto's thyroiditis (HT), which caused special interest in these two pathological processes.

Hashimoto's thyroiditis (HT) is an autoimmune lesion, the most common inflammatory disease of the thyroid gland and, at the same time, the most common cause of hypothyroidism in adults, according to a number of researchers, HT is a risk factor for papillary thyroid carcinoma (PTC) and malignant lymphoma [Wakasa, 2013].

Morphological changes in benign follicular cells in Hashimoto's thyroiditis may resemble changes developed during papillary thyroid carcinoma. In our material, it is in the thyroid gland samples that two types of atypical cells are found - 1) immature follicular cells in cord-like structures and 2) solid basal cells. Both cell types have the nature of follicular cells and show positive immunoreactivity for TTF-1 (Thyroid Transcription Factor 1). Also, solid basal cells were found to be p63 positive, but immature follicular cells in cord-like structures were negative, indicating that solid basal cells retained their stem cell nature. The obtained results are in complete agreement with the literature data [Wakasa, 2013].

By studying the thyroid gland of a patient with HT on our material, it was found that an increase in the number of immature follicular cells was recorded in the parenchyma. It should be noted that some immature cells are characterized by p63 protein expression (Diagram N1). There is a similarity with SCN (solid cell nests), it is likely that, according to the literature, these cells may be stem/progenitor cells of the thyroid gland. These findings may clarify the explanation of why atypical follicular cells seen in Hashimoto's disease are suspicious for papillary thyroid carcinoma and why cytological diagnosis may be misinterpreted, as indicated by a number of researchers [Kakudo, 2013;Kakudo, 2013;Wakasa, 2013].

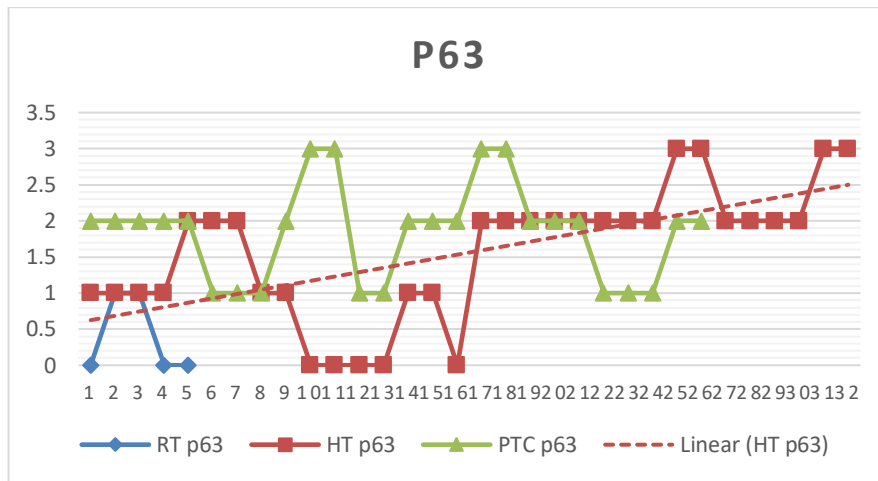


Diagram N1. p63 protein activity in thyroid various pathologies.

Cell division is controlled by the concerted action of a chain of homologous serine-threonine kinases (ie Cyclin-dependent kinases) (Cdk). The theoretical basis is the idea that the following changes in protein Cyclin D1 were revealed on our material, which show that this important cell cycle controlling protein is reliably changed in the HT and PTC cell cycle domains (Diagram N2).

