

დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ეკატერინე ბარაბაძე

**BRAF მუტაციის ექსპრესიის
თავისებურებანი ფარისებრი ჯირკვლის
სხვადასხვა ტიპის კვანძოვანი
დაზიანებების დროს**

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ავტორეფერატი

თბილისი 2018

ნაშრომი შესრულებულია შპს პათოლოგთა და ციტოლოგთა გაერთიანება- პათჯეო-ს და ენდოკრინოლოგია-მეტაბოლოგია-დიეტოლოგიის ცენტრ-ენმედიცი-ის ბაზაზე

სამედიცინო ხელმძღვანელი:

გიორგი ზურკაძე - აკადემიკოს ნ.ყიფშიძის სახელობის ცენტრალური საუნივერსიტეტო კლინიკის პათოლოგიური ანატომიის დეპარტამენტის ხელმძღვანელი, საქრთველოს პათოლოგთა და ციტოპათოლოგთა ასოციაციის პრეზიდენტი, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი

ოფიციალური ექსპერტები/ობონენტები:

რიმა ბერიაშვილი - თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტის პათოლოგიისა და სასამართლო მედიცინის მიმართულება, ციტოპათოლოგიის დეპარტამენტის პროფესორი, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი

ლიანა გოგიაშვილი - თსუ, ალექსანდრე ნათიშვილის მორფოლოგიის ინსტიტუტის კლინიკური და ექსპერიმენტული პათოლოგიის დეპარტამენტის ხელმძღვანელი, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი

ლევან რამიშვილი - კლინიკა"ენმედიცის" ენდოკრინული ქირურგიის მიმართულების ხელმძღვანელ, თავისა და კისრის ქირურგი, ონკოლოგი, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი

დისერტაციის დაცვა დავით ტვილდიანის სამედიცინო უნივერსიტეტში შექმნილი ერთჯერადი სადისერტაციო საბჭოს სხდომაზე, თბილისი, ლუბლიანას ქ.2/6

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება დავით ტვილდიანის სახელობის სამედიცინო უნივერსიტეტის ბიბლიოთეკაში

ავტორეფერატი დაიგზავნა

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი, მედიცინის დოქტორი
თამარ თალაკვაძე

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება პრობლემის აქტუალურობა

ფარისებრი ჯირკვლის კიბო ყველაზე ხშირი ენდოკრინული სიმსივნეა(1). მსოფლიოს მასშტაბით აღინიშნება ახალი შემთხვევების ყოველწლიური ზრდა და ამავე დროს, მატულობს ახლადდაიგნოსტირებული შემთხვევების პროცენტული მაჩვენებელიც(2).დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრის (NCDC)მონაცემებზე დაყრდნობით, საქართველოში კიბოს პოპულაციური რეგისტრის 2015 წლის მონაცემების მიხედვით ფარისებრი ჯირკვლის კიბომ მე-2 ადგილი დაიკავა ქალებში რეგისტრირებული ყველა ლოკალიზაციის კიბოს ახალ შემთხვევებში. ამავე მონაცემებზე დაყრდნობით, ფარისებრი ჯირკვლის კიბოს ახალი შემთხვევების რაოდენობა, მოზარდ გოგონებში პირველ ადგილს, ხოლო მოზარდ ბიჭებში მეორე ადგილს იკავებს(3). მსოფლიო სტატისტიკით ფარისებრი ჯირკვლის კიბოს განსაკუთრებული ზრდა აღინიშნა, ხოლო მათი ძირითადი უმეტესობა კლასიკურ პაპილარულ კარცინომაზე მოდის(1). კიბოს სტატისტიკისთვის ძალიან მნიშვნელოვანია ის ფაქტიც, თუ რომელ ასაკობრივ ჯგუფში ხდება მისი გამოვლენა, ვინაიდან ცალკეული სიმსივნური შემთხვევებისთვის ჩამოყალიბდა მოდელი, რომლითაც განისაზღვრება კიბოს ლატენტურობა (4). ასაკი, ისევე როგორც, სიმსივნის ზომა, მნიშვნელოვანი ფაქტორია რისკის განსაზღვრისთვის, მაგ. 1 სმ ზომის კვანძი ახალგაზრდა ასაკში ატარებს განხვავებულ რისკს ამავე ზომის კვანძისაგან 70 წლის ასაკში, ლატენტური პერიოდი მოკლეაა ახალგაზრდა ასაკში, შესაბამისად ზრდის სიხშირე მაღალია, მაღალია მეტასტაზირების კოეფიციენტიც. საკმაოდ ვრცელმა კვლევამ (5) გვიჩვენა, რომ მიკროკარცინომების შემთხვევაში, მეტასტაზირების რისკი უფრო მაღალია ახალგაზრდა ასაკობრივ ჯგუფებში, ვიდრე ხანდაზმულ ასაკში.

მიუხედავად იმისა, რომ წინა წლებთან შედარებით სამედიცინო მომსახურებაზე ხელმისაწვდომობა გაიზარდა, გაუმჯობესდა დაიგნოსტიკის მეთოდები, შესაძლებელი გახდა მაღალ-ტექნოლოგიური აპარატურით კიბოს ადრეული გამოვლენა და ამავე დროს, გაუმჯობესდა მკურნალობის ტაქტიკა, შემუშავდა ახლებური მიდგომები, აღნიშნული დაავადებით სიკვდილიანობის მაჩვენებელმა მაინც იმატა(0,8-1,5%)(6,7).

თანამედროვე შეხედულებებზე დაყრდნობით, მცირე ზომის სიმსივნეთა უმრავლესობა საშიშროებას არ წარმოადგენს შემდგომი პროგრესიის მხრივ(8), თუმცა უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ ასეთი სიმსივნეების ნაწილი მაინც პროგრესირებს, და მიუხედავად იმისა,

რომ ფარისებრი ჯირკვლის კიბო, სხვა სიმსივნეებთან მიმართებაში, უფრო კეთილსაიმედო პროგნოზით ხასიათდება, პაციენტების 10-15% აღნიშნებათ დაავადების აგრესიული ფორმა, რაც შესაბამისად სიკვდილიანობის რიცხვის მატებასთან ასოცირდება(9).

გენეტიკური და გარემო ფაქტორები მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ფარისებრი ჯირკვლის კიბოს განვითარებაში, მაგრამ განსაკუთრებით დიდი

მნიშვნელობა ენიჭება იოდის დეფიციტს, როგორც დაავადების ძირითად რისკ ფაქტორს, განსაკუთრებით კი ისეთ ენდემურ ზონებში, როგორც საქართველოა. აღნიშნული კიბოს რიცხვის განსაკუთრებული მატება აღინიშნა ახალგაზრდა ასაკში, კერძოდ, ახალგაზრდა გოგონებში. ამასთან მიმართებაში გასათვალისწინებელი ხდება მაიონიზირებელი რადიაცია, როგორც ფარისებრი ჯირკვლის კიბოს გამომწვევი ძირითადი რისკ ფაქტორი, ვინაიდან ახალგაზრდა ასაკში ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილი განსაკუთრებით მგრძობიარეა მაიონიზირებელი რადიაციის მიმართ. აღნიშნულ ფაქტზე დაყრდობით, მნიშვნელოვანია განისაზღვროს სხვადასხვა ასაკობრივ ჯგუფში კვანძოვანი დაზიანების არსებობის ალბათობა, შეძლებისდაგვარად გაიმიჯნოს ერთმანეთისგან ქირურგიული და თერაპიული პათოლოგიები, აგრეთვე, აღნიშნულ კვანძოვან დაზიანებებში შეფასდეს ავთვისებიანობის რისკი და შესაბამისად სწორად განისაზღვროს შემდგომი მკურნალობა.

ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებების არსებობისას წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალის ციტოლოგიური კვლევა პრინციპულად რეკომენდირებული დიაგნოსტიკის მეთოდია(10) და აღნიშნული დაზიანებების სწორი მართვისთვის “ ოქროს სტანდარტადაც” კი იწოდება(11). წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალის ციტოლოგიური კვლევა შესაძლებელია წარვმართოთ მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის მიერ აღიარებულ კლასიფიკაციის- ბეტესდას (The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytology(TBCRTC), რომელიც ექვსი ძირითადი ქვეკატეგორიისაგან შედგება და ერთგვარ ხიდს წარმოადგენს ციტოპათოლოგს, კლინიცისტს, რადიოლოგსა და ქირურგს შორის ურთიერთობისთვის. აღნიშნული სისტემა ავთვისებიანობის რისკის განსაზღვრის იდეალურ სტრატეგიცირებას იძლევა, მაგრამ მიუხედავად იმისა, რომ უმეტეს შემთხვევებში ამ სისტემაზე დაფუძნებული ციტოპათოლოგიური შეფასება ნატიფი და დახვეწილია, ციტოპათოლოგიური დიაგნოზების ერთი მესამედი მაინც ხვდება გაურკვეველი, როგორებიცაა განუსაზღვრელი მნიშვნელობის ატიპია (AUS-Atypia Undetermined Significance)

ან განუსაზღვრელი მნიშვნელობის ფოლიკულური დაზიანებები (FLUS-Follicular Lesions of Undetermined Significance) კატეგორიაში, რომლებისთვისაც ავთვისებიანობის ალბათობა შედარებით დაბალია, მაგრამ შესაძლებელია(12). აღნიშნული კატეგორიების მენეჯმენტი კლინიკურ დილემას წარმოადგენს(13). ბევრი მათგანის მიმართ მიდგომა ქირურგიულია, ითვალისწინებს რა ავთვისებიანობის რისკს აღინიშნულ კატეგორიებში, რომელიც არც თუ ისე დაბალია თანამედროვე კვლევებზე დაყრდნობით (14, 15). განუსაზღვრელი ატიპიის მქონე კატეგორიებში (AUS/FLUS) მოლეკულური ტესტები მნიშვნელოვან დიაგნოსტიკურ ბერკეტს წარმოადგენს(16).

მაგრამ ისმის მნიშვნელოვანი კითხვა, თუ რა ფაქტორი განაპირობებს სწორედ დაბალ ასაკობრივ ჯგუფში კიბოს და კერძოდ, პაპილარული კიბოს განვითარებას, ხომ არ არის განსაკუთრებული გენეტიკური მუტაციები, რომლებიც ზრდის სწორედ ამ ტიპის კიბოს განვითარების ალბათობას. ცალკეული კვლევები ჩატარდა ჩერნობილის ცნობილ აფეთქებასთან დაკავშირებით, 4-10 წლიანი ინტერვალის შემდგომ აღინიშნა პაპილარული კარცინომების რისკის მატება ახალგაზრდა ასაკობრივ ჯგუფში (18). სპორადული პაპილარული კარცინომის შემთხვევებში აღინიშნა ერთერთი ძირითადი ანტიგენის Ret ან BRAF ანტიგენის მუტაცია. რადიაციულ კარცინოგენეზთან უფრო შეჭიდულად გვევლინება Ret გენი (19,20,21) თუმცა კვლევებმა ცხადყო, რომ ჩერნობილის აფეთქების შემდგომ მოხდა უმეტესწილად BRAF ანტიგენის გააქტიურება(17). სწორედ ამ ფაქტზე დაყრდნობით, ძალიან მნიშვნელოვან საფუძვლად გვევლინება ამ კუთხით დამატებითი კვლევების წარმოება. ვინაიდან BRAF მუტაცია პაპილარული კიბოს ტუმოროგენეზში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს, მისაღები ხდება ის აზრი, რომ ეს მუტაცია განსაზღვრავს ამ ტიპის კიბოს კლინიკურ და პათოლოგიურ ქცევას და თამამად შეგვიძლია მივიჩნიოთ ნოვატორულ პროგნოზულ მარკერად(23,24).

ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებებისას მოლეკულური ტესტების გამოყენების მიმართ მზარდი ინტერესი ითვალისწინებს BRAF მუტაციას, როგორც პაპილარული კარცინომის გენეტიკური პროფილის ძირითად მახასიათებელს(22,25). BRAF ანტისხეულის პოზიტიურობის გამოვლენა შესაძლებელია წარმატებით იქნეს გამოყენებული პაპილარული კარცინომის არა მხოლოდ სადავო შემთხვევების დიაგნოსტიკაში, არამედ როგორც პროგნოზული მარკერი, რადგანაც სწორედ ამ მუტაციის არსებობა პაპილარული კარცინომების შემთხვევაში შეესაბამება არაკეთილსაიმედო პროგნოზულ პარამეტრებს, როგორებიცაა მულტიცენტრულობა,

ექსტრატირეოიდული გავრცელება და ლიმფურ კვანძებში მეტასტაზირება(26,27,28).

სხვადასხვა რისკის მქონე პაპილარული კიბოთი დაავადებულთა რისკის სწორად შეფასებამ პრეოპერაციულად შესაძლებელია სრულად განსაზღვროს თირეოიდექტომიის ფართობი და ლიმფური კვანძების დისექციის მასშტაბი(29). პაპილარული მიკროკარცინომების შემთხვევაში BRAF ანტიგენი ნაკლებად ვლინდება, თუმცა გამოვლენის შემთხვევაში, აღნიშნული კიბო აგრესიული მიმდინარეობით ხასიათდება. შესაბამისად იმ პაციენტებთან მიმართებაში, რომლებსაც მიკროკარცინომების შემთხვევაში აღნიშნათ BRAF ანტისხეულის ექსპრესია აუცილებელი ხდება ადვანტური მკურნალობის, რადიკატიული იოდით აბლაციის, ტოტალური თირეოიდექტომიის და ლიმფოდისექციის ჩატარება (30). აღნიშნული საკითხი კი განსაკუთრებით აქტუალურია დღესდღეობით, ვინაიდან მიკროკარცინომების მენეჯმენტი საყოველთაო დავის და აზრთა სხვადასხვაობის მიზეზია (31).

2016 წელს განხორციელებული რეკლასიფიცირების საფუძველზე პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური ვარიანტის ინვაზიური ფორმა (IFVPTC-Inlarvasive Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma) გაიმიჯნა არაინვაზიური ფორმისგან და ეს უკანასკნელი იწოდება, როგორც არაინვაზიური ფოლიკულური ნეოპლაზია პაპილარული კარცინომის მსგავსი ბირთვული ცვლილებებით (NIFTP- noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features) (32). შესაბამისად BRAF მუტაციის სტატუსის განსაზღვრა ამ ტიპის დაზიანებების სადიფერენციაციოდ განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი ხდება პაციენტის შემდგომი მენეჯმენტისთვის.

მნიშვნელოვანია განისაზღვროს BRAF ანტისხეულის გამოვლენა ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებებისთვის დამახასიათებელ უკვე კარგად ადაპტირებულ ანტისხეულებთან მიმართებაშიც. კერძოდ, HBME_1, CK-19, CD-56, TTF-1 და KI-67-თან მიმართებაში. აუცილებელია შეფასდეს მათი თანაექსპრესიის ალბათობა და სიხშირე, განისაზღვროს თუ როგორ შეიძლება იცვლებოდეს მათი თანაექსპრესია კეთილთვისებიან, მოსაზღვრე და ავთვისებიან ფორმებს შორის, ასევე შეფასდეს, თუ როგორ იცვლება მათი თანაექსპრესია კიბოს აგრესიულობის ზრდასთან ერთად.

კვლევის მიზანი

ჩვენი კვლევის ძირითად ამოცანებს წარმოადგენდა:

-წერილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიის დიაგნოსტიკაზე ბეტსდას კლასიფიკაციის მიხედვით, ბეტსდას კლასიფიკაციის თითოეული კატეგორიის გამოვლენის ალბათობა სხვადასხვა ასაკობრივ ჯგუფში.

-ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებებისას ციტოპათოლოგიური და ჰისტოპათოლოგიური კორელაციების გამოვლენა.

-ფარისებრი ჯირკვლის პათოლოგიების ფენოტიპური მახასიათებლების გამოვლენა

-ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებების შემთხვევაში ბეტსდას კლასიფიკაციით ავთვისებიანობის რისკის გამოვლენა

- BRAF მუტაციის ექსპრესიის გამოვლენა ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა პათოლოგიების დროს.

აღნიშნული კვლევა საშუალებას მოგვცემს ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანება შეფასდეს მრავალწახნაგოვან ჭრილში, განისაზღვროს ასაკობრივი თავისებურებები და ავთვისებიანობის რისკი თითოეულ ასაკობრივ ჯგუფში, გამოვლინდეს ფარისებრი ჯირკვლის პათოლოგიათა ფენოტიპური მახასიათებლები და BRAF მუტაციის გადანაწილების თავისებურებები სხვადასხვა პათოლოგიების დროს. ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებების ერთიან ჭრილში გაანალიზება საშუალებას მოგვცემს დღესდღეობით მეტად აქტუალური პრობლემის კლინიკური მართვისა და დაგეგმარებისთვის.

კვლევის მასალა და მეთოდები

წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიით მიღებული მასელები (FNA -ბიოფსიური მასალები):

ერთი წლის განმავლობაში 2013-2014 შეგროვილი იქნა 600 პაციენტიდან მიღებული წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა. მასალის შეგროვებაში ჩართული იყო სამი კლინიკური დაწესებულება (New Hospitals -ნიუ ჰოსპიტალი, თბილისის ონკოლოგიური ცენტრი და ეროვნული სკრინინგ ცენტრი). შეგროვდა აღნიშნული შემთხვევების ყველა კლინიკოდიანგნოსტიკური მონაცემი. ციტოპათოლოგიური შემთხვევების მოძიება არქივის კომპიუტერული მოძიების შედეგად განხორციელდა.

ყველა წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსია ჩატარდა ულტრაბგერითი კონტროლის ქვეშ, ასეპტიკის და ანტისეპტიკის ძირითადი ნორმების გათვალისწინებით. მეთოდისთვის გამოყენებული იქნა 23-25G გაუდიანი შპრიცები. პროცედურის შესრულებისთანავე მომზადდა რამოდენიმე ნაცხი და სწრაფად დაფიქსირდა 95%-იანი ეთილის სპირტით. ყველა მათგანი შეიღება პაპანიკოლაუს უკვე კარგად ადაპტირებული მეთოდით. იმ შემთხვევებში, როდესაც მივიღეთ სითხე, აღნიშნული სითხე დავაცენტრიფუგეთ და ნალექი გავნაცხეთ რამოდენიმე სასაგნე მინაზე, რომლებიც ასევე შეიღება რუტინული პაპანიკოლაუს მეთოდით. მასალის ინტერპრეტაცია განხორციელდა მიკროსკოპის ქვეშ გამოცდილი ციტოპათოლოგის მიერ, ასევე, განხორციელდა საკვლევ მასალათა უმეტესი ნაწილის განმეორებითი შეფასება სხვა ციტოპათოლოგის მიერ. შეფასება სრულიად ემყარებოდა ციტომორფოლოგიაში არსებულ დღევანდელ სტანდარტებს და ინტერპრეტაციებს, შესაბამისად ის განხორციელდა ბეტესდას კლასიფიკაციის მიხედვით. თითოეული შემთხვევის კლასიფიკაციის გარკვეულ ჯგუფში განთავსება მოხდა მასალის ადექვატურობასთან დაკავშირებულ გაილიანებზე დაყრდნობით. ადექვატურად და დიაგნოსტიკისთვის გამოსადეგად ჩაითვალა ისეთი ციტოლოგიური მასალა (91,3%), რომელიც შეიცავდა კარგად შენახულ ფოლიკულური უჯრედებისაგან შემდგარ ხუთ-ექვსი ჯგუფს, რომელთაგანაც თითოეულ ჯგუფში აღნიშნებოდა არანაკლებ ათი უჯრედი. შეირჩა მხოლოდ ისეთი მასალები, რომლებიც ტექნიკურად იდეალურად იყო მომზადებული, შესაბამისად ასპირატების განაცხვავ მოხდა სწრაფად, მათი სწრაფად დაფიქსირებით, რათა თავიდან აგვეცილებინა, ის უჯრედული ცვლილებები, რომლებიც სირთულეებს ქმნის ციტომორფოლოგიურ დიაგნოსტიკაში და უმეტეს შემთხვევებში ფიქსაციის დეფექტებს უკავშირდება.

დიაგნოსტიკისას გათვალისწინებულ იქნა ყველა კლინიკური და რადიოლოგიური მონაცემი, რაც კი თითოეულ შემთხვევას უკავშირდებოდა. ასპირატები, რომლებიც არაადექვატურად შეფასდნენ, დაექვემდებარნენ განმეორებით ასპირაციას, რადგანაც მრავალ კვლევაზე დაყრდნობით არაადექვატურ მასალებში კიბოს არსებობის რისკი დაახლოებით 5-15%-ია. განმეორებითი წვრილნემსიანი ასპირაციული კვლევა ჩატარდა 52 შემთხვევიდან მხოლოდ 24 შემთხვევაში. პაციენტთა ნაწილმა უარი განაცხადა განმეორებით კვლევაზე.

ჰისტომორფოლოგიურ ბაზაზე დაყრდნობით შევარჩიეთ ისეთი პაციენტები, რომლებსაც უკვე ჩაუტარდათ ქირურგიული მკურნალობა. ავთვისებიანობის რისკი ბეტესდას სისტემის თითოეულ კატეგორიაში განისაზღვრა ციტოპათოლოგიური და ჰისტოპათოლოგიური მონაცემების გათვალისწინებით.

ყველა პაციენტი, რომელიც ჩართული იყო ამ კვლევაში დაიყო ასაკის და სქესის მიხედვით, აგრეთვე, კლინიკური და რადიოლოგიური მონაცემების გათვალისწინებით. პაციენტების ასაკი მერყეობდა 20-დან 80 წლამდე. ჩვენ ისინი პირობითად დავაჯგუფეთ ოთხ ასაკობრივ ჯგუფად: I- 20-დან 35 წლამდე, II- 36-დან 50 წლამდე, III- 51 წლიდან 65 წლამდე და IV- 66 წლიდან 80 წლამდე. განისაზღვრა, თუ ბეტასდას კლასიფიკაციის რომელი კლასი, რა უპირატესობით ვლინდებოდა თითოეულ ასაკობრივ ჯგუფში, შეფასდა თითოეულ ჯგუფში ბეტესდას კატეგორიათა პროცენტული მაჩვენებელიც. შემდეგ ჩვენ განვსაზღვრეთ როგორ თანხვედრაში იყო თითოეული ციტომორფოლოგიური დიაგნოზი მოძიებულ ჰისტომორფოლოგიურ დიაგნოზებთან, თითოეულ ასეთ შემთხვევაში ჩამოვყალიბეთ ავთვისებიანობის რისკი.

მასალები ჰისტომორფოლოგიური და იმუნოჰისტოქიმიური კვლევისთვის:

ერთი წლის განმავლობაში 2014 წლიდან 2015 წლამდე ჰისტოლოგიური მასალების შეგროვება განხორციელდა შპს პათოლოგთა და ციტოლოგთა გაერთიანება- პათჯეო -ს (თბილისი, საქართველო) და ენდოკრინოლოგია-მეტაბოლოგია-დიეტოლოგიის ცენტრ- ენმედიცი-ის (თბილისი, საქართველო) ბაზაზე, ჰისტომორფოლოგიურ არქივებში. კვლევაში ჩართულობის კრიტერიუმები იყო: დიფერენცირებული ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნეები, რომლებიც ფოლიკულური ეპითელიდან წარმოდგებოდნენ, მოიცავდნენ რა ადენომატოზურ კვანძებს, პაპილარული კარცინომის ფორმებს: პაპილარული კარცინომის კლასიკურ ვარიანტს, პაპილარულ მიკროკარცინომებს, პაპილარული კარცინომის ფოლიკულურ ვარიანტს(ინკაპსულირებულს), ფართეუჯრედულ

ვარიანტს, პაპილარულ კარცინომას მულტიცენტრული ზრდით და ექსტრათირეოიდული გავრცელებით, ფოლიკულურ ადენომას, ფოლიკულურ კარცინომას, ჰურტლის უჯრედულ დაზიანებებთან ერთად. კვლევაში გამოყენებულ იქნა ნორმალური ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილისგან შემდგარი მასალებიც. საერთო ჯამში კვლევა განხორციელდა 54 შემთხვევაზე, სადაც 4 შემთხვევა შეიცავდა მხოლოდ ნორმალური ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილს. პარაფინში ჩაყალიბებული მასალა კარგად დამუშავებული და შენარჩუნებული არქიტექტონიკული მახასიათებლებით უნდა ყოფილიყო.

ჰისტომორფოლოგიური ინტერპრეტაცია განხორციელდა განმეორებით ორი დამოუკიდებელი ჰისტოპათოლოგის მიერ. დიაგნოსტიკა, გრეიდინგი მთლიანად დაეყრდნო მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის (WHO) მიერ ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნური პროცესების დიაგნოსტიკურ კრიტერიუმებს.

იმუნოჰისტოქიმიური კვლევისთვის, ფორმალინში დაფიქსირებული და პარაფინში ჩაყალიბებული მასალებისგან ანათლების დამზადება განხორციელდა 3-4 მიკრონზე მიკროტომის საშუალებით. მმასალების განთავსება მოხდა ადჰეზივით დამუშავებულ სასაგნე მინებზე. სასაგნე მინები მოთავსდა DAKO-ს PT Link-ში კოდი: PT10126). PT Link-ში, რომელშიც წინასწარ ჩასხმული იყო ბუფერი- Target retrieval solution high ph 50X, რომელიც თავის მხრივ წარმოადგენს, როგორც ანტიგენის აღმდგენს, ასევე დეპარაფინიზაციის ბუფერს. აღნიშნულ აპარატში ანტიგენის აღდგენა განხორციელდა 20 წუთის განმავლობაში, 97 OC-ზე.

აღდგენის პროცესის დამთავრებისთანავე სასაგნე მინები გადავიდა WASH BUFFER(20X)-ში, ამავე ფირმის კოდი: K8000,DM831.

შემდეგი ეტაპი იყო Envision Flex Peroxidase-blocking reagent -5წთ. (კოდი: K8000,შM801)

კვლევაში გამოყენებული იქნა შემდეგი პირველადი მონოკლონური ანტისხეულები: 1.HBME-1 monoclonal mouse, კოდი: M3505, კონცენტრირებული ანტისხეული TTF1 Monoclonal mouse , კოდი:M3575 კონცენტრირებული ანტისხეული განზ: 1:100. 3. CD56 Monoclonal mouse , კოდი: M 7304. კონცენტრირებული ანტისხეული განზ: 1:100. 4. CK19 Monoclonal mouse , კოდი: M 0888 , კონცენტრირებული ანტისხეული განზ: 1:75. 5. Anti-BRAF antibody produced in rabbit , კოდი (SIGMA- HPA001328) განზ: 1:75 შემდეგ ეტაპი განხორციელდა მეორადი ანტისხეულით- Envision Flex/HRP, კოდი:K 8000 SM802

ინკუბაციის პერიოდი წარმოადგენდა 20 წუთს.

ქრომოგენის ეტაპი: Envision Flex substrate buffer , DAB + Chromogen, (სუბსტრატის და კონცენტრატის) განზავებით: 1:50. ინკუბაციის დრო:

5-25წთ.

შემდეგ პრეპარატები რამდენიმე წამით შეიღება GILL 3 HEMATOX-ILIN -ში.

დეჰიდრატაცია, გამჭვირვალობა და საფარი მინის დაფარება Moutant synthetic.

იმუნოჰისტოქიმიური შეფასება განხორციელდა და შეჯამდა ცხრილის სახით. მოცემული მასალები განთავსდა აღნიშნული ცხრილის ოთხ გრაფაში:

1. მასალები, რომლებიც არ ავლენენ მოცემული ანტისხეულების ექსპრესიას.
2. მასალები, რომლებშიც აღინიშნება სუსტი ექსპრესია(ნაკლებია 10%-ზე)
3. მასალები, რომლებიც ავლენენ ზომიერ ექსპრესიას(11%-დან 50% მდე)
4. მასალები, რომლებიც ავლენენ მკვეთრ ექსპრესიას(მეტია 51%-ზე)

ჩვენს მიერ წარმოებული კვლევის სტატისტიკური ანალიზი განხორციელდა სტატისტიკური ანალიზის მეთოდის ANOVA, SPSS (Version 21) საშუალებით. სტატისტიკურად სარწმუნოდ და მნიშვნელოვნად ჩაითვალა კვლევის ის შედეგები, რომელთა P -value ნაკლები აღმოჩნდა 0,05(<5%)-ზე.

ჰისტომორფოლოგიური კვლევის შემდგომ, როგორც უკვე აღინიშნა, მასალები დაჯგუფდა რვა ძირითად ჰისტოლოგიურ ჯგუფად, რომელთა გრადაცია იზრდებოდა აღნიშნული ჰისტომორფოლოგიური ჯგუფის აგრესიულობის ხარისხის მიხედვით. თითოეულ ჯგუფში განისაზღვრა მათი სიხშირე და პროცენტული მაჩვენებელი, აგრეთვე, ვალიდური და კუმულაციური პროცენტი:

- 0---Nნორმალური ფარისებრის ქსოვილი- 4 (7,4%)
- 1---ადენომატოზური ჰიპერპლაზია - 6 (11,1%)
- 2---ფოლიკულური ადენომა- 5 (9,3%).
- 3--- პაპილარული კარცინომა ინკაფსულირებული- 3 (5,6%)
- 4--- პაპილარული მიკროკარცინომა- 9 (16,7%)
- 5--- პაპილარული კარცინომა-17 (31,5%)
- 6--- პაპილარული კარცინომა მულტიცენტული - 4 (7,4%).
- 7--- პაპილარული კარცინომა ექსტრათირეოიდული გავრცელებით - 3 (5,6%)
- 8--- ფოლიკულური კარცინომა - 3 (5,6%).

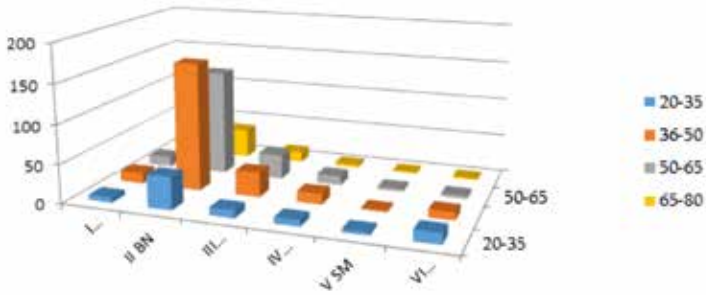
ჩატარდა უნივარიანტული ანალიზი, სადაც დამოკიდებულ ანუ გამოსავლის ცვლადად (Dependent Variable) ჩაითვალა anti-BRAF ანტისხეულის ექსპრესია, ხოლო მუდმივ ანუ პრედიქტორულ ცვლადად (Predicrors: Constant) დანარჩენი ხუთი ანტისხეულის

ექსპრესია. თუ არასტანდარტული კოეპიციენტი შეფასდა დადებით რიცხვად, მიჩნეულ იქნა, რომ თითოეული პრედიქტორული ცვლადის ექსპრესია განაპირობებს დამოკიდებული ცვლადის ექსპრესიასაც, ხოლო სტატისტიკურად კი ეს მნიშვნელოვანია, როდესაც $P < 0,05$.

ჩვენს მიერ გამოკვლეულ 54 შემთხვევაში შესრულდა მრავალცვლადიანი სტატისტიკური ანალიზი. განისაზღვრა შანსთა თანაფარდობა (OR). ნორმად შეფასდა გამოკვლეულ ანტისხეულთა სუსტი ექსპრესია ან უარყოფითი ექსპრესია, ხოლო 1-ით აღინიშნა საშუალო ან მკვეთრი ექსპრესია.

კვლევის შედეგები

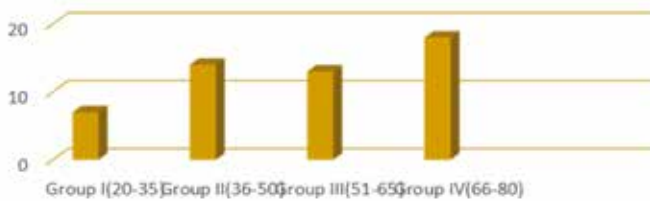
ციტოლოგიური და ჰისტოლოგიური კვლევის შედეგები წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალის მიღება ულტრასონოგრაფიული კონტროლის ქვეშ განხორციელდა 600 პაციენტში, დიაგნოსტიკა და FNA - ბიოფსიური მასალის ინტერპრეტაცია მოხდა ბეტესდას კლასიფიკაციის მიხედვით. კაცებსა და ქალებს შორის თანაფარდობა განისაზღვრა და აღმოჩნდა, რომ ის წარმოადგენდა 1: 9, რამაც გვიჩვენა, რომ ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაავადება ჩვენს მიერ გამოყენებულ საკვლევ მასალში დომინირებს ქალებში. განისაზღვრა დამოკიდებულება ასაკობრივ ჯგუფებსა და ბეტესდას სისტემის დიაგნოსტიკური კრიტერიუმებით შეფასებულ საკვლევ მასალებს შორის. ეს კორელაციები წარმოდგენილია შემდეგი გრაფიკული გამოსახულები სახით:



გრაფიკი 1. ურთიერთკავშირი ასაკობრივ ჯგუფებსა და წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიით მიღებული მასალის ბეტესდას კლასიფიკაციის კატეგორიებს შორის (ND-დიაგნოსტიკისთვის არასაკმარისი, BN-კეთილთვისებიანი კვანძი, AUS -ატიპია განუსაზღვრელი მნიშვნელობის, SFN -საექვო ფოლიკულურ ნოპლაზიაზე, SM-საექვო ავთვისებიანი პროცესის არსებობაზე, MGT -ავთვისებიანი).

ჩვენ კვლევაზე დაყრდნობით, 600 ჩატარებული ბიოფსიიდან 52 პაციენტის შემთხვევაში (8,7%) ასპირაციული ბიოფსიური მასალა შეფასდა არაადექვატურად, ეს ფაქტი კი უკავშირდებოდა ცისტური წარმონაქმნების ან მაკროკალცინატების არსებობას. მოცემულ პაციენტთაგან 24 შემთხვევაში განხორციელდა განმეორებითი ასპირაციული ბიოფსიის წარმოება, რომლის შემდეგ მასალის გადანაწილება განხორციელდა შესაბამის კატეგორიებში, მადგან 1 აღმოჩნდა ავთვისებიანი პროცესი, ხოლო 6 შემთხვევა შეფასდა კვლავ არაადექვატურად. მიღებული შედეგები წარმოდგება შემდეგი

გრაფიკული გამოსახულების სახით:

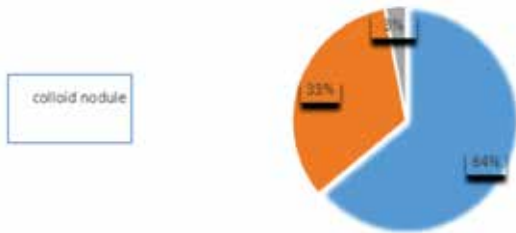


გრაფიკი 2. ურთიერთკავშირი ასაკობრივ ჯგუფებსა და ბეტესდას კლასიფიკაცია 1-ს (ND/ UNS - არადიაგნოსტირებადი, არაადექვატური დიაგნოსტირებისთვის) შორის. I ასაკობრივი ჯგუფი(n=7), II ჯგუფი(n=13), IIIჯგუფი(n=12), IV ჯგუფი(n=20).

ბეტესდას კატეგორია 2 - ანუ კეთილთვისებიანი წარმონაქმნები ზოგადად, წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიით მიღებულ მასალათა 60-70% წარმოადგენს. ჩვენს მიერ წარმოებულ კვლევაში ბეტესდას კატეგორია 2-ად ანუ კეთილთვისებიან წარმონაქმნებად შეფასდა საკვლევ შემთხვევათა 63% და მათი უმრავლესობა განთავსდა II (n=164), III(n=132) ასაკობრივ ჯგუფში. ციტოპათოლოგიური დიაგნოსტირებისას ყველაზე ხშირად აღინიშნებოდა კოლოიდური კვანძების არსებობა(64%), მოიცავდა რა კოლოიდურ კვანძებს ჰემორაგიებით, ცისტური დეგენერაციით ან ადენომატოიდური ზრდით. კეთილთვისებიან დიაგნოზებს შორის აღინიშნებოდა ჰაშიმოტოს თირეოიდიტი(28%), დე ქუერვეინის თირეოიდიტი(5%) და ფარ-ინის ცისტები(3%). კეთილთვისებიან წარმონაქმნებში ფოლიკულური უჯრედები განლაგებული იყო ერთშიანი პლასტების სახით, ცალკეულ შემთხვევებში კი ქმნიდა ძალზედ მოწესრიგებულ სამგანზომილებიან სტრუქტურებს, რომლებიც სრულიად ინტაქტური იყო, ქმნიდა რა უჯრედულ სფეროებს. თუმცა, ანაიზონუკლეოზი აღინიშნებოდა ცალკეულ შემთხვევებში, მაგრამ გამოკვეთილი პლეომორფიზმი და ბირთვული ატიპია არ გამოვლინდა. აღინიშნა ერთეული მიკროფოლიკულური სტრუქტურაც. უზუხუჯრედოვნება არ აღინიშნა, ძირითადად, საკვლევი ნაცხები ავლენდნენ მცირეუჯრედოვნებას და ეს ვლინდებოდა მასალათა 52,2%-ში, ან ზომიერუჯრედოვნებას და ეს აღინიშნებოდა 47,8% შემთხვევებში. პლეომორფიზმი აღინიშნა მხოლოდ შემთხვევათა 2,9%-ში, ერთეული ჰურტლის უჯრედი გამოვლინდა შემთხვევათა 2,2%-ში, მაკროფაგები(ღრუბლისებური უჯრედები) აღინიშნა შემთხვევათა 39%-ში. რაც შეეხება ფონს, კოლოიდთან ნარევი ერთთროციტებისაგან შემდგარი ფონი აღინიშნა შემთხვევათა 55,8%-ში, ხოლო მხოლოდ კოლოიდი შემთხვევათა

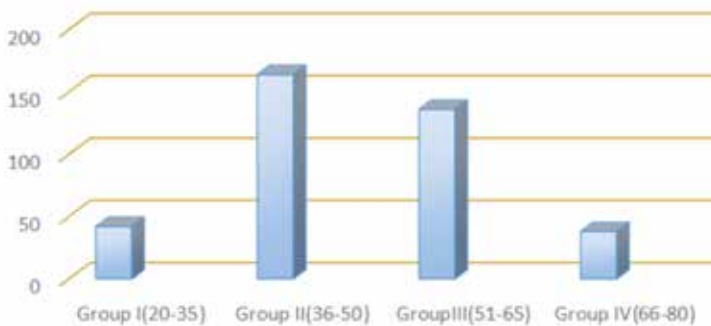
44,2%.