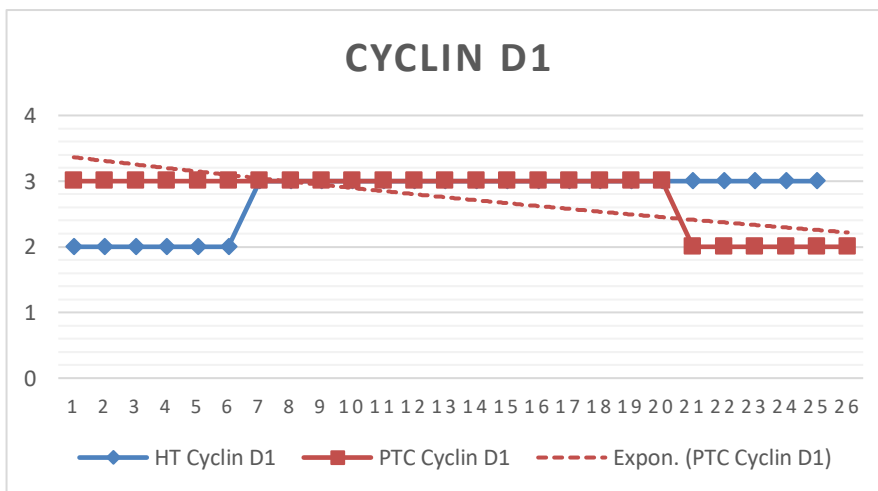


Diagram N2. Cyclin D1 activity in thyroid various pathologies.

Based on the main interest of our research, we pay special attention to the relationship between HT and PTMC. namely, the facts of the presence of follicular cells with atypical, dysplastic changes in the thyroid parenchyma during HT. Moreover, there is data from the appropriate

literature. Wakasa and co-authors [Wakasa, 2013] examined the thyroid gland of a patient with Hashimoto's thyroiditis and found an increased number of immature follicular cells in the parenchyma. Interestingly, some immature cells were positive for p63 protein, while being structurally similar to Solid Cell Nest, suggesting that these cells may be thyroid stem/progenitor cells. The results of our research in this direction in Hashimoto's parenchyma show a marked positive reaction to the p63 protein, moreover, the expression was seen not only in the nuclear and cytoplasmic domain, but also included the colloidal substrate in the follicle lumen, and in 70% of the cells in the PTC tumor tissue (Diagrams N3; N4). These findings may provide a reasonable explanation for why atypical follicular cells appear in Hashimoto's thyroiditis with suspicious papillary thyroid carcinoma-type nuclear features that may also lead to misinterpretation in cytological diagnosis.

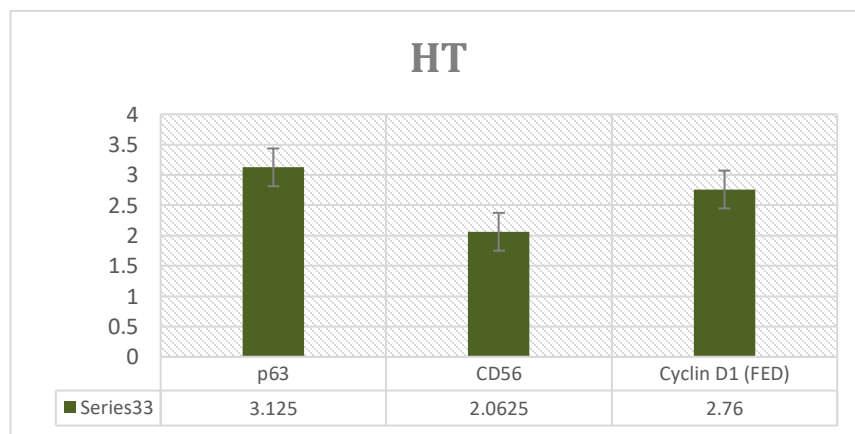


Diagram N3. Immunoreactivity of different markers in HT parenchyma.

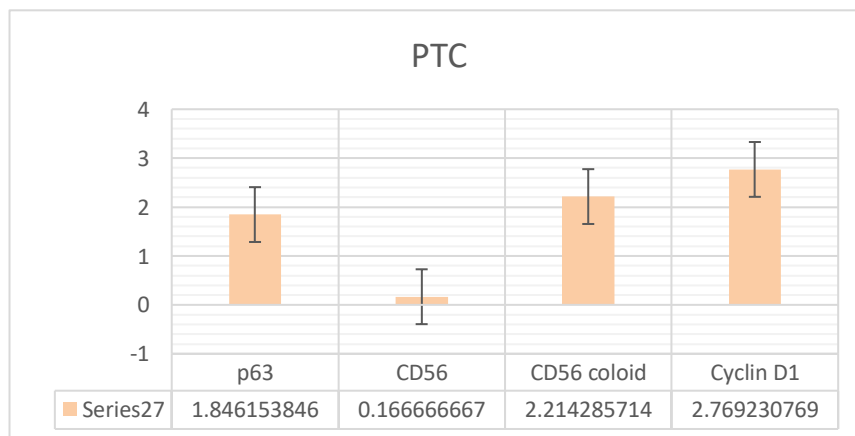


Diagram N4. Immunoreactivity of different markers in PTC parenchyma.