საკვლევი მასალების სუბკატეგორია ჰაშიმოტოს თირეოიდიტი წარმოადგენდა კეთილთვისებიანი კატეგორიის შემთხვევათა 28%. ყველა ნაცხი ზომიერად უჯრედული იყო. ლიმფოციტური პოპულაცია ზომიერად ვლინდებოდა შემთხვევათა 89%-ში. ლიმფოციტური უჯრედები პოლიმორფიზმს ავლენდნენ. შესაძლებელი იქნა ინტაქტური ლიმფოციტოციტური აგრეგატების აღმოჩენაც. უმეტეს შემთხვევებში აღინიშნებოდა ჰურტლის უჯრედების არსებობა. მრავალბირთვიანი უჯრედები აღინიშნა შემთხვევათა 27,8%-ში, ხოლო ეპითელიოციტური უჯრედები 11,2%-ში. კეთილთვისებიან წარმონაქმთა თანაფარდობა ბეტესდას მეორე კატეგორიაში შეგვიღია გრაფიკულად გამოვსახოთ:



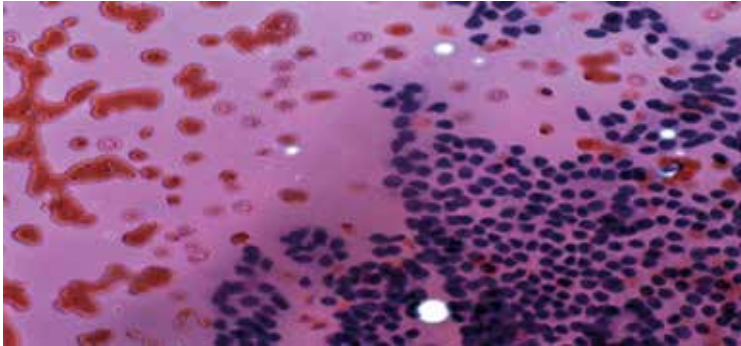
გრაფიკი 3. კეთილთვისებიანი წარმონაქმნების თანაფარდობა ბეტესდა 2კატეგორიაში. ცისფერი-კოლოიდური კვანძები, წითელი-თირეოიდიტები, ნაცრიფერი-ფარ/ინის ცისტები.

გრაფიკულად ჩვენი კვლევის მონაცემები შეგვიძლია შემდეგნაირად წარმოვადგინოთ, სადაც აღნიშნულია თანაფარდობები დიაგნოსტიკური კატეგორია 2-ს მიხედვით სხვადასხვა ასაკობრივ ჯგუფებში:

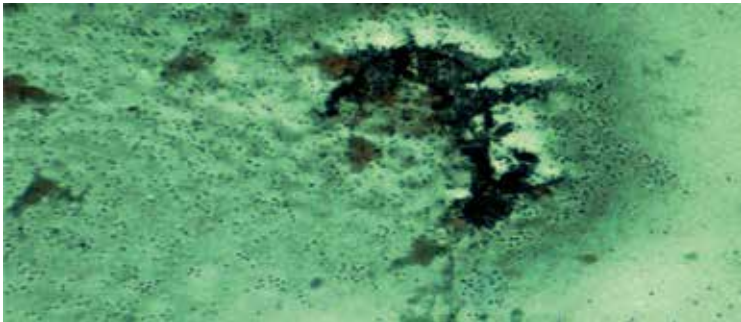


გრაფიკი 4. კურთხეობითი ასაკობრივ ჯგუფებსა და ბეტესდას კლასიფიკაციით მეორე კლასს(BN)-კეთილთვისებიან დაზიანებებს შორის. I ასაკობრივი ჯგუფი(n=44), II ჯგუფი(n=164), IIIჯგუფი(n=132), IV ჯგუფი(n=38).

ასევე წარმოვადგენთ პაპანიკოლაუს მეთოდით შეღებილ რამოდენიმე შემთხვევის ფოტოსურათს, სადაც აღნიშნულია ფარისებრი ჯირკვლის კეთილთვისებიანი წარმონაქმნები.



სურ. 1. კოლოიდური კვანძი. წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა 36წლისქალი.(პაპანიკოლაუს შეღებვა,40X)



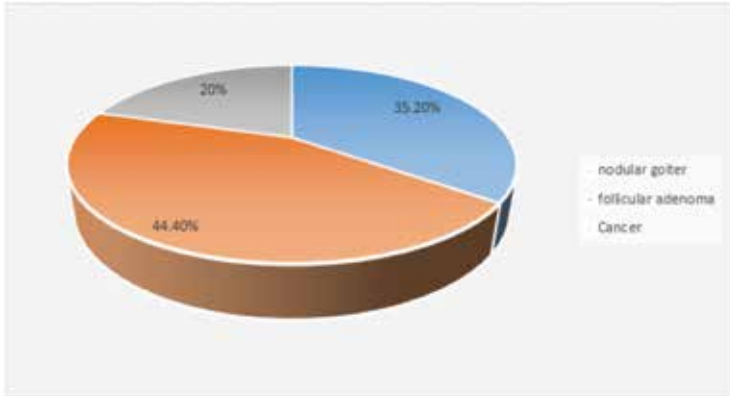
სურ. 2. ჰაშიმოტოს თირეოიდიტი. წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა 57წ. ქალი (პაპანიკოლაუს შეღებვა, 10X).

ჩვენი კვლევის ფარგლებში ოპერციულ მასალათა 76 შემთხვევიდან, აღმოჩნდა, რომ 59(77,6%) შემთხვევა განეკუთვნებოდა კვანძოვან ჩიყვს, 12(15,7%) შემთხვევა დადიაგნოზდა, როგორც ფოლიკულური ადენომა, ხოლო 5(6,5%) შემთხვევა როგორც პაპილარული კარცინომა, თუმცა მათი ზომა 1 სმ-ზე ნაკლები აღმოჩნდა და მათი ასპირაცია არც განხორციელებულა, ისინი მხოლოდ თირეოიდექტომიის შედეგად აღმოჩენილ შემთხვევითობად შეგვიძლია მივიჩნიოთ, რადგან

მრავალი კვლევის შედეგად შემთხვევით აღმოჩენილი კარცინომები, მხოლოდ აუტოფსიის შემდეგ თუ გამოვლინდება ხოლმე(131).

ბეტესდას კატეგორია 3- AUS/FLUS

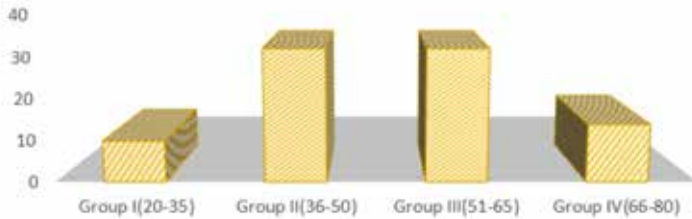
ბეტესდას კატეგორია 3-ს, რომელიც ყველაზე ჰეტეროგენულ დიაგნოსტიკურ კატეგორიას განეკუთვნება, ჩვენს მიერ გამოკვლეული 600 პაციენტიდან 88 პაციენტის წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა(14.6%) მიეკუთვნა და მათი ძირითადი უმრავლესობა II(n=32) და III(n=32) ასაკობრივ ჯგუფს წარმოადგენდა. ჩვენი კვლევის ფარგლებში, ამ კატეგორიას მივაკუთვნეთ შემთხვევები, რომლებიც იყო უხვუჯრედული, ცალკეულ უბნებზე წარმოდგენილი იყო სამგანზომილებიანი, მოუწესრიგებელი სტრუქტურები, აღინიშნებოდა ზომიერი პლეომორფიზმი(84%), ცალკეულ შემხვევებში ვლინდებოდა ბირთვთა ღარები და ჩანაჭდევები(67%), ბირთვშიდა ციტოპლაზმური ფსუდოჩანართები(58%), რომლებიც ვერ იქნა შეფასებული, როგორც სრულყოფილი ჩანართები. 88 პაციენტიდან 54 პაციენტმა ჩაიტარა ნაწილობრივი ან სრული თირეოიდექტომია. ჰისტოპათოლოგიური შეფასების შემდგომ 19(35.2%) შემთხვევა შეფასდა, როგორც კვანძოვანი ჩიყვი, 24(44.4%) შემთხვევა შეფასდა, როგორც ფოლიკულური ადენომა, ხოლო 11(20.3%), როგორც ავთვისებიანი დაზიანება. გრაფიკულად ეს მონაცემები შემდეგნაირად გამოვსატეთ:



გრაფიკი 5. ბეტესდა 3 კატეგორიის ჰისტოლოგიური შეფასების შემდგომი მონაცემები. წითელი-კვანძოვანი ჩიყვი, ცისფერი-ფოლიკულური ადენომა, ნაცრისფერი-ავთვისებიანი დაზიანება. ავთვისებიან შემთხვევათა 9 შემთხვევა(81,8%) აღმოჩნდა პაპილარული 16არიანტ16 ა და 2(18,2% კი ფოლიკულური არიანტ ა). პაპილარული კარცინომის 9 შემთხვევიდან 6(66,6%)

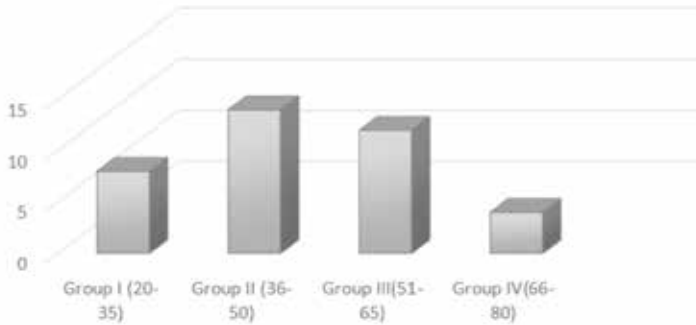
განეკუთვნებოდა პაპილარული კარცინომის ფოლიკულურ ვარიანტს, ხოლო 3(33,4%) შემთხვევა კი კლასიკურ პაპილარულ კარცინომას წარმოადგენდა. მგანისაზღვრა ავთვისებიანობის რისკი, ჩვენს მიერ წარმოებულ კვლევაზე დაყრდნობით, ბეტესდას კატეგორია 3-ად დიაგნოსტირებულ შემთხვევებში ის 20,4% შეადგენდა.

ჩვენი კვლევის შედეგები შეგვიძლია გრაფიკულად წარმოვადგინოთ:

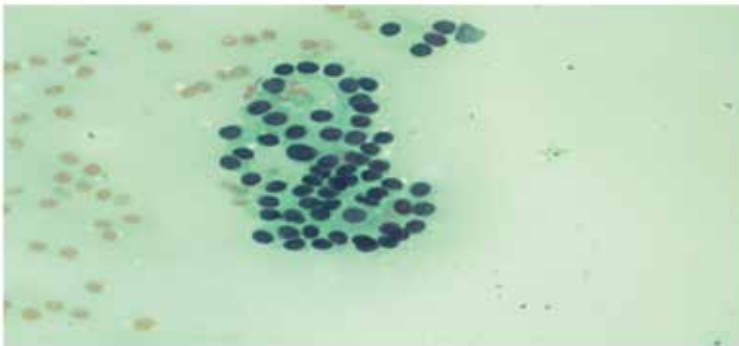


გრაფიკი 6. კურთიერთკავშირი ასაკობრივ ჯგუფებსა და ბეტესდას კლასიფიკაციით მესამე კლასს- AUS/FLUS დაზიანებებს შორის. I ასაკობრივი ჯგუფი(n=11), II ჯგუფი(n=32), IIIჯგუფი(n=32), IV ჯგუფი(n=13).

ბეტესდას კლასიფიკაციით მეოთხე ჯგუფი- ფოლიკულური დაზიანებები, ფოლიკულური ნეოპლაზია, რომლის ქვეშ იგულისხმება, როგორც ფოლიკულური ადენომა, ასევე ფოლიკულური 17არიანტი17ა და ჰურტლის უჯრედული ნეოპლაზია. აღნიშნულ ჯგუფს მივაკუთვნეთ ის საკვლევი მასალები, რომლებშიც აღინიშნებოდა უხვუჯრედოვნება, მიკროფოლიკულური და სამგანზომილებიანი სტრუქტურების ფორმირება, ბირთვთა არათანაბარი კონტურების არსებობა, ქრომატინის არათანაბრად გადანაწილება. ჩვენს კვლევაში გამოყენებული მასალების 6,3%(38 შემთხვევა) შეფასდა, როგორც ფოლიკულური ნეოპლაზია. მათი ძირითადი უმეტესობა II(n=14) ან III (n=12) ასაკობრივ ჯგუფში განთავსდა. 26 პაციენტმა ჩაიტარა თირეოიდექტომია. ისტოლოგიური კვლევის შემდგომ 8(30,2%) შემთხვევა შეფასდა, როგორც ავთვისებიანი დაზიანება (ძირითადად, პაპილარული კარცინომის ფოლიკულურ ტიპად ან პაპილარულ კარცინომად), 18(69,8%) შემთხვევა კი შეფასდა, როგორც ფოლიკულური ადენომა ან ადენომატოზური ჰიპერპლაზია. მალიგნანტობის რისკი აღნიშნულ კატეგორიაში ჩვენი კვლევის ფარგლებში 30,2% შეადგენს.



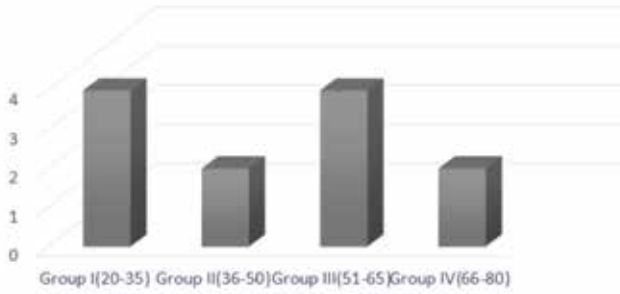
გრაფიკი 7. კურთიერთკავშირი ასაკობრივ ჯგუფებსა და ბეტესდას კლასიფიკაციით მეოთხე კლასს-ფოლიკულურ ნეოპლაზიებს შორის. I ასაკობრივი ჯგუფი(n=8), II ჯგუფი(n=14), IIIჯგუფი(n=12), IV ჯგუფი(n=4).



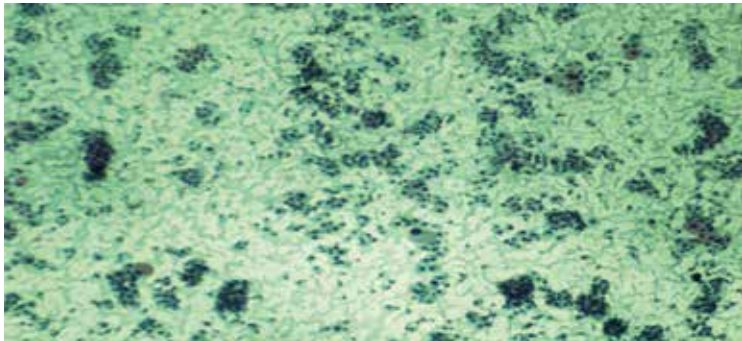
სურ.3 ფოლიკულური ნეოპლაზია. მიკროფოლიკულური სტრუქტურები. არათანაბარი ქრომატინი. წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა 67წ. მამაკაცი. (პაპანიკოლაუს შედეგვა, 40X).

ბეტესდას კლასიფიკაციით მეხუთე დიაგნოსტიკური კატეგორია მაღალი მალიგნონტობის რისკის მტარებლად გვევლინება და თავის თავში მოისაზრებს იმ დაზიანებებს, რომელიც პაპილარულ კარცინომაზე დიდი ეჭვის არსებობას განსაზღვრავს. ამ კატეგორიაში მოვისაზრეთ შემთხვევები, რომლებიც ხასიათდებოდნენ პაპილარული კარცინომის უჯრედული მახასიათებლების არასრულფასოვანი არსებობით (მაგ, ბირთვული ფსეუდოქანართების არსებობა მხოლოდ ერთეულ უჯრედში). ჩვენი კვლევის ფარგლებში მასალათა 2% (12 შემთხვევა) შეფასდა საექვო პაპილარული კარცინომის არსებობაზე. ყველაზე ხშირად ეს

დიაგნოსტიკური კატეგორია I (n=4) და III (n=4) ასაკობრივ ჯგუფში განთავსდა. ჰისტოლოგიური კვლევის შემდგომ თერთმეტი შემთხვევა(91,6%) დადიაგნოზდა პაპილარულ კარცინომად, მათგან ექვსი შემთხვევა(54,5%) შეფასდა, როგორც პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური არიანტი, წარმოდგენილი 12 შემთხვევიდან მხოლოდ ერთი შეფასდა, როგორც ჰურტლის უჯრედული ადენომა. ეს მონაცემები შესაძლებელია გამოვსახოთ შემდეგი გრაფიკის სახით:



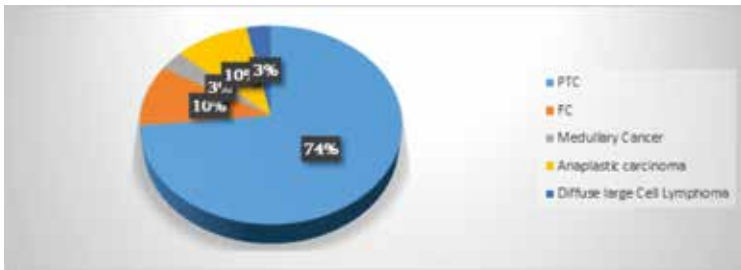
გრაფიკი 8. ურთიერთკავშირი ასაკობრივ ჯგუფებსა და ბეტესდას კლასიფიკაციით მეხუთე კლასს-საექვსო ავთვისებიანობაზე დაზიანებებს შორის. I ასაკობრივი ჯგუფი(n=4), II ჯგუფი(n=2), IIIჯგუფი(n=4), IV ჯგუფი(n=2).



სურ.4 ჰურტლის უჯრედული ნეოპლაზიისა და საექვსო ავთვისებიანობაზე. წვრილნქვიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა 42წ. ქალი. პაპანიკოლაუს შედეგა, 10X.

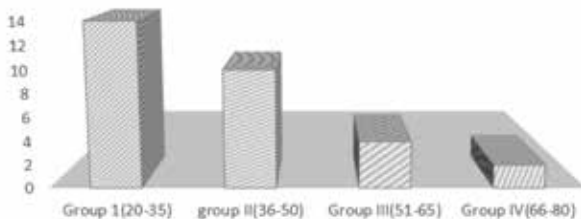
ბეტესდას მეექვსე კატეგორია- ავთვისებიანი დაზიანებები თავის თავში მოისაზრებს არა მხოლოდ უშუალოდ ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნეებს, არამედ, ფარისებრ ჯირკვალში აღმოცენებულ

მეტასტაზებსა და ლიმფომებსაც. ბირთვების გადიდება, ზედდება, დაგრძელება, არათანაბარი კონტურები, ბირთვული ჩანართები და ღარები, სქვამოზური ციტოპლაზმა, ჭეშმარიტი პაპილების გამოვლენა, ფსასამომური სხეულაკები ავთვისებიანობის ძირითად მახასიათებლებს წარმოადგენდა ჩვენს მიერ ციტოლოგიურად შეფასებულ ასპირაციულ ბიოფსიურ მასალებში. ჩვენი კვლევის ფარგლებში ჩართული 30 ავთვისებიანი შემთხვევიდან (5%), რომელთაგანაც ყველა დიაგნოზი დადასტურებულ იქნა ჰისტოლოგიურად, 14(46,6%) შემთხვევა გამოვლინდა I სასაკობრივ ჯგუფში. Pacienტიები, რომელთა წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა შეფასდა, როგორც ავთვისებიანი ანუ ბეტესდას კატეგორიით მეექვსე ჯგუფი: 22 შემთხვევა(73,3%) წარმოადგენდა პაპილარული კარცინომის კლასიკურ ვარიანტს, 3(10%) ფოლიკულურ კარცინომას (ჰურტლის უჯრედულ ვარიანტს), 1(3,3%) მედულარულ კარცინომას, 3(10%) ანაპლაზიურ კარცინომას და ერთი(3,3%) დიფუზურ დიდუჯრედულ ლიმფომას. გრაფიკულად ეს მონაცემები შემდეგნაირად შეგვიძლია გამოვსახოთ:

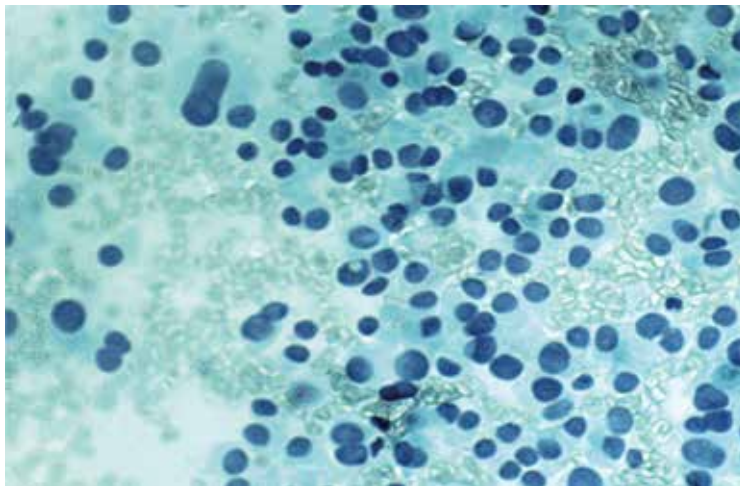


გრაფიკი 9. ბეტესდა 6 კატეგორიის ჰისტოლოგიური შეფასების შემდგომი მონაცემები. ცისფერი –პაპილარული კარცინომა, წითელი-ფოლიკულური კარცინომა, ნაცრისფერი-მედულარული კარცინომა, ყვითელი-ანაპლაზიური კარცინომა, ლურჯი- დიფუზური დიდუჯრედული ლიმფომა.

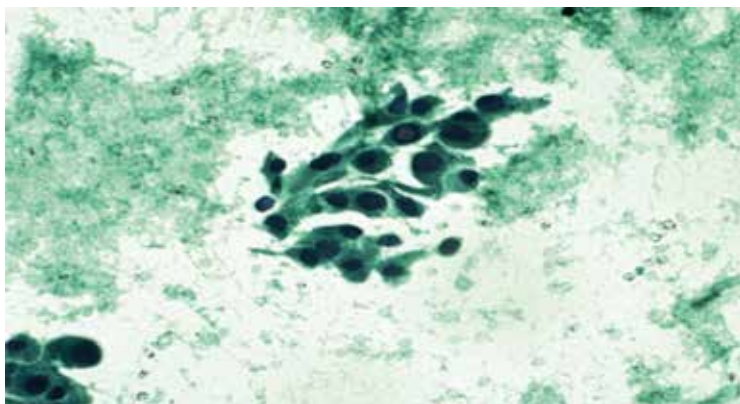
გრაფიკულად ასაკობრივ ჯგუფებში ბეტესდას მეექვსე კატეგორიად შეფასებული მასალების გადანაწილება გრაფიკულად შემდეგნაირად შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ:



გრაფიკი 10. კურთიერთკავშირი ასაკობრივ ჯგუფებსა და ბეტესდას კლასიფიკაციით მეექვსე კლასს-ავთვისებთან დაზიანებებს შორის. I ასაკობრივი ჯგუფი(n=14), II ჯგუფი(n=10), IIIჯგუფი(n=4), IV ჯგუფი(n=2).



სურ.5. პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური ვარიანტი. წვრილნემსიანასპირაციული ბიოფსიური მასალა 22წ.ქალი. პაპანიკოლაუს შედეგა, 40X

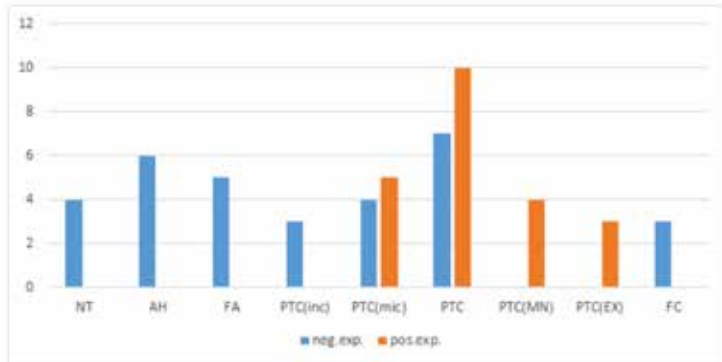


სურ.6. პაპილარული კარცინომა. წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა 29წ.ქალი. პაპანიკოლაუს შედეგა, 40X.

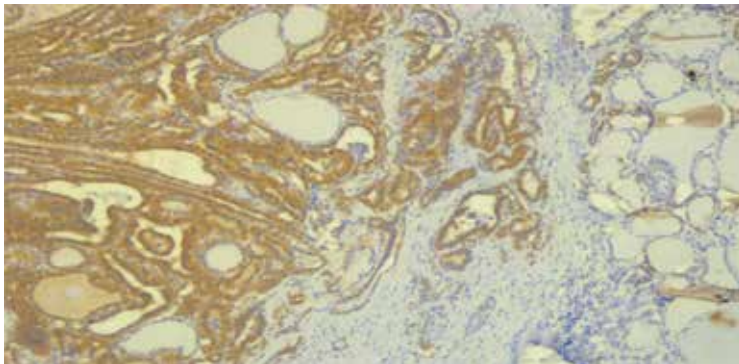
3.2. იმუნოჰისტოქიმიური კვლევის შედეგები
ჩვენი კვლევის ფარგლებში იმუნოჰისტოქიმიური კვლევა განხორციელდა 54 საკვლევ ჰისტოლოგიურ მასალაზე შემდეგი

მონოკლონური ანტისხეულების ექსპრესიის გამოსვლენად: anti-BRAF, HBME-1, CD-56, CK-19, KI-67. ნორმალური ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილი არ ავლენდა BRAF ანტისხეულის მიმართ დადებით ექსპრესიას. ადენომატოზური ჰიპერპლაზიის და ფოლიკულური ადენომების ცალკეული შემთხვევები (33% და 40%) მხოლოდ სუსტად პოზიტიური აღმოჩნდნენ ამ ანტისხეულის მიმართ, თუმცა სუსტად პოზიტიურობა ჩვენი კვლევის ფარგლებში საერთო ჯამში არ შეფასდა დადებით ექსპრესიად. პაპილარული კარცინომების ინკაფსულირებულმა ფორმებმა გამოავლინეს სუსტი იმუნორეაქტიულობა აღნიშნული ანტისხეულის მიმართ (68%) ან სრულიან იმუნოუარყოფითები აღმოჩნდნენ, შესაბამისად ინკაფსულირებული ფორმების არცერთი შემთხვევა არ შეფასდა დადებით ექსპრესიად. პაპილარული მიკროკარცინომების შემთხვევებში, იმუნორეაქტიულობა აღნიშნული ანტისხეულის მიმართ შემდეგნაირად გადანაწილდა: 22% მიკროკარცინომებისა აღმოჩნდა უარყოფითი BRAF ანტისხეულის მიმართ, სუსტად იმუნორეაქტიული აღმოჩნდა შემთხვევათა 22%, ზომიერ ექსპრესიას ავლენდა შემთხვევათა 33,3%, ხოლო მკვეთრი ექსპრესია გამოვლინდა 22,2%. ზომიერი და მკვეთრი ექსპრესია შეფასებულ იქნა დადებით ექსპრესიად. BRAF ანტისხეულის მიმართ, პაპილარული კარცინომების კლასიკურ შემთხვევებში გამოვლინდა 47,1% მკვეთრი ექსპრესია და 11,8% ზომიერი ექსპრესია, საერთო ჯამში დადებით ექსპრესიად შეფასდა შემთხვევათა 58,8%. ხოლო უარყოფითითად ჩაითვალა 41,2%. პაპილარული კარცინომის ყველა შემთხვევამ ექსტრატიროიდული გავრცელებით ან მულტიცენტრული ზრდით გვიჩვენა BRAF ანტისხეულის ზომიერი(49%) ან მკვეთრი იმუნორეაქტიულობა(51%). ფოლიკულური ადენომები, ისევე როგორც, ფოლიკულური კარცინომები ჩვენს კვლევაში არ ავლენდნენ იმუნორეაქტიულობას აღნიშნული ანტისხეულის მიმართ.

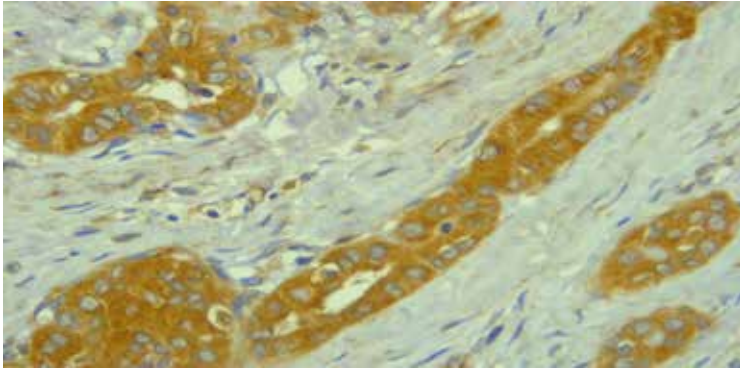
ჩვენ მიერ გამოკვლეულ მასალაში აღინიშნა, რომ იმ სიმსივნეებს, რომელშიც აღინიშნა BRAF მუტაციის ზომიერი ან მკვეთრი ექსპრესია, ახასიათებდათ ინფილტრაციული კიდეები და არ გააჩნდათ ინტაქტური კაფსულა, აგრეთვე, აღინიშნა ისიც, რომ მუტაციის შემცველ სიმსივნეებს ახასიათებდათ სიმსივნესთან ასოცირებული სტრომული ცვლილებები, დესმოპლაზია, ფიბროზი და სკლეროზი. ურთიერთდამოკიდებულება BRAF ანტისხეულის ექსპრესიისა და ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვან დაზიანებებს შორის გრაფიკულად შემდეგნაირად შეგვიძლია გამოვსახოთ:



გრაფიკი 8: BRAF ანტისხეულის ექსპრესიასა და ფარისებრი ჯირკვლის ჰისტოტიპებს შორის არსებული ურთიერთკავშირი. NT(normal tissue -ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილი, AH(ad-enomatous hyperplasia -ადენომატოზური ჰიპერპლაზია, FA(follicular adenoma - ფოლიკულური ადენომა, PTC(enc)(encapsulated papillary carcinoma)- ინკაფსულირებული პაპილარული კარცინომა, PTC(mic)(papillary microcarcinoma)- პაპილარული მიკროკარცინომა, PTC(Pap-illary carcinoma) - პაპილარული კარცინომა(კლასიკური ვარიანტი), PTC(MN)(multifocal Papillary carcinoma)-მულტიცენტრული პაპილარული კარცინომა, PTC(ex)(papillary carcinoma with extra-thyroid extention) -პაპილარული კარცინომა ექსტრატირეოიდული გავრცელებით, FC(follicular carcinoma) - ფოლიკულური კარცინომა.

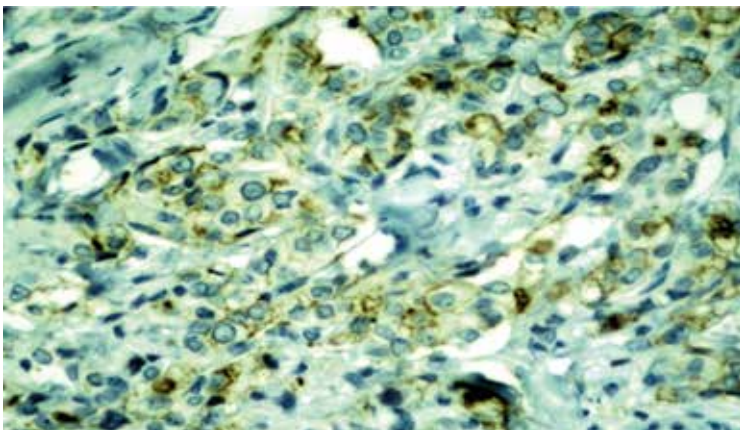


სურ. 7. პაპილარული კარცინომა, BRAF -ანტისხეულის მკვეთრი ექსპრესია, 10X.

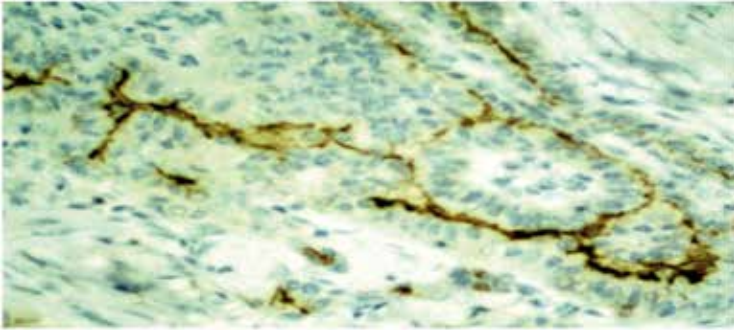


სურ. 8. პაპილარული კარცინომა, BRAF ანტისხეულის ექსპრესია, 40X

ჩვენი კვლევის მიხედვით, აღმოჩნდა, რომ HBME-1 ანტისხეული ავლენდა მკვეთრ მემბრნულ ექსპრესიას პაპილარული კიბოს კლასიკური ფორმის დროს, აგრეთვე, იმ შემთხვევებში, რომლებიც ხასიათდებოდნენ ექსტრატირეოიდული გავრცელებითა და მულტიცენტრული ზრდით. ინკაფსულირებული პაპილარული კიბოს შემთხვევებმა კი გვიჩვენეს სუსტი ან უარყოფითი ექსპრესია შემთხვევათა 66,7%-ში და ზომიერი ან ძლიერი ექსპრესია 33,3%-ში. ზემოთ ხსენებული მარკერი უარყოფითია ან მხოლოდ სუსტად ვლინდება ადენომატოიდური ჰიპერპლაზიის, ფოლიკულური ადენომების და ფოლიკულური კარცინომების შემთხვევებში. ფვარისებრი ჯირკვლის პაპილარული მიკროკარცინომები ავლენდნენ უარყოფით ექსპრესიას 11,1%-ში და მკვეთრ ექსპრესიას 88,9% -ში.



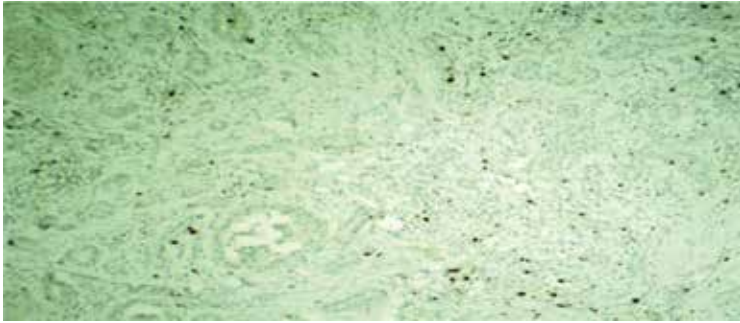
სურ. 9 პაპილარული მიკროკარცინომა, HBME-1 მკვეთრი ექსპრესია, 40X



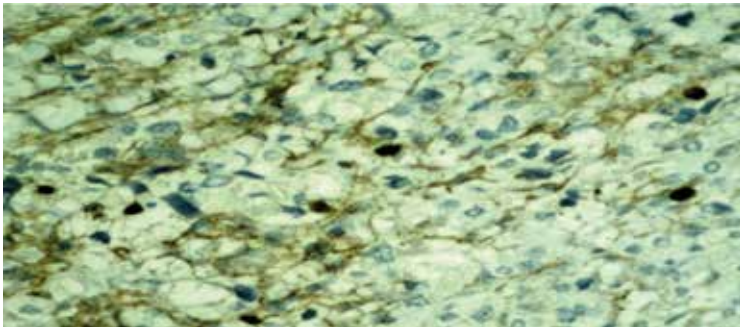
სურ. 10 პაპილარული კარცინომა(თაღლ ცელლ ტყპე), HBME-1 -ის ექსპრესია, 40X

ჩვენი კვლევის ფარგლებში ასევე გამოვიკვლიეთ ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებებისას CK-19 ანტისხეულის ექსპრესიის თავისებურებანი, შესაბამისად გამოვავლინეთ, რომ ამ იმუნომარკერის ექსპრესია მსგავსია HBME-1 ანტისხეულის ექსპრესიისა პაპილარული კარცინომების სხვადასხვა ქვეტიპებში. CK-19 სუსტად ან სრულიად არ ვლინდება ფოლიკულური დაზიანებებისა და ადენომატოიდური კვანძების შემთხვევებში.

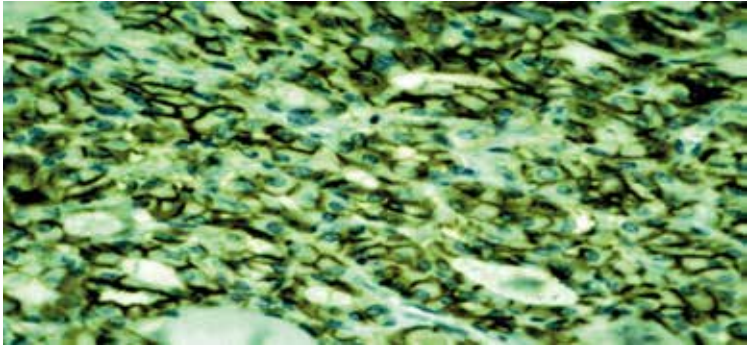
განსვავებით ამისა, ანტისხეული KI-67, რომელიც ყველასათვის ცნობილია, როგორც სიმსივნური ზრდისა და პროლიფერაციის მარკერი, ზომიერად ექსპრესირდებოდა ფოლიკულური კარცინომების, პაპილარული კარცინომების ექსტრათირეოიდული გავრცელებით და მულტიცენტრული ზრდით ფორმების დროს, მკვეთრი ექსპრესია არ გამოვლინდა არცერთ შემთხვევაში. აღნიშნული იმუნომარკერი სუსტად ან სრულიად არ ექსპრესირდა ადენომატოზური ჰიპერპლაზიებისა და პაპილარული კარცინომის ინკაფსულირებული ფორმების დროს. პაპილარული მიკროკარცინომების შემთხვევებმა გამოავლინეს ზომიერი პოზიტიურობა მხოლოდ 66,7%-ში, ხოლო 33,3%-ში ძალზედ სუსტი ექსპრესია. პაპილარული კარცინომის კლასიკური ფორმები მხოლოდ 70,59% შემთხვევაში ავლენდნენ ზომიერ და არა მკვეთრ პოზიტიურობას, 29,41%-ში კი სუსტად პოზიტიურები იყვნენ.