Protein p63 is observed during FED, which was not observed by us during HT, but was detected during PTC developed on the background of HT and sporadic PTC, which was detected by immunohistochemical methods.

It should be noted that using molecular analysis is possible to reduce the surgical intervention and therefore more organ-preserving operations in patients with benign nodules. The main goal of our research is to find and identify information in this direction - to identify precancerous lesions during autoimmune damage to the thyroid gland, as well as in such formations where these lesions may be incorrectly classified as benign follicular adenoma, adenomatosis or low-differentiation malignant tumor. At the same time, in parallel, we will identify cell variants corresponding to prognostically aggressive behaviour.

According to our observation, the decreasing immunoexpression of CD56 on the PTC material associated with HT indicates the progression of the tumor process, which is inversely related to the activity of suppressor proteins of the p53/p63/p73 family. CD56 protein expression is reduced and almost lost in papillary carcinomas, follicular carcinomas, and according to the literature, also in anaplastic thyroid carcinomas [Demellawy, 2008].

In accordance with this reasoning, we discussed the results of the immunohistochemical reaction and their graphic representation, it became clear that notable deviations of CD56 glycoprotein are manifested in Hashimoto's thyroiditis from diffuse high expression to the identification of non-reactive areas. In the case of papillary carcinoma, high CD56 activity was present in the colloid, but not in the nucleus and cytoplasm of tumor cells (Diagram N5), which probably indicates the presence of thyroglobulin as a Hürthle cell product in the colloid substrate; This opinion can be the subject of future research.

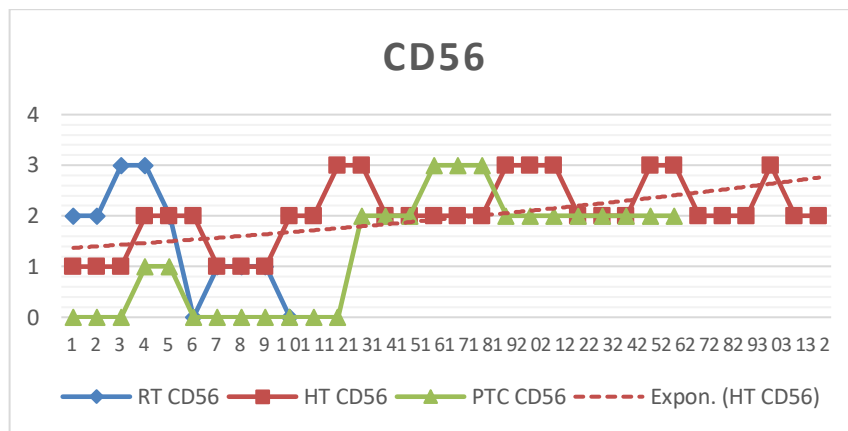


Diagram N5. CD56activity in thyroid various pathologies.

Weak expression of CD56 is observed especially in papillary carcinoma, this fact is in agreement with the results of our study, according to which there is a significant decrease in the expression of CD56 in papillary carcinomas, and in Riedel's thyroiditis, a sharp difference in the data was shown, namely, moderate and high expression, which is agrees with the general histological and molecular-genetic study data that in Riedel's autoimmune thyroiditis, unlike Hashimoto's thyroiditis, FED is not observed, therefore it does not represent a potential risk of precancerous changes.

Based on the objectives of our research, we paid special attention to the comparative study of different clinical variants of autoimmune thyroiditis, using the example of postoperative cases of clinical material of Hashimoto's and Riedel's thyroiditis (Table N2). As mentioned above, despite the differences of opinion, there is an unequivocal view that Riedel's thyroiditis is a relatively rare variant of autoimmune thyroiditis, characterized by the replacement of thyroid gland parenchyma with dense fibrotic foci. At this time, as a rule, the thyroid gland is diffusely damaged, and a painless tissue "mass" is noted on the anterior surface of the neck, which exhibits clinical characteristics similar to anaplastic thyroid carcinoma: a fast-growing, hard ("stone-like"), fixed gland; and symptoms such as dysphagia, dysphonia, and dyspnea. The definitive diagnosis of Riedel's thyroiditis described in the literature was made by microscopic findings and immunohistochemical studies [Won, 2006]. In our case, immunoperoxidase reactions were performed to detect p63, CD56 and TTF-1.