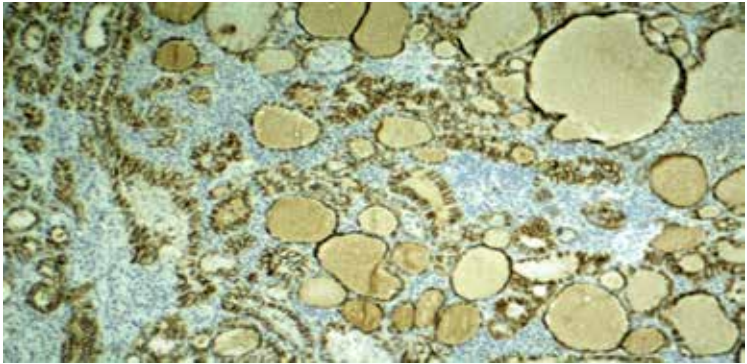
სურ. 11. პაპილარული კარცინომა KI-67 ექსპრესია, 10X.



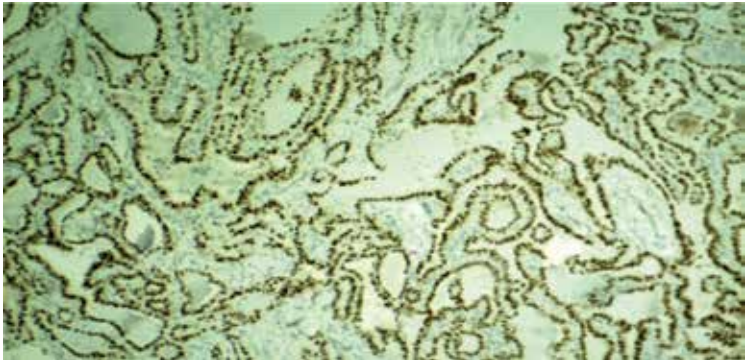
სურ. 12 პაპილარული მიკროკარცინომა, კვანძოვანი და პაპილარული ჰიპერპლაზია, ოქსიფილური მეტაპლაზია, KI-67-ის ექსპრესია, 40X. CD-56, როგორც ფოლიკულური უჯრედების მარკერი, მკვეთრად დადებითი აღმოჩნდა ფოლიკულური დაზიანებების შემთხვევებში, როგორცაა ფოლიკულური ადენომა და კარცინომა. აღნიშნული ანტისხეული არ გამოვლინდა პაპილარული კარცინომების არცერთი ფორმის არსებობისას.



სურ. 13. ფოლიკულური ადენომა CD-56 მკვეთრად დადებითი. 40X



სურ. 14 ფოლიკულური ადენომა ჰურტლის უჯრედული ტიპი, CD-56 მკვეთრად დადებითი, 10X.



სურ. 15. პაპილარული კარცინომა, TTF-1 მკვეთრი ექსპრესია, 10X.
ფოლიკულური უჯრედების მარკერი TTF-1 გამოყენებულ იქნა ყველა საკვლევ მასალაზე, იმის დასადასტურებლად, რომ ყველა

მასალა ფოლიკულური გენეზის გახლდათ. შესაბამისად, ეს მარკერი მკვეთრად ექსპრესირდა, როგორც კეთილთვისებიან დაზიანებებში, ასევე ავთვისებიან დაზიანებებში.

ანტისხეულების ექსპრესია ჩვენი კვლევის მიხედვით ცხრილის სახით შემდგენიარად გამოვხატეთ:

ცხრილი 1: ანტისხეულთა ექსპრესიასა და ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა კვანძოვან დაზიანებებს შორის არსებული ურთიერთკავშირი.

Histotype/ anti.exp		NT n=4	AH n=6	FA n=5	PTC(enc) n=3	PTC(mic) n=9	PTC n=17	PTC(MN) n=4	PTC(EX) n=3	FC n=3
BRAF	Neg	4 100%	6 100%	5 100%	3 100%	4 44,4%	7 41,2%	1 25%		3 100%
	Pos					5 55,5%	10 58,9%	3 75%	3 100%	
HBME1	Neg	4 100%	6 100%	5 100%	2 66,7%	1 11,1%	1 5,9%			3 100%
	pos				1 33,3%	8 88,9%	16 94,1%	4 100%	3 100%	
CK-19	Neg	4 100%	6 100%	5 100%	1 33,3%	1 11,1%	1 5,9%			3 100%
	Pos									

	Pos				2 66,6%	8 88,9%	16 94,1%	4 100%	3 100%	
CD 56	Neg				3 100%	9 100%	17 100%	4 100%	3 100%	
	Pos	4 100%	6 100%	5 100%						3 100%
KI 67	Neg	4 100%	6 100%	5 100%	3 100%	3 33,3%	5 29,41%	1 25%	1	1
	Pos					6 66,7%	12 70,59%	3 75%	2 100%	2 100%

ჩვენს მიერ გამოკვლეულ 54 შემთხვევაში შესრულდა მრავალცვლადიანი სტატისტიკური ანალიზი. განისაზღვრა შანსთა თანაფარდობა (OR). ნორმად შეფასდა გამოკვლეულ ანტისხეულთა სუსტი ექსპრესია ან უარყოფითი ექსპრესია,

ხოლო 1-ით აღინიშნა საშუალო ან მკვეთრი ექსპრესია. შანსთა თანაფარდობის განსაზღვრისას გამოვლინდა, რომ რაც უფრო იზრდება აგრესიულობის ხარისხი 3,677-ჯერ იზრდება anti-BRAF ანტისხეულის ექსპრესია, სხვა ანტისხეულებთან მიმართებაში, ხოლო CD-56-ის ექსპრესიისას შანსი მცირდება 8,6-ჯერ.

უნივარიაბელურ ანალიზზე დაყრდნობით, სადაც BRAF ანტისხეული დამოკიდებული ცვლადია, ხოლო დანარჩენი ანტისხეულები განმსაზღვრელი, მუდმივი ცვლადი, გამოვლინდა, რომ უმეტეს შემთხვევებში HBME-1 ანტისხეულის ექსპრესია ასოცირდება BRAF ანტისხეულის ექსპრესიასთან ($P=0,001$). ასევე CK-19 და KI-67 ანტისხეულების ექსპრესია ასოცირდება BRAF ანტისხეულის ექსპრესიასთან ($p<0,05$). CD-56 ანტისხეულის ექსპრესია არ უკავშირდება BRAF ანტისხეულის ექსპრესიას ($p<0,05$). ეს კორელაციები წრმოდგენილია შემდეგი ცხრილის სახით:

Antibody	Unstandardized Coefficients anti-BRAF	P-value
HBME-1	0,569	0,000
CK-19	0,735	0,000
KI-67	0,641	0,000
CD 56	-0,615	0,000
TTF-1	0,479	0,382

ცხრილი 2: ურთიერთკავშირი BRAF მუტაციის ექსპრესიასა და HBME-1, CK-19, KI-67 CD-56, TTF-1 ექსპრესიას შორის. * Dependent Variable (დამოკიდებული ცვლადი): anti-BRAF ,Predictors: Constant (მუდმივი ცვლადი) – HBME-1, CK-19, KI-67 CD-56, TTF-1

განხილვა/დისკუსია:

ჩვენს მიერ წარმოებული კვლევა პირველია საქართველოში, რომელშიც ციტოპათოლოგიური დიაგნოსტიკა განხორციელდა ბეტესდას კლასიფიკაციაზე დაყრდნობით.

ჩვენს კვლევაში არაადექვატური დიაგნოზების სიხშირე-ბეტესდას კატეგორიით პირველი ჯგუფი, აღინიშნა შემთხვევათა (8,7%)-ში. ასპირაციული ბიოფსიური მასალათა შეფასება, როგორც არაადექვატური, უკავშირდებოდა ცისტური წარმონაქმნების ან მაკროკალცინატების არსებობას, ამავე დროს, უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ მასალათა არაადექვატურობა არ უკავშირდებოდა გამომშრალ ან არასწორად შეღებილ ან ფიქსირებულ პრეპარატებს, როგორც ეს ბევრი მკვლევარის მიერ არის მოწოდებული(33). ბეტესდას კლასიფიკაცია არ ითვალისწინებს ამ კატეგორიაში მალიგნანტობის რისკის განსაზღვრას, თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ეს კატეგორიაც არის გარკვეული რისკის მტარებელი, რადგანაც ჩვენი კვლევის ფარგლებში 1 შემთხვევა რეასპირაციის შემდგომ შეფასდა ავთვისებიან დაზიანებად.

ჩვენს მიერ წარმოებულ კვლევაში ბეტესდას კატეგორია 2- ანუ კეთილთვისებიან წარმონაქმნებად შეფასდა საკვლევ შემთხვევათა 63% და მათი უმრავლესობა განთავსდა II და III, ან საშუალო ასაკობრივ ჯგუფში. ზოგადად, კვლევათა უმრავლესობა (34), ირწმუნება, რომ ასპირაციული ბიოფსიით მიღებულ საკვლევ მასალათა 34%-დან 87,5%-მდე შესაძლებელია ბეტესდას კატეგორიზაციის მიხედვით მივაკუთვნოთ კეთილთვისებიან პროცესებს. ჩვენს კვლევაში წარმოდგენილი 378 კეთილთვისებიანი ანუ ბეტესდას კლასიფიკაციით მეორე კატეგორიად შეფასებული შემთხვევიდან (63%) შევეცადეთ, რომ განგვესაზღვრა ავთვისებიანობის რისკი, თუმცა მისი განსაზღვრა ჩვენი კვლევის მიხედვით საკმაოდ სადაო საკითხად შეგვიძლია მივიჩნიოთ, ვინაიდან კვლევაში ჩართული პაციენტების მხოლოდ მცირე ნაწილის ოპერაციული მასალების მოძიება გახდა შესაძლებელი, ეს ფაქტი კი შესაძლებელია უკავშირდებოდა იმას, რომ უმეტესი ნაწილი ამ პაციენტებისა, ბეტესდას კლასიფიკაციის მიხედვით წარმოდგენილი რეკომენდაციების შესაბამისად, იმყოფება კლინიკური დაკვირვების ქვეშ.

გამოკვლეული 600 პაციენტიდან ბეტესდას მესამე, ყველაზე ჰეტეროგენულ კატეგორიად, შეფასდა 88 პაციენტის წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალა(14,6%) მივაკუთვნეთ განუსაზღვრელი მნიშვნელოს ატიპიის კატეგორიას, და ამავე კვლევაზე დაყრდნობით ზემოთ აღნიშნულ კვლევაში გამოთქმულ აზრს სრულიად ვეთანხმებით, რადგანაც ციტოლოგიური

დიაგნოსტიკა ვერ იძლევა ცალკეულ შემთხვევებში ზუსტი ინტერპრეტაციის საშუალებას, თუმცა ბეტესდას კატეგორიზაციით ინტერპრეტაცია პრეოპერციული რისკის განსაზღვრის მძლავრ ბერკეტს წარმოადგენს.

ჩვენს კვლევაში ჩართული 88 შემთხვევიდან 54 (61.4%) პაციენტმა ჩაიტარა ნაწილობრივი ან სრული თირეოიდექტომია. ჰისტოპათოლოგიური და ციტოპათოლოგიური დიაგნოსტიკების საფუძველზე განისაზღვრა ავთვისებიანობის რისკი და აღინიშნა, რომ ის 20.3% შეადგენდა.

კვლევის მონაცემები(35) ჩატარებული HO.Allen.S et. Al -ის მიერ მსგავსია ჩვენი კვლევის შედეგების. მის საკვლევ ამოცანას წარმოადგენდა ავთვისებიანობის რისკის განსაზღვრა ბიოპტატებში, რომლებიც შეფასდა როგორც ატიპია განუსაზღვრელი, პაციენტებიდან, რომელთა დიაგნოზები განეკუთვნა ბეტესდას 3 კატეგორიას, 64,7%-ში ჩაიტარა ქირურგიული მკურნალობა, 17,7% განმეორებითი ბიოფსია, ხოლო 17,6% დარჩა მეთვალყურეობის ქვეშ. განმეორებითი ბიოფსიები შემთხვევათა 38,5% შეფასდა ისეც ატიპია განუსაზღვრელად, აქედან რეზექციის შემდგომ 26,3% მიეკუთვნა ავთვისებიან პროცესს.

ბეტესდას კლასიფიკაციით მეოთხე ჯგუფი- ჩვენს კვლევაში ჩართული მასალების 38 შემთხვევა (6,3%) შეფასდა როგორც ფოლიკულური ნეოპლაზია. მოცემულ შედეგებზე დაყრდნობით მალიგნანტობის რისკი ბეტესდას სისტემის მეოთხე კატეგორიაში ჩვენი კვლევის ფარგლებში მაღალია(30,2%). სხვადასხვა კვლევებზე დაყრდნობით ავთვისებიანობის რისკი ამ ჯგუფში დაახლოებით 2,2%-დან 36,1%-მდე მერყეობს(36). ვინაიდან ჩვენს კვლევაში განისაზღვრა ასაკობრივი დამოკიდებულება ბეტესდას სისტემით ასაკობრივ ჯგუფებში, უნდა აღინიშნოს, რომ ბეტესდას კლასიფიკაციით მესამე და მეოთხე ჯგუფში რომელიმე ასაკობრივი ჯგუფი არ გამოიკვეთა, მსუბუქი მატება აღინიშნა მეორე და მესამე ასაკობრივ ჯგუფებში, ანუ საშუალო ასაკში.

ბეტესდას კატეგორიით მეხუთე კლასი განეკუთვნა 12 შემთხვევა, ანუ საკვლევ მასალათა 2%. მსგავსი შედეგები იქნა წარმოდგენილი შემდეგ კვლევებში(37). კვლევამ(38), რომელიც წარმოებული იყო Theoharis et.al -ის მიერ 2468 პაციენტის ასპირაციულ ბიოფსიურ მასალაზე გამოავლინა, რომ მხოლოდ 43 პაციენტი(1,3%) მიეკუთვნება ამ დიაგნოსტიკურ კატეგორიას, ყველა მათგანი კი საექსო იყო პაპილარული კარცინომის არსებობაზე. ჰისტოლოგიური კვლევის შემდეგ შემთხვევათა 87% შეფასდა, როგორც პაპილარული კარცინომა. ჩვენი კვლევის ფარგლებში ავთვისებიან დაზიანებად შეფასდა 91,6%, რაც თანხვედრაშია ზემოთხსენებულ კვლევებთან.

თუმცა გასათვალისწინებელია ის ფაქტიც, რომ ამ დაზიანებათაგან მხოლოდ ნაწილი შეფასდა როგორც კლასიკური პაპილარული კარცინომა, ხოლო 54,5% შეფასდა როგორც პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური ინკაფსულირებული ვარიანტი, ჩვენი კვლევის ეს მონაცემი კი თანხვედრაშია თანამედროვე კვლევის მონაცემებთან, რომელიც გვიდასტურებს, რომ პაპილარული კარცინომის სწორედ ეს ტიპი განთავსდება ბეტესდა 4 ან 5 კატეგორიაში. რაც შეეხება ასაკობრივ ჯგუფებში ამ კატეგორიის გადანაწილებას, ყველაზე მეტად ის პირველ და მესამე ასაკობრივ ჯგუფშია წარმოდგენილი.

Y.Jo. et.al (39) კვლევის შესაბამისად 7% კვანძოვანი დაზიანებების ავთვისებიან პროცესს განეკუთვნება, მალიგნანტობის სიხშირე კი ამ კატეგორიაში 98% წარმოადგენს. აღნიშნული კვლევის მონაცემები თითქმის თანხვედრაშია ჩვენი კვლევის მონაცემებთან, რომელშიდაც კვანძოვანი დაზიანებების 5% განეკუთვნა ავთვისებიან პროცესს. აყველა შემთვევა დადასტურდა ჰისტოლოგიურად და შეფასდა როგორც კიბო. შედეგები, რომელიც Montal et.al (40) მიერ წარმოებულმა კვლევამ აჩვენა (4,7%) თითქმის იდენტურია ჩვენს მიერ წარმოებული კვლევის შედეგებისა (5%). ავთვისებიანობის რისკი ჩვენს კვლევაში ბეტესდას 6 კატეგორიაში 98% უტოლდება.

30(5%) ავთვისებიანი შემთხვევიდან, რომელიც კვლევაში იყო ჩართული 14 შემთხვევა (46,6%) გამოვლინდა I ასაკობრივ ჯგუფში. აღსანიშნავია ის მეტად საყურადღებო ფაქტიც, რომ I ასაკობრივ ჯგუფში, ყველა ეს 14 შემთხვევა წარმოადგენდა ჰისტოპათოლოგიურად დადიაგნოზებულ პაპილარული კარცინომის კლასიკურ ვარიანტს. ეს შედეგი კიდევ უფრო ამყარებს ჩვენს ჰიპოთეზას იმის შესახებ, რომ პაპილარული კარცინომის კლასიკური ვარიანტი უმეტესად ახალგაზრდა ასაკში გვევლინება.

ჩვენს კვლევაში გამოყენებული მასალები, ჰისტოპათოლოგიური კვლევის შემდგომ დავაჯგუფეთ სიმსივნის აგრესიული გამოვლენის მიხედვით, განვსაზღვრეთ რა სიმსივნეები მულტიცენტრული, ექსტრატიროიდული გავრცელებით ან ლიმფურ კვანძებში მეტასტაზირებით. ჩვენს კვლევაში მოხვედრილი მასალები, როგორებიცაა ადენომატიოდური ჰიპერპლაზია, აგრეთვე, ფოლიკულური ადენომები და კარცინომები არ ხასიათდებოდნენ ან სუსტად ავლენდნენ BRAF ანტისხეულის ექსპრესიას. ამ აზრს ეთანხმება ყველა კვლევა, რაც ამ მიმართულებით იქნა წარმოებული (41).

ინტერნაციონალური და მულტიდისციპლინალური კვლევების მიხედვით ახლახანს გამოვლინდა, რომ ინკაფსულირებული პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური ვარიანტი სიმსივნის გამორჩეულ ტიპს განეკუთვნება და საუკეთესო პროგნოზული

მაჩვენებლებით ხასიათდება(42). (43) კვლევის მიხედვით, სიმსივნის კაპსულის არარსებობა ერთადერთი ჰისტოლოგიური პარამეტრია, რომელიც მნიშვნელოვნად ასოცირდება BRAF მუტაციის არსებობასთან. ჩვენი კვლევის მიხედვითაც აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ BRAF მუტაციის მქონე სიმსივნეებს ხასიათებდათ ინფილტრაციული კიდეები და არ გააჩნდათ ინტაქტური კაფსულა. დიაგნოსტიკური კრიტერიუმების მიხედვით ეს სიმსივნეები უნდა შეფასდეს, როგორც "ფარისებრი ჯირკვლის არაინვაზიური ფოლიკულური დაზიანებები პაპილარული კიბოს მსგავსი ბირთვული მახასიათებლებით". ამ მნიშვნელოვან რეკლასიფიცირებასთან მიმართებასა და თანხვედრაში ინკაფულირებულმა პაპილარულმა კარცინომებმა, რომლებიც ჩვენს კვლევაში გამოვიკვლიეთ გამოავლინეს BRAF ანტისხეულის უარყოფითი ან ძალიან სუსტი ექსპრესია (68%), შესაბამისად, ჩვენმა კვლევამ გაამყარა ჰიპოთეზა იმის შესახებ, რომ პაპილარული კარცინომების ინკაფულირებული ფორმები მსუბუქი მიმდინარეობით ხასიათდებიან და გენეტიკურად, სავარაუდოდ, განსხვავდებიან ინფილტრაციული სიმსივნეებისგან.