Table N2. Comparative evaluation of different clinical variants of autoimmune thyroiditis according to immunomarkers.

thyroiditis

Pathology		p63	CD56	TTF1	CyclinD1
RT	M	0	2	3	
	StD	0.4	1.5	2.2	
HT	M	2	2		3
	StD	3.12	2.06		2.76
PTC	M	2	0		3
	StD	1.8461	1.2692		2.7692
		p63	CD56	TTF1	CyclinD1
	p1-2	0.3	0.2	0.001	0.001
	p1-3	0.001	0.001	0.001	0.001
	p2-3	0.001	0.2	0.001	0.001

We also observed protein S100 cytoplasmic staining, noting Hürthle cell staining in the parafollicular domain. In contrast to classic papillary carcinoma, there was an altered distribution of the reaction product in the promoter regions such as diffuse cytoplasmic staining. According to specialists, this is the result of aberrant cell signaling as an alternative response to the thyroid transcription factor [Choi, 2005]. It is from this point of view that we investigated the activity of thyroid transcription factor (TTF-1) as an evaluation of thyroglobulin and thyroperoxidase gene translation. It is noteworthy that TTF-1 shows complete preservation of immunoreactivity in Riedel's thyroiditis (Diagram N6), confirming the phenotypic stability of the thyroid gland and its non-reactivity as a "precancerous" condition.

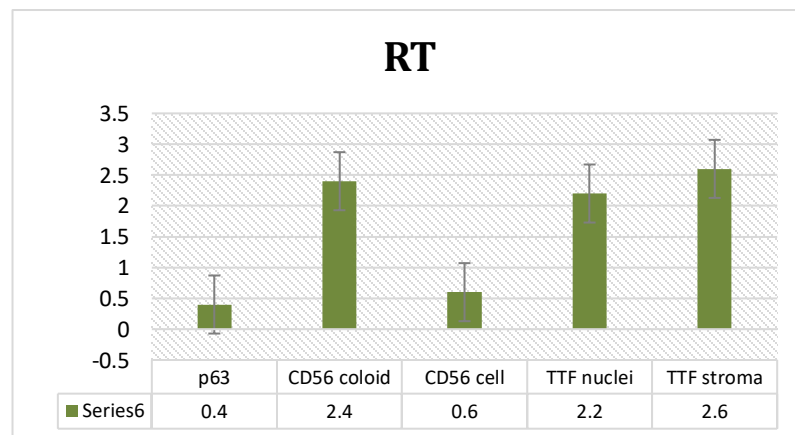


Diagram N6. Immunoreactivity of different markers in RT parenchyma.

In contrast, decreased parenchymal reactivity in most papillary carcinomas (PTC or PTMC) shows that TTF-1 activity is fully correlated with cell cycle phases in Hashimoto's thyroiditis and PTC tumor parenchyma, namely with Cyclin D1 expression (Diagram N4). As a kinase, Cyclin D1 stimulates nuclear transcriptional processes on TTF-1 example, which can be interpreted as a marker of thyroid carcinoma differentiation [Choi, 2005; Katoh, 2000].

## Conclusions

1. In the thyroid tumor tissue of papillary thyroid carcinoma (PTC) and microcarcinoma (PTMC), are present: the classic variant and variants of tumor cells associated with an aggressive behaviour.

Classic variants most common histological type of thyroid malignancy - compact branched papillary structures with fibrovascular core, extensive lymphocytic infiltration; with a "bunch of grapes"-like and nested aggregation architecture of cells.