მიკროკარცინომები, რომლებიც BRAF დადებითია ხასიათდებოდნენ ესტრათიერიოიდული გავრცელებით, კიბოს ინფილტრირებული კიდეებით, სიმსივნესთან ასოცირებული ფობროზითა და დესმოპლაზიით, კლასიკური პაპილარული კარცინომის ბირთვული მახასიათებლებით (44). კვლევით აღმოჩნდა რომ პაპილარული მიკროკარცინომების 70% არის BRAF დადებითი (45), ხოლო სხვა მრავალმა კვლევამ აჩვენა, რომ ეს მაჩვენებელი ნაკლები იყო 50%-ზე(46). ჩვენს კვლევაში განხილულ იქნა პაპილარული მიკროკარცინომის ცხრა შემთხვევა, აქედან ოთხი შემთხვევა(44,4%) აღმოჩნდა სრულიად უარყოფითი BRAF ანტისხეულის მიმართ, ხოლო ხუთი შემთხვევა(55,5%) აღმოჩნდა BRAF დადებითი. ეს მაჩვენებლები მიუთითებს იმაზე, რომ ჩვენი კვლევა თავისი მონაცემების მიხედვით მსგავსია კორეული კვლევისა(47), რომლის მიხედვითაც მიკროკარცინომათა 65,5% დადებითია BRAF მუტაციის არსებობაზე.

კვლევა (48) აღნიშნავს, რომ დესმოპლაზია აღინიშნება მათ მიერ გამოკვლეულ მიკროკარცინომათა 74%-ში, და ეს აუცილებლად ასოცირდება ლიმფურ კვანძებში მეტასტაზირებასთან და სიმსივნის დიამეტრთან. ჩვენს მიერ გამოკვლეულ შემთხვევათა 55% აღინიშნება ზემოთხსენებული მორფოლოგიური ცვლილებები, რაც უდაოდ მიუთითებს აღნიშნულ სიმსივნეთა მეტასტაზურ პოტენციალზე.

ყველა ამ კვლევაზე დაყრდნობით და ჩვენი კვლევის მონაცემების გათვალისწინებით თამამად შეგვიძლია ვირწმუნოთ, რომ

მიკროკარცინომები, ისევე როგორც კლასიკური პაპილარული კარცინომები, ხასიათდებიან ექსტრატირეოიდული გავრცელების პოტენციით და ეს სრულიად დამოკიდებულია BRAF ონკოგენის ექსპრესიაზე. BRAF ანტიხეულის ექსპრესია მიკროკარცინომების არსებობის შემთხვევაში მნიშვნელოვან პროგნოზულ მარკერს წარმოადგენს.

ძალიან მნიშვნელოვან მორფოლოგიურ კრიტერიუმს წარმოადგენს ბირთვული ცვლილებების არსებობა. ჩვენ კვლევაშიც, ისევე როგორც მსგავს კვლევებში (48) აღსანიშნავი გახდა ის ფაქტი რომ პაპილარული კიბოსთვის დამახასიათებელი ბირთვული მახასიათებლები (ბირთვული ღარები და ჩანაჭდევეები, ციტოპლაზმური ფსეუდოჩანართები) უფრო გამოკვეთილი და თვალსაჩინოა BRAF მუტაცია დადებით შემთხვევებში. ჩვენი კვლევის ფარგლებში ასევე შეფასდა ციტოპლაზმური მახასიათებლებიც, კერძოდ უხვი, სქვამოზური, მკვრივი, ეოზინოფილური ციტოპლაზმის არსებობა BRAF დადებით შემთხვევათა უმრავლესობაში (78%). თანამედროვე კვლევა (49), რომლის კვლევის ამოცანას წარმოადგენდა ურთირთადამოკიდებულება ციტომორფოლოგიურ მახასიათებლებსა და BRAF მუტაცია დადებით შემთხვევებს შორის და გვაუწყებს დიდი, უხვ ციტოპლაზმიანი უჯრედების თანარსებობას BRAF მუტაცია დადებით შემთხვევათა ძირითად ნაწილში.

ფართო კოჰორტის მქონე კვლევაში აღმოჩნდა, რომ BRAF მუტაცია აღინიშნებოდა კლასიკური პაპილარული კარცინომების 48% შემთხვევაში, რაც ძალიან ახლოს დგას ჩვენი კვლევის მონაცემებთან. განსაკუთრებით დიდი მაჩვენებელი BRAF მუტაციის არსებობისა აღინიშნა დიდ ბრაზილიურ კვლევაში(50), როდესაც სიმსივნის დაყოფა განხორციელდა ჰისტოლოგიური ქვეტიპების მიხედვით, კერძოდ, კლასიკურ შემთხვევებში აღინიშნა 66% შემთხვევებში მისი ექსპრესია, შედარებით პაპილარული კარცინომის ფოლიკულურ ტიპთან 21%. ჩვენ კვლევაში პაპილარული კარცინომის ცალკეული ინკაფსულირებული ფორმები მხოლოდ სუსტ ექსპრესიას ავლენდნენ. ეს მონაცემები თანხვედრაშია შემდეგ კვლევებთან (51), სადაც აღნიშნავენ, რომ კლასიკური პაპილარული კარცინომების შემთხვევაში BRAF ექსპრესია მერყეობს 38%-დან 69%-მდე, ხოლო პაპილარული კიბოს ფოლიკულური ვარიანტის შემთხვევაში 0%-დან 32%-მდე.

კლინიკოპათოლოგიური მახასიათებლებს, რომლებიც არაკეთილსაიმედო პროგნოზზე მიუთითებენ, წარმოადგენს კიბო ექსტრატირეოიდული გავრცელებით, მულტიცენტრულობა, ლიმფურ კვანძებში მეტასტაზირება და შორეული მეტასტაზების არსებობა. Lupi et.al გამოიკვლია 500 პაპილარული კარცინომის

შემთხვევა, აქედან 43% აღმოჩნდა BRAF დადებითი, კვლევაში მოხდა BRAF დადებითი პაციენტების შედარება პაციენტებთან BRAF ანტისხეულის უარყოფითი ექსპრესიით, აღმოჩნდა, რომ BRAF დადებით პაციენტებს უფრო ხშირად აღენიშნებოდათ ექსტრატირეოიდული მეტასტაზირება, მულტიცენტრულობა და დაავადების უფრო მკვეთრი და არასაიმედო გამოვლენის მახასიათებლები.

ჩვენი კვლევის მონაცემებზე დაყრდნობით კვლევაში არსებული ოთხი შემთხვევიდან ერთ შემთხვევაში (25%) არ გამოვლინდა BRAF მუტაციის არსებობა, სამი შემთხვევა(75%) კი BRAF დადებითი აღმოჩნდა. ეს მონაცემები ამყარებს სხვა განხილულ კვლევებში მიღებულ მონაცემების სარწმუნოებას.

ჩვენს კვლევაში სიმსივნის აგრესიულობის ზრდასთან ერთად BRAF ანტისხეულის ექსპრესიის მკვეთრ მომატებასთან გვექონდა საქმე. თითქმის ყველა შემთხვევა, რომელიც ექსტრატირეოიდული გავრცელებით ხასიათდებოდა BRAF ანტისხეულის მიმართ დადებითი აღმოჩნდა ან გამოავლინა ამ ანტისხეულის ზომიერი ექსპრესია.

104 პაპილარული კიბოს კვლევისას, რომელიც ნიკიფოროვას მიერ იქნა წარმოებული (52) ამერიკელ პაციენტებზე აღმოჩნდა მკვეთრი ასოცირება BRAF მუტაციის არსებობასა და კიბოს ექსტრატირეოიდულ გავრცელებას შორის [(16/38 (42%) BRAF + წინააღმდეგ BRAF -13/66 (20%), $P=0.03$)].

ჩვენი კვლევის მიხედვით, ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ კვლევაში გამოყენებული სხვა ანტისხეულებიც BRAF დადებითი შემთხვევების არსებობისას მკვეთრ კორელაციაში იმყოფებიან მის ექსპრესიასთან. HBME-1 ანტისხეულის ექსპრესია ფოლიკულური ადენომებისა და კარცინომების შემთხვევებში არ გამოვლინდა, მისი ზომიერი ექსპრესია აღინიშნა ინკაფსულირებული პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური ტიპის დროს 33,3% შემთხვევებში, აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ ჩვენს მიერ წარმოდგენილი ინკაფსულირებული ფორმის ყველა შემთხვევა უარყოფითი აღმოჩნდა BRAF ანტისხეულის მიმართ. KI-67-მა, რომელიც საყოველთაოდ აღიარებულია როგორც პროლიფერაციის მარკერი, გამოავლინა უარყოფითი ექსპრესია ინკაფსულირებულ ფორმებში. აღნიშნული ფაქტი კიდევ უფრო ამყარებს აზრს იმის შესახებ, რომ ინკაფსულირებული პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური სიმსივნის ტიპი ავთვისებიანობის და აგრესიულობის დაბალი რისკის მტარებელია. კვლევაში გამოყენებული პაპილარული მიკროკარცინომების შემთხვევები, აგრეთვე, პაპილარული კარცინომის სხვა ფორმები უმეტეს წილად დადებითი აღმოჩნდნენ

HBME_1 ანტისხეულის მიმართ. სუნივარიბელურ ანალიზზე დაყრდნობით HBME-1 ანტისხეულის ექსპრესია ჩვენი კვლევის ფარგლებში ასოცირდება BRAF ანტისხეულის ექსპრესიასთან ($P=0,001$). ასევე CK -19 და KI-67 ანტისხეულების ექსპრესია ასოცირდება BRAF ანტისხეულის ექსპრესიასთან ($p<0,05$). CD-56 ანტისხეულის ექსპრესია არ უკავშირდება BRAF ანტისხეულის ექსპრესიას ($p<0,05$).

დასკვნები

1. ჩვენს მიერ წარმოებულ კვლევაზე დაყრდნობით, ბეტესდას კატეგორია 3-ად დიაგნოსტირებულ შემთხვევებში ავთვისებიანობის რისკი მაღალია და 20.3% შეადგენს.
2. ავთვისებიანი შემთხვევიდან, რომელიც კვლევაში იყო ჩართული (46,6%) შემთხვევებისა გამოვლინდა I ასაკობრივ ჯგუფში (20-დან 35 წლამდე). ეს ფაქტი ამყარებს ჩვენს ჰიპოთეზას იმის შესახებ, რომ ახალგაზრდა ასაკში ფარისებრი ჯირკვლის კიბოს განვითარების რისკი მაღალია. ჩვენი კვლევის მიხედვით I ასაკობრივ ჯგუფში განთავსებული კიბოს ყველა შემთხვევა წარმოადგენდა ჰისტოპათოლოგიურად დადიაგნოზებულ პაპილარული კარცინომის კლასიკურ ვარიანტს. ეს შედეგი კიდევ უფრო ამყარებს ჩვენს ჰიპოთეზას იმის შესახებ, რომ პაპილარული კარცინომის კლასიკური ვარიანტი უმეტესად ახალგაზრდა ასაკში გვევლინება.
3. ჩვენმა კვლევამ გაამყარა ჰიპოთეზა იმის შესახებ, რომ პაპილარული კარცინომის ინკაფსულირებული ფორმები, კერძოდ, "ფარისებრი ჯირკვლის არაინვაზიური ფოლიკულური დაზიანებები პაპილარული კიბოს მსგავსი ბირთვული მახასიათებლებით", როგორც ეს ახლახანს განხორციელებული რეკლასიფიკაციის შედეგად იწოდა, მსუბუქი მიმდინარებით ხასიათდებიან. ინკაფსულირებულმა პაპილარული კარცინომებმა, რომლებიც ჩვენს კვლევაში გამოვიკვლიეთ გამოავლინეს BRAF ანტიგენის უარყოფითი ან ძალიან სუსტი ექსპრესია (68%).
4. სიმსივნის კაფსულის არარსებობა ერთადერთი ჰისტოლოგიური პარამეტრია, რომელიც მნიშვნელოვნად ასოცირდება BRAF მუტაციის არსებობასთან. ჩვენ მიერ გამოკვლეულ მასალაში შევნიშნეთ, რომ BRAF მუტაციის მქონე სიმსივნეებს ახასიათებდათ ინფილტრაციული კიდებები და არ გააჩნდათ ინტაქტური კაფსულა.
5. ჩვენს კვლევაზე დაყრდნობით, მიკროკარცინომები, ისევე როგორც კლასიკური პაპილარული კარცინომები, ხასიათდებიან ექსტრატირეოიდული გავრცელების პოტენციით და აღინიშნება BRAF მუტაციის მაღალი ექსპრესია. BRAF ანტისხეულის ექსპრესია მიკროკარცინომების არსებობის შემთხვევაში მნიშვნელოვან პროგნოზულ მარკერს წარმოადგენს.
6. BRAF ანტისხეულის ექსპრესია იზრდება გამოკვლეულ ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებების აგრესიულობის ხარისხის მატებასთან ერთად ($p < 0,005$). BRAF ანტისხეულის მონიტორინგი ექსპრესია იწვევს ფარისებრი ჯირკვლის პაპილარული კარცინომების აგრესიულობის ზრდას 3,677-ჯერ.

პრაქტიკული რეკომენდაციები

ჩვენი კვლევის მონაცემებზე დაყრდნობით, ფარისებრი ჯირკვლის კიბო, კერძოდ, პაპილარული კარცინომა, განსაკუთრებით დიდი სიხშირით აღინიშნა ახალგაზრდა ასაკში, სწორედ ეს ფაქტი საშუალებას გვაძლევს ამ ასაკობრივ ჯგუფში ფარისებრი ჯირკვლის განსაკუთრებით მაღალ მონიტორინგს გავუწიოთ რეკომენდაცია.

მნიშვნელოვანია, რომ წვრილნემსინი ასპირაციული ბიოფსიური მასალების ციტოპათოლოგიური დიაგნოსტიკა მთლიანად დაეფუძვნოს ბეტესდას კლასიფიკაციას, ვინაიდან ეს სისტემა შესაძლებლობას გვაძლევს გავმიჯნოთ თერაპიული და ქირურგიული პათოლოგიები, ვაწარმოთ სწორი მონიტორინგი და განვსაზღვროთ ამავე სისტემის თითოეულ კატეგორიაში ავთვისებიანობის რისკის ალბათობა.

ბეტესდას კლასიფიკაციით მესამე კატეგორიის არსებობა ბეტესდას სისტემაში, საშუალებს იძლევა, სწორად მივყვეთ ბეტესდას რეკომენდაციებს, ჩატარტეს უფრო აქტიური დაკვირვება ან განმეორებითი ასპირაციული ბიოფსიური მასალის ციტოლოგიური კვლევა, რაც თავის მხრივ საბოლოო სრულფასოვან ინტერპრეტაციამდე მიგვიყვანს. ბეტესდას მესამე კატეგორიის არსებობისას, ციტომორფოლოგიურ მონაცემებთან ერთობლიობაში, სასურველია შეფასდეს გენეტიკური დაზიანებების არსებობა.

BRAF მუტაცია თითქმის არ ვლინდება ინკაფსულირებული პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური ვარიანტის შემთხვევებში. ეს ფაქტი შესაძლებელს ხდის განვასხვაოთ არაინვაზიური ფოლიკულური ნეოპლაზია პაპილარული კარცინომის მსგავსი ბირთვული ცვლილებებით (NIFTP), პაპილარული კარცინომის ფოლიკულური ვარიანტის ინვაზიური ფორმისგან (IFVPTC). შესაბამისად ამ ფაქტისა, სწორად დაიგეგმოს შემდგომი ქირურგიული მკურნალობა.

BRAF ანტისხეულის ექსპრესია მიკროკარცინომების არსებობის შემთხვევაში მნიშვნელოვან პროგნოზულ მარკერს წარმოადგენს, შესაბამისად, BRAF დადებითი შემთხვევების არსებობისას, უნდა დადგეს საკითხი სრული თირეოიდექტომიის, ლიმფადენექტომიის და რადიოაქტიური იოდით მკურნალობის შესახებ.

ფარისებრი ჯირკვლის პაპილარული კარცინომების შემდგომი მართვისთვის BRAF მუტაციის არსებობის განსაზღვრა მნიშვნელოვან ფაქტორად გვევლინება. BRAF მუტაციის არსებობა არაკეთილსაიმედო პროგნოზთან ასოცირდება და ჩვენს მიერ წარმოებული კვლევის მიხედვით, BRAF ანტისხეულის ექსპრესია იზრდება ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაზიანებების აგრესიულობის ხარისხის მატებასთან ერთად.

დისერტაციის ირგვლივ გამოქვეყნებული პუბლიკაციების ნუსხა

1. “ფარისებრი ჯირკვლის პათოლოგიების განაწილების თავისებურებანი საქართველოში სხვადასხვა ასაკობრივ ჯგუფში. Distribution of thyroid pathologies in different age groups in Georgia“ __ Georgian Medical News, N-9(246), სექტემბერი 2015, გვ 41-46.
2. “ფარისებრი ჯირკვლის წვრილნემსიანი ასპირაციული ბიოფსიური მასალების დიაგნოსტიკური სირთულეების და დიაგნოსტიკების დახვეწილი პრინციპების მიმოხილვა“, „Accurate diagnosis of thyroid nodules:a review of diagnostic dilemmas on thyroid fine-needle aspiration biopsies“ __ Georgian Medical News- N-3(252), მარტი 2016, გვ 89-95.
3. “BRAF ანტისხეულის ექსპრესიის თავისებურებები ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა ტიპის კვანძოვანი დაზიანებებისას“- „BRAF antibody expression in the different types of thyroid nodular lesions” __ Georgian Medical News_ N10(271) ოქტომბერი 2017, გვ. 107-113.
4. ფარისებრი ჯირკვლის ციტოპათოლოგიური დიაგნოსტიკა ბეტესდას სისტემის მიხედვით: საქართველოში წარმოებული ჰოსპიტალური კვლევა----სტუდენტებისა და ახალგაზრდა მკვლევარების მესამე საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენცია, თბილისი, საქართველო, 2015წ.
5. ფარისებრი ჯირკვლის პათოლოგიების მორფომოლეკულური დიაგნოსტიკა -- ციტოლოგთა ორმოცდამეერთე ევროპული კონფერენცია- მადრიდი, ესპანეთი, 2018

Davit Tvildiani Medical University

Copyright reserved

Ekaterine Barabadze

**BRAF antibody expression in the different
types of thyroid nodular lesions**

Abstract of dissertation for PhD in Medicine

Tbilisi, 2018

Research Director:

George Burkadze -- Professor George Burkadze, MD, PhD, IFCAP. Head of Department of Pathological Anatomy, N.Kipshidze Central University Clinic. President of Association of Pathologists and Cytopathologists of Georgia. President of Georgian division of International Academy of Pathology

Official Experts/Opponents:

Rima Beriashvili ---- MD, PhD, Vice-Rector, Tbilisi State Medical University, professor, department of cytopathology, Pathology and forensic Medicine Direction

Liana Gogiashvili----MD, PhD, Professor, TMU, Aleksandre Natishvili Morphologic Institute, Head of the pathology department

Levan Ramishvili- MD, PhD, Professor, Clinic"Enmedic" Head of the Head and Neck Surgery, Oncologist L

The dissertation defence, on the session of a nonpermanent Dissertation Council at Davit Tvildiani Medical University, 2/6 Lubliana str. Tbilisi, Georgia.

The dissertation could be obtained from the Daphne Hare Medical Library, Davit Tvildiani Medical University.

The abstract has been distributed on 2018

Scientific Secretary of the Dissertation Council, MD, PhD

Tamar Talakvadze

General description of the Study

Prevalence of the problem

Thyroid cancer is the most common endocrine cancer (1). The number of new cases is increasing each year all over the world and at the same time, is increasing the percentage of newly diagnosed cases (2). Based on the data of NCDC (National Center of Disease Control), according to 2015 year data of population-based cancer registry in Georgia, thyroid cancer is the second most common cancer in women of all new registered cancer cases for all cancer sites. Based on the same data, the number of new cases of thyroid cancer takes 1st place in adolescent girls and second place in adolescent boys (3).

By world statistics, thyroid cancer incidence has increased dramatically, and almost all of this increase is in papillary thyroid cancer (1).

Statistically is also very important the fact in what age group the cancer is revealed, because for individual tumor cases was formed the model, which determines the cancer latency (4). Age, as well as tumor size is important factor to determine the risk, for example 1 cm size nodule in young patient has different risk compared to the same size nodule at age of 70, the latency period at young age is shorter, accordingly the growth rate is higher, coefficient of metastasis formation is also high.

A very wide study (5) showed, that in case of microcarcinoma, the risk of metastasis formation is higher in the younger age group than in the elderly. Although access to medical services has improved over the previous years, diagnostic methods have been improved, early detection of cancer became possible by using high-tech equipment and at the same time treatment tactics have been also improved, new approaches have been developed, the mortality rate has still increased (0.8-1.5%) (6,7).

Based on modern beliefs, the majority of small tumors are not at a risk of further progress (8), but it should be noted that part of such tumors is still progressing, and even though the thyroid cancer compared with other tumors, is characterized with better outcome, 10-15% of patients have an aggressive form of a disease that accordingly is associated with the increase in mortality rate (9).

Genetic and environmental factors play an important role in the development of thyroid cancer, but iodine deficiency is especially important as a major risk factor for cancer, particularly in endemic zones like Georgia. A significant increase in number of this cancer was observed at a younger age, particularly in young girls. In this regard, the ionizing radiation is considered as a major risk factor for thyroid cancer, as at a young age thyroid tissue is particularly sensitive to ionizing radiation. Based on the

above fact, it is important to determine the probability of presence of thyroid nodules in different age groups, as far as possible to differentiate surgical and therapeutic pathologies, as well as to appraise the risk of malignancy in the above-mentioned thyroid nodules, and to determine the further treatment.

FNA (fine-needle aspiration biopsy) cytology in the presence of thyroid nodules is a principle recommended diagnostic method (10) and is called “golden standard” for correct management of these lesions (11). FNA cytology

FNAB's specimen cytology result interpretation is possible using classification recognized by the World Health Organization - Bethesda Classification (The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytology (TBCRTC), which consists of 6 subcategories and represents the bridge between cytopathologist, clinician, radiologist and surgeon. Indicated system is ideal to determine the malignancy risk stratification, although in most cases cytopathological evaluation based on this system is subtle and sophisticated, one-third of cytopathological diagnoses still fall into uncertain category, such as undetermined atypia (AUS-Atypia Undetermined Significance) or undetermined follicular lesions (FLUS-Follicular Lesions of Undetermined Significance) for which probability of malignancy is relatively low, however is possible (12). Management of above-mentioned categories is the clinical dilemma (13). Approach is surgical to many of them, considering the malignancy risk in indicated categories that are not so low based on current studies (14, 15). In AUS/FLUS category molecular tests represent the diagnostic lever (16).

But it is important to understand what factor determines the development of cancer in the low age group, especially the development of papillary cancer, may be there is particular genetic mutation that increases the likelihood of developing of this type of cancer. Individual studies have been conducted in connection with the famous explosion of Chernobyl, after 4-10 years interval, has been seen increased risk of development of papillary carcinomas in the young age group (18). In cases of sporadic papillary carcinoma has been observed mutation of one of the major antigen Ret or BRAF antigen. The radiation carcinogenesis is more likely to be linked to Ret gene (19,20,21), however studies have shown that after Chernobyl explosion, mostly has been activated BRAF antigen (17). Based on this fact, it is a very important basis for further research in this regard. Since BRAF mutation plays an important role in the papillary cancer tumorigenesis, it is suggested that this mutation determines the clinical and pathological behavior of this type of cancer and can be regarded as an innovative prog-

nostic marker (23,24).

Increasing interest in the use of molecular tests during thyroid nodules involves the BRAF mutation as the main characteristic of the genetic profile of the papillary carcinoma (22,25). The positivity of BRAF antibody can be successfully used not only in diagnosing the dubious cases of papillary carcinoma, but also as a prognostic marker, since the presence of this mutation in the case of papillary carcinomas corresponds to unfavorable prognostic parameters such as multicentricity, extrathyroidal extension and metastasizing in lymph nodes (26,27,28).

Presurgical, proper risk assessment of patients with papillary carcinoma having various risks, can fully define the area of thyroidectomy and the scale of lymph node dissection (29). In the case of papillary microcarcinomas BRAF antigen is less likely to occur, but in case of detection, the cancer is characterized by aggressive behavior. Consequently, in patients with microcarcinoma and BRAF antibody expression it is necessary to conduct adjuvant treatment, radioactive iodine ablation, total thyroidectomy and lymphodissection (30). This issue is particularly relevant today, since microcarcinoma management is the cause of dispute and diversity of opinions (31).

On the basis of re-classification in 2016, invasive follicular variant of papillary thyroid carcinoma (IFVPTC) was separated from non-invasive form, and the latter now is referred to as a noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP) (32). Consequently, the determination of BRAF mutation status is especially important for the patient's further management in order to differentiate these types of lesions. It is important to detect BRAF antibody with respect to well-adapted antibodies characteristic to thyroid nodules. In particular, with respect to HBME_1, CK-19, CD-56, TTF-1 and Ki-67. It is necessary to assess the likelihood and frequency of coexpression, to determine how their coexpression may change between benign, bordering and malignant forms, as well as to assess how their coexpression is changing with the increase of cancer aggressiveness.

Goal of research

The main tasks of our research were:

- Fine-needle biopsy diagnosing according to Bethesda classification, the probability of identification of each Bethesda class in different age groups.
- Identification of cytopathological and histopathological correlations during thyroid nodules.
- Identify the phenotypic characteristics of the thyroid pathologies.
- In case of thyroid nodules, identification of malignancy risk by Bethesda classification.
- Identification of BRAF mutation expression in different thyroid pathologies.

This research will allow evaluate the thyroid nodules in multidimensional aspects, determine age peculiarities and the risk of malignancy in each age group, detect the phenotypic characteristics of thyroid gland pathologies and features of BRAF mutation distribution in different pathologies. Analyzing the thyroid nodular lesions in one aspect will enable us to achieve better clinical management and planning of this topical issue.

Research material and methods

Fine-needle aspiration biopsy specimens (FNA-biopsy materials):

Fine-needle aspiration biopsy specimens were collected from 600 patients within one year from 2013 to 2014. Three Clinical Institutions were involved in collecting materials (New Hospital, Tbilisi Cancer Center and National Screening Center). All cytology specimen data of these cases was collected through a computerized search of the Cytopathology archives.

Thyroid FNABs were performed under ultrasonography guidance under aseptic conditions using 23- to 25-gauge needles. At the end of procedure, few smears were prepared and quickly fixed in 95% ethyl alcohol. All of them were stained with conventional Papanicolaou staining method. In cases where we got the fluid, this fluid was centrifuged and the sediment was smeared on several slides, which were also stained with a routine Papanicolaou method.

The material was interpreted by an experienced cytopathologist under a microscope, and a repeat assessment of most part of the study material was carried out by another cytopathologist. The assessment was based on today's standards and interpretations in cytopathology; accordingly it was done using Bethesda classification.

Each case has been placed in a certain group of classification based on the guidelines on adequacy of the material.

Cytology material (91.3%) was considered adequate and suitable for diagnostic, if it contained well preserved follicular cells composed of five-six groups, and each of these groups had at least ten cells. Only materials that were technically perfectly prepared were selected, and the aspirations were quickly smeared with quick fixation, to avoid those cellular changes, that make difficult the cytomorphology diagnostics and in most cases are associated with fixation defects.

All clinical and radiological data, associated to each case, were taken into account in the diagnosis. Aspirated materials, evaluated as inadequate, have been subjected to repeated aspiration, because the risk of cancer in non-inadequate material based on a number of studies is about 5-15%. Repeated fine-needle aspiration has been performed only in 24 cases out of 52. Some of the patients refused to repeat aspiration.

Based on the histomorphologic data, we have selected patients who were undergone surgery. The risk of malignancy in each category of Bethesda System was determined by cytopathological and histopathological data.

All patients enrolled in this study were divided by age and sex, as well as clinical and radiological data. The age of patients varied from 20 to 80 years. We have grouped them roughly in four age groups: I- from 20 to 35, II- from 36 to 50 years, III- from 51 years to 65 years and IV- from 66 to 80

years. It was determined, which class of Bethesda classification, was shown primarily in each age group, was assessed the percentage of Bethesda categories in each group. Then we figured out how each cytomorphologic diagnosis was compatible with searched histomorphologic diagnosis, in each of these cases we created a risk of malignancy.

Materials for Histomorphological and Immunohistochemical study:

During one year from 2014 to 2015, histological materials were collected in histomorphological archives of the Union of Pathologists and Cytologists - Pathgeo (Tbilisi, Georgia) and the Center for Endocrinology-Metabology-Dietology - Enmedic (Tbilisi, Georgia). Criteria for involvement in the study were: differentiated thyroid tumors derived from follicular epithelia, including adenomatous nodes, papillary carcinoma forms: classical variant of papillary carcinoma, papillary microcarcinoma, follicular variant of papillary carcinoma (encapsulated), a Tall-cell variant, papillary carcinoma with multifocal growth and extrathyroidal extension, follicular adenoma, follicular carcinoma, along with Hürtle cell changes. The study also used materials containing normal thyroid tissue. In total, the study was carried out on 54 cases, out of which only 4 cases contained normal thyroid tissue. The material in paraffin should have been well treated and maintained with architectonic characteristics.

Histomorphological interpretation has been repeated by two independent histopathologists. Diagnosing, grading was totally based on the World Health Organization (WHO) diagnostic criteria for thyroid tumor processes.

For immunohistochemical purposes, slices from formalin-fixed and paraffin-embedded materials were prepared at 3-4 microne using microtome. The material was placed at microscope slides preliminary treated with adhesive material. The microscope slides were placed in DAKO PT Link code: PT10126. In PT Link, in which was already placed buffer- Target retrieval solution high ph 50X, which is antigen retrieval, as well as deparaffinization buffer. In indicated device, retrieval of antigen was made during 20 minutes, at 970C.

Upon completion of retrieval process, the slides moved to WASH BUFFER (20X), with tha same brand code: K8000, DM831.

The next stage was Envision Flex Peroxidaze-blocking reagent -5 min. (code: K8000, SM801).

The following primary monoclonal antibodies were used in the study: 1.HBME-1 monoclonal mouse, code: M3505, concentrated antibody dilution: 1:100. 2. TTF1 Monoclonal mouse, code: M3575 concentrated antibody dilution 1:100. 3. CD56 Monoclonal mouse, code: M 7304 concentrated antibody dilution 1:100. 4. CK19 Monoclonal mouse, code: M

0888, concentrated antibody dilution: 1:75. 5. Anti-BRAF antibody produced in rabbit, code (SIGMA- HPA001328) dilution: 1:75. The next step was conducted with secondary antibody - Envision Flex/HRP, code: K 8000, SM802

Incubation period was 20 minutes.

Chromogene stage: Envision Flex substrate buffer, DAB + Chromogen (substrate and concentrate) dilution: 1:50. Incubation time: 5-25 min.

The following preparations for few seconds were stained in GILL 3 HE-MATOXILIN.

Dehydration, transparency and microscope cover glass covering Moutant synthetic

Immunohistochemical analyze was made as table.

Given materials were divided into four groups:

1. Materials with no antibody expression.
2. Materials with weak expression (< 10%)
3. Materials with moderate expression (from 11% to 50%)
4. Materials, with strong expression (> 51%)

Statistical analysis of our study was made using statistical methods ANOVA, SPSS (Version 21). Statistically reliable and significant have been considered results, whose P-value was less than 0.05 (<5%).

After histomorphology, as mentioned above, materials were divided into 8 main histologic groups, whose gradation was increasing according to aggressiveness grade of histomorphologic group. In each group, was defined their frequency and percentage, as well as valid and cumulative percent:

- 0 --- normal thyroid tissue – 4 (7.4%)
- 1 --- Adenomatous hyperplasia – 6 (11.1%)
- 2 --- Follicular adenoma – 5 (9.3%)
- 3 --- Papillary carcinoma encapsulated – 3 (5.6%)
- 4 --- Papillary microcarcinoma – 9 (16.7%)
- 5 --- Papillary carcinoma – 17 (31.5%)
- 6 --- Papillary carcinoma multifocal – 4 (7.4%)
- 7 --- Papillary carcinoma with extrathyroidal extension – 3 (5.6%)
- 8 --- Follicular carcinoma – 3 (5.6%).

Univariate analysis was performed, where anti-BRAF antibody expression was considered as Dependent Variable, and other five antibody expression as Constant or Predictor Variables. If non-standart coefficient was assessed as positive number, it was assumed that each Predictor Variable expression determines expression of Dependent Variable, and statistically it is important when $P < 0.05$.

In 54 cases studied, have been performed multivariate statistical analysis and dedined Odds Ratio (OR). The norm was estimated by weak expression or negative expression of antibodies, and 1 was noted by medium or strong expression.

Research results

Results of cytology and histology studies

Ultrasound-guided FNABs was conducted in 600 patients, diagnosing and FNA biopsy specimen interpretation was performed by Bethesda classification. Men to women ratio was 1:9 that showed us, that thyroid nodular disease, in studied material, predominates in women. Correlation between age groups and examined material evaluated by Bethesda system diagnostic criteria has been defined. This correlation is represented by the following diagram.

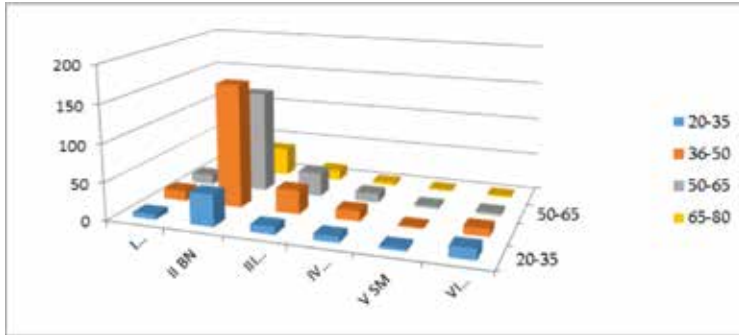


Chart. 1. Correlation between age groups and Bethesda diagnostic category on FNAs of thyroid nodules. (ND- non-diagnostic, BN-benign nodule, AUS-atypia undifferentiated significance, SFN-suspicious follicular neoplasia, SM-suspicious malignancy, MGT-malignant).

Based on our study, out of 600 biopsies, in 52 patients (8.7%) aspiration biopsy material was assessed as non-satisfactory due to the presence of cystic lesions and microcalcification. We re-aspirated 24 cases and materials were divided into corresponding categories, only 1 case was malignant, and 6 cases were still unsatisfactory. The received results are represented by the following diagram:

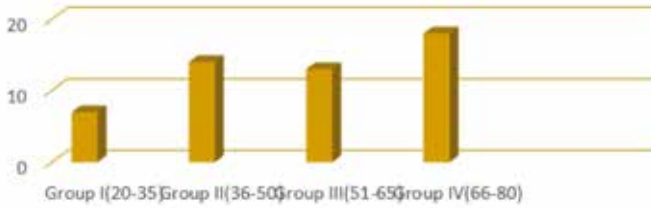


Chart. 2: Correlation between age groups and Bethesda Classification 1K (ND/ UNS-non-diagnostic, unsatisfactory for diagnostic). I age group (n=7), II group (n=13), III group (n=12), IV group (n=20).

Bethesda category 2 – benign lesions generally represents 60-70% of FNA biopsy material. In our study 63% of examined cases were assessed as Bethesda category 2, or as benign lesions and most of them were placed into II (n=164), II (n=132) age group.

During cytopathological diagnosing, colloid nodules were the most common (64%), including colloid goiter with hemorrhage, cystic degeneration or adenomatous growth. The other benign lesions diagnosed were Hashimotos thyroiditis (28%), de Quervains thyroiditis (5%) and thyroglossal duct cysts (3%). In benign lesion, follicular cells were positioned as one layer sheets, however in single cases they were forming well-arranged three-dimensional structures, that were totally intact, composing cellular spheres.

Although anysonucleosis was seen in single cases, manifested pleomorphism and nuclear atypia was not revealed. Single microfollicular structures were also seen. High cellularity was not manifested, mainly, the examined smears revealed weak cellularity and it was in 47.8% of cases. Pleomorphisms was seen only in 2.9% of cases, single Hürtle cells was seen in 2.2% of cases, macrophages (sponge cells) in 39% of case. As for background, colloid mixed with erythrocytes were seen in 55.8% cases, and only colloid in 44.2%.

The subcategory of examined materials, Hashimoto thyroiditis was 28% of benign cases. All smears were moderately cellular. Lymphoid population was moderately observed in 89% of cases. Lymphoid cells showed polymorphism. It was also possible to see the presence of intact lymphocytic aggregates. In most cases Hürtle cells were seen. Multinuclear cells were reported in 27.8% of cases and epithelial cells in 11.2%. The proportion of benign lesions in Bethesda second category is graphically illustrated as:

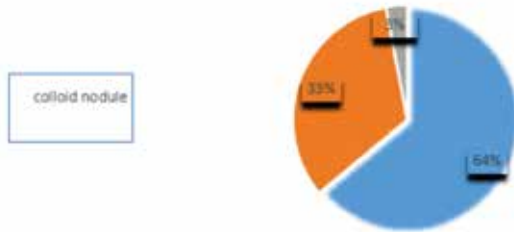


Chart. 3. Proportion of benign lesions in Bethesda second category. Blue – colloid nodules, red – thyroiditis, gray –thyroglossal cysts. Our study data graphically can indicate proportions according to diagnostic category 2 in various age groups:

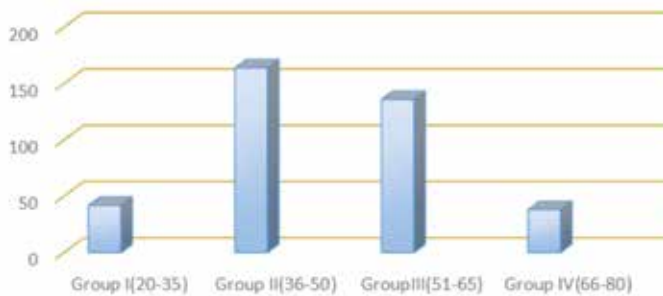
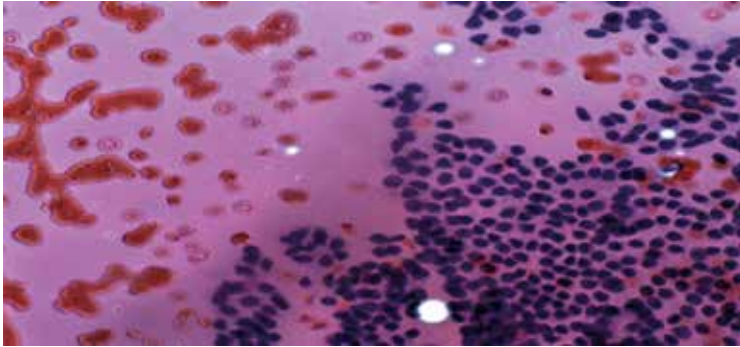
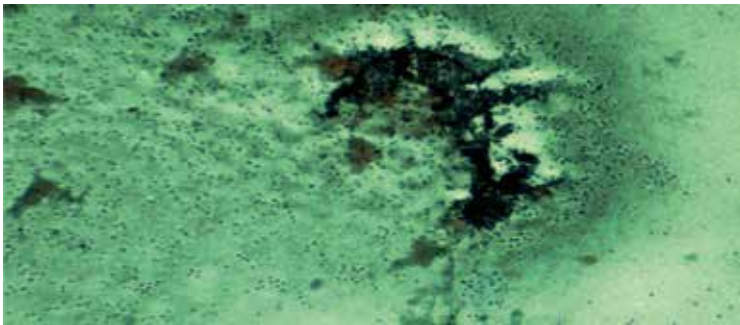


Chart. 4. Correlation between age groups and benign lesions, class 2 Bethesda classification. I age group (n=44), II group (n=164), III group (n=132), IV group (n=38).

Aslo we want to present few pictures of cases stained by Papanicolaou staining method, where benign thyroid lesions are seen.



Picture 1. Colloid goiter. FNA biopsy material. 36 year old woman (Pap staining, 40X)



Picture 2. Hashimoto's thyroiditis; FNA biopsy material, 57 year old woman (Pap staining, 10X).

Within our study, from 76 surgical material, we found that 59 (77.6%) cases was nodular goiter, 12 (15.7%) cases were diagnosed as follicular adenomas and 5 (6.5%) cases as papillary carcinoma, although their size was less than 1 cm and they were not aspirated, and can be considered that they are found by pure chance, because based on many studies, carcinomas can be revealed by chance only after autopsy (131).

BETHESDA Category 3- AUS / FLUS

FNA biopsy materials of 88 (14.6%) patients out of 600 examined patients were placed into Bethesda Category 3, which belongs to the most heterogeneous diagnostic category, and their majority was II (n = 32) and III (n = 32) age group. In our research, to this category we have assigned cases, which were high cellular, at single regions presented as three-dimensional, irregular structures, with moderate pleomorphism (84%), wrinkles and notches in single cases (67%), intranuclear cytoplasmic pseudoinclusions (58%), which have not been assessed as pure inclusions. Out of the 88

patients, 54 patients underwent partial or complete thyroidectomy. Following histopathological evaluation, 19 (35.2%) has been estimated as a nodular goiter, 24 (44.4%) has been evaluated as a follicular adenoma and 11 (20.3%) as malignant lesions. Graphically, this data is as follows:

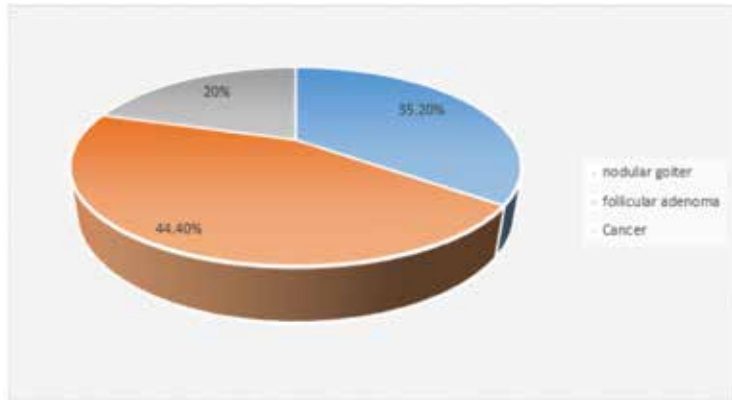


Chart. 5. Data following histologic evaluation of Bethesda 3 category. Red-nodular goiter, blue-follicular adenoma, gray-malignant lesion. Papillary variant was in 9 cases of malignant lesions (81.8%) and follicular variant in 2 cases (18.2%). Follicular variant of papillary carcinoma was in 6 cases (66.6%) out of 9 cases of papillary carcinoma and classic papillary carcinoma was in 3 cases (33.4%). Malignancy risk was defined, based on our study, in cases diagnosed as Bethesda category 3 it was 20.4%. Our study results graphically can be presented as follows:

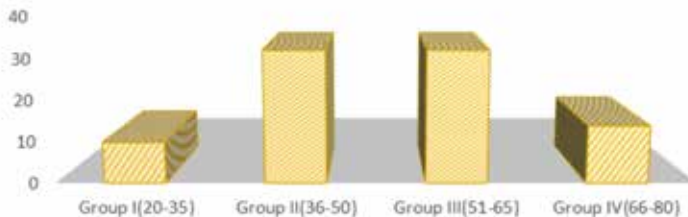


Chart. 6. Correlation between age groups and Bethesda classification, class 3 lesions -AUS/FLUS. I age group (n=11), II group (n=32), III group (n=21), IV group (n=13). Fourth group by Bethesda classification - follicular lesions, follicular neo-

plasia, which includes follicular adenoma, as well as follicular variant and Hürtle cell neoplasia. To this group we assigned examined material with highcellularity, formation of microfollicular and three-dimensional structures, existence of irregular nuclear contours, uneven distribution of chromatin. 6.3% (38 cases) of materials used in our study was assessed, as follicular neoplasia. Their majority was placed in II (n=14) or III (n=12) age groups. 26 patients underwent thyroidectomy. Following histological study 8 (30.2%) cases were considered as malignant lesions (mainly, follicular type of papillary carcinoma or papillary carcinom), 18 (69.8%) cases were assessed as follicular adenoma or adenomatous hyperplasia, malignancy risk in the above mentioned category, within our study, was 30.2%.

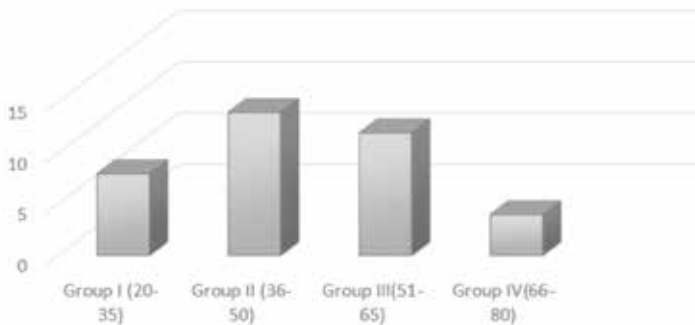
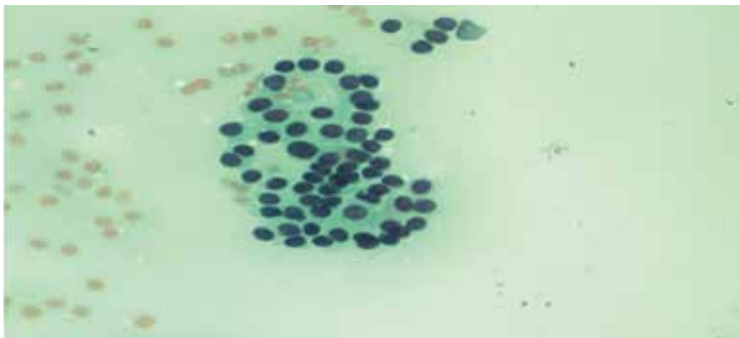


Chart. 7. Correlation between age groups and follicular neoplasia – class 4 by Bethesda system - I age group (n=8), II group (n=14), III group (n=12), IV group (n=4).



Picture 3. Follicular neoplasia. Microfollicular structures. Unequal chromatin. FNA biopsy specimen, 67 year old man (Pap staining, 40X).

Bethesda system, diagnostic category V – is considered as having high malignancy risk and includes lesions suspicious for malignancy. Into this cate-

gory we placed cases, which were characterized by incomplete presence of cellular features of papillary carcinoma (e.g. presence of nuclear pseudoinclusions only in single cells). Within our study, 2% of specimen (12 cases) was assessed as suspicious for malignancy. This diagnostic category mostly was assigned to I (n=4) and III (n=4) age groups. Following histology 11 cases (91.6%) were diagnosed papillary carcinoma, 6 (54.5%) out of these cases, were assessed as follicular variant of papillary carcinoma, from 12 presented cases, only one case was assessed as Hürtle cell adenoma. This data graphically can be presented as follows:

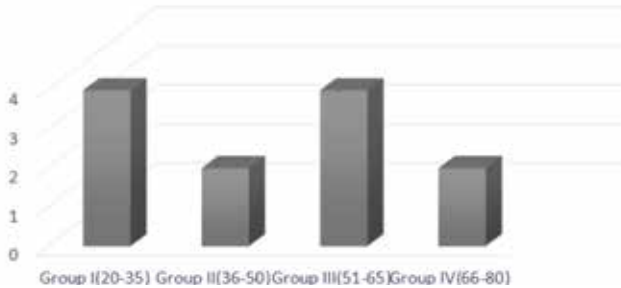
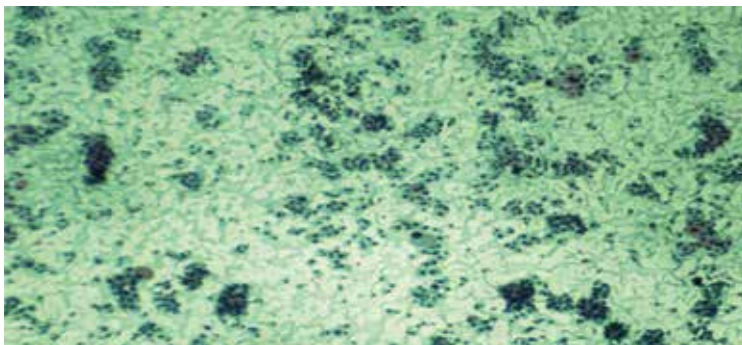


Chart. 8. Correlation between age groups and lesions suspicious for malignancy - class V by Bethesda system-I age group (n=4), II group (n=2), III group (n=4), IV group (n=2).



Picture 4. Hürtle cell neoplasia suspicious for malignancy. FNA biopsy material, 42 year old woman (Pap staining, 10X)

Categories VI, Bethesda system – malignant lesions not only include thyroid tumor, but also thyroid metastatic lesions and lymphomas. Enlargment of nuclei, overlapping, elongation, irregular contours, nuclear inclusions and wrinkles, squamous cytoplasm, manifestation of true papillae and psammoma bodies represent main features of malignancy in our cytologi-

cally examined FNA biopsy materials. 14 cases (46.6%) out of 30 malignant cases (5%) within our study, the diagnosis of all of them were confirmed by histology, were manifested in I age group. Patients, whose FNA biopsy material was assessed as malignant or category VI by Bethesda system: 22 cases (73.3%) were classic variant of papillary carcinoma, 3 (10%) follicular carcinoma (Hurtle cell variant), 1 (3.3%) medullary carcinoma, 3 (10%) anaplastic carcinoma and 1 (3.3%) diffuse large-cell lymphoma. Graphically this data can be summarized as follows:

Y

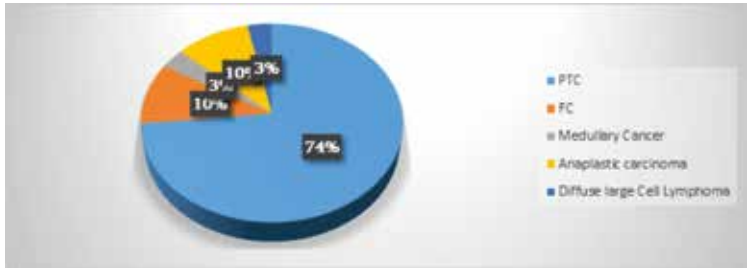


Chart. 9. Bethesda category VI data after histologic assessment; blue – papillary carcinoma, red – follicular carcinoma, gray – medullary carcinoma, yellow-anaplastic carcinoma, dark blue – diffuse large cell lymphoma.

Graphically distribution of materials assessed as Category VI by Bethesda System in age groups can be summarized as follows:

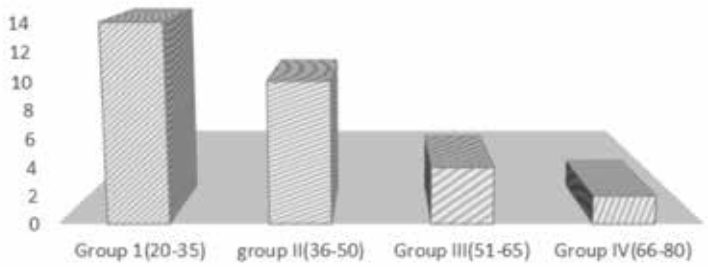
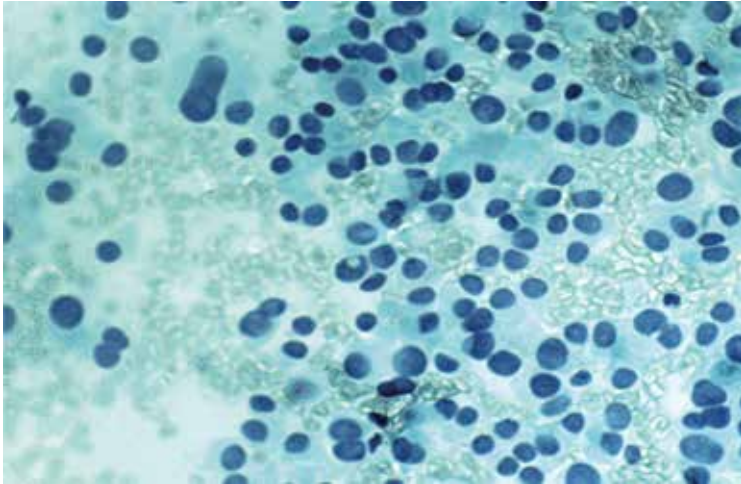
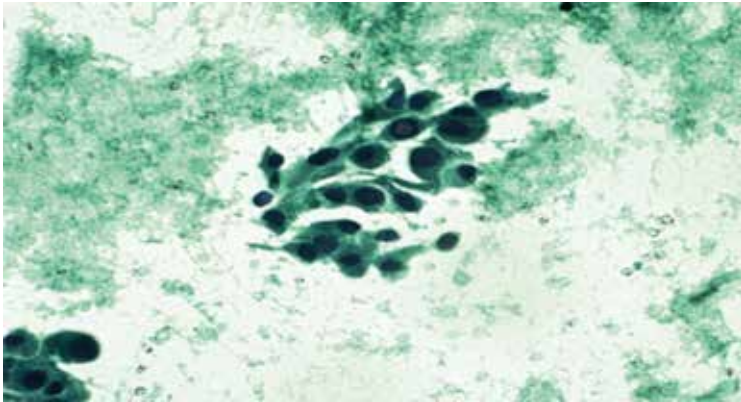


Chart 10. Correlation between age groups and malignant lesions - category VI by Bethesda system-I age group (n=14), II group (n=10), III group (n=4), IV group (n=2).



Picture. 5. Follicular variant of papillary carcinoma. FNA biopsy material, 22 year old woman, Pap staining, 40X



Picture. 6. Papillary carcinoma. FNA biopsy material, 29 year old woman, Pap staining, 40X

3.2. Immunohistochemical study results

Within our study, immunohistochemical study was performed on examined histological material to reveal the following monoclonal antibody expression: anti-BRAF, HBME-1, CD-56, CK-19 and Ki-67. Normal thyroid tissue didn't show positive expression to BRAF antibody. Single cases of adenomatous hyperplasia and follicular adenomas (33% and 40%) showed weak positivity to this antibody, although weak positivity within our study

in general was not assessed as positive expression. Encapsulated forms of papillary carcinomas showed weak immunoreactivity to indicated antibody (68%) or were totally immunonegative, accordingly, none of the encapsulated forms were assessed as positive expression. In case of papillary microcarcinomas, immunoreactivity to indicated antibody was distributed as follows: 22% of microcarcinomas were negative to BRAF antibody, weak immunoreactive was 22% of cases, moderate expression was seen in 33.3% of cases, and strong expression was in 22.2%. Moderate and strong expression was assessed as positive expression.

In cases of classical papillary carcinomas was seen 47.1% of strong expression and 11.8% of moderate expression to BRAF antibodies, in total 58.8% of cases were assessed as positive expression, and 41.2% were considered as negative. All cases of papillary carcinoma with extrathyroidal extension or multifocal growth showed BRAF antibody moderate (49%) or strong (51%) immunoreactivity. Follicular adenomas, as well as follicular carcinoma in our study didn't show above mentioned antibody immunoreactivity.

In examined material, tumors that showed moderate or strong expression of BRAF mutation, were characterized by infiltrative borders and don't have intact capsule, also it should be noted, that tumors containing mutation were characterized by tumor associated stromal changes, desmoplasia, fibrosis and sclerosis.

Correlation between BRAF antibody expression and thyroid nodular lesions can be expressed graphically as follows:

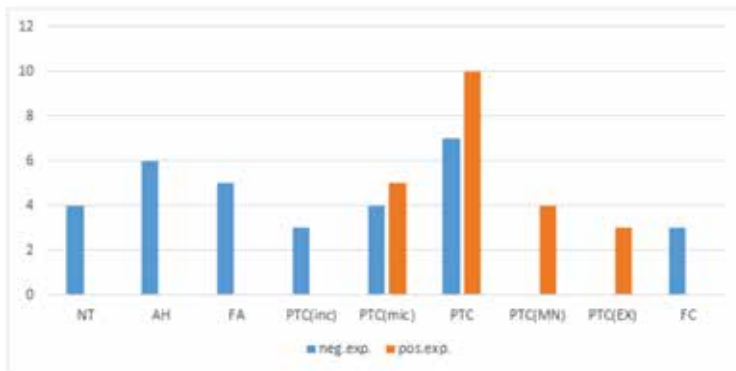
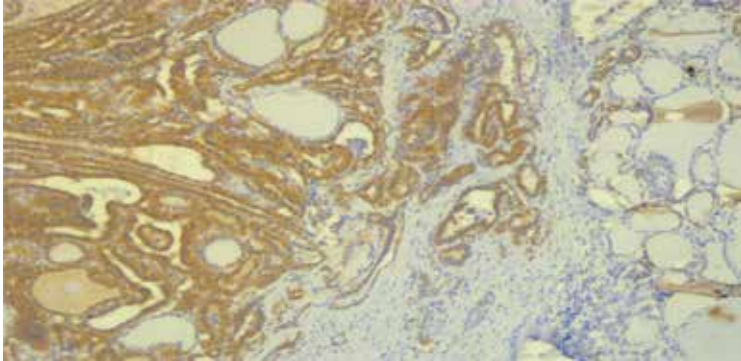