2. Cytological types of cells associated with the aggressive behaviour of PTMC and PTC include: Tall cells, Tram-track, Hobnail, and Columnar cell type.
3. In the architecture of the tumor field of PTMC and PTC developed the background of Hashimoto's autoimmune thyroiditis, aggressive cytological variants are maximally represented, equivalent to the so-called With the clinical picture of "Hashimoto-toxicosis" and high anti-TPO antibody titer, which may be associated with an unfavorable prognosis.
4. In Hashimoto's thyroiditis and the background of Hashimoto's thyroiditis developed PTC and PTMC enhancement of receptor status is expressed for Cyclin D1, which indicates aggressive biological behaviour and metastatic potential of the process.

The results of statistical analysis, the Mann-Whitney U test, based on dispersial parameters, confirm the presence of follicular epithelial dysplasia (FED) and disorganization of architectonics, a focal increase in the number of immature follicular cells in the parenchyma of autoimmune Hashimoto's thyroiditis. At the same time, high expression of Cyclin D1 and moderate expression of p63 protein, with high identity to solid nest cells, is revealed. Immunoexpression in both - cellular and colloid domains.

5. Nuclear papillary characteristics of non-invasive thyroid tumor (microcarcinoma) cells by immunohistochemical examination and histological features are criteria for identification of so-called "precancerous" and "Gray Zone" cells.
  - A) Decreased immunoexpression of CD56 protein on PTC material associated with Hashimoto's thyroiditis indicates tumor progression, which is inversely related to p63 protein activity. CD56 protein expression is markedly decreased in papillary carcinoma, high in the parenchyma of Hashimoto's thyroiditis.
  - B) Moderate and high expression of CD56 protein in autoimmune Riedel thyroiditis tissue, together with high expression of TTF-1, indicates maintenance of the phenotype and absence of precancerous risk.
6. Thyroid transcription factor (TTF-1) studies, assessing its activity as a translational regulator of thyroglobulin and thyroperoxidase genes, show maintenance of receptor status for TTF-1 in Riedel's thyroiditis.
7. CD56 and p63 are most favorable markers for differentiated thyroid carcinoma. And the expression of Cyclin D1 can be presented as a marker of thyroid carcinoma differentiation.

## Published papers:

1. CHEMOTHERAPY, HYPOTHYROIDISM AND ORAL DYSBIOSIS AS A NOVEL RISK FACTOR OF CARDIOVASCULAR PATHOLOGY DEVELOPMENT. *Current Problems in Cardiology*. IF 5.2. Available online 18 November 2021, 101051. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2021.101051>
2. Follicular epithelial dysplasia of the thyroid gland on the background of Hashimoto Thyroiditis. 23rd European Congress of Endocrinology (ECE) 2021, *Endocrine Abstracts* May 2021 Volume 73:360. DOI: 10.1530/endoabs.73.AEP711
3. Correlation of Thyroid Autoimmunity with Atherosclerosis Evaluation in Hashimoto's Thyroiditis. *Georgian Medical News*. 2021 №1 (310):142-149
4. A study of the relationship between RET/PTC and Cyclin D1 expression of the thyroid under autoimmune thyroiditis and Papillary thyroid carcinoma (PTC): Clinical-pathological correlation. 22nd European Congress of Endocrinology (ECE) 2020, *Endocrine Abstracts* September 2020 Volume 70:384. DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP955
5. Coexistent presentation of Graves' disease and a Riedel's thyroiditis - Diagnostic dilemma. *TRANSLATIONAL AND CLINICAL MEDICINE - GEORGIAN MEDICAL JOURNAL*. Vol 5, No 1 (2020):27-30.
6. Molecular-biological thyroid profile during autoimmune disease - Hashimoto and Riedel's Thyroiditis. *Georgian Medical News*. 2019 , №5 (290):116-120.
7. Comparative analysis of Hashimoto's and Riedel's Thyroiditis morphology and immunohistochemistry. 21st European Congress of Endocrinology 2019 (ECE) 2019, *Endocrine Abstracts* May 2019 Volume 63:293. DOI: 10.1530/endoabs.63.P376
8. Autoimmune thyroid disease (Hashimoto thyroiditis) discussions as possible predicting of thyroid papillary microcarcinoma (MPTC). 20th European Congress of Endocrinology (ECE) 2018, *Endocrine Abstracts* May 2018 Volume 56: 624. DOI: 10.1530/endoabs.56.EP191
9. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) correlates with the degree of papillary thyroid carcinoma (PTC). *Archiv Euromedica* 2017, vol. 7, num. 2:64.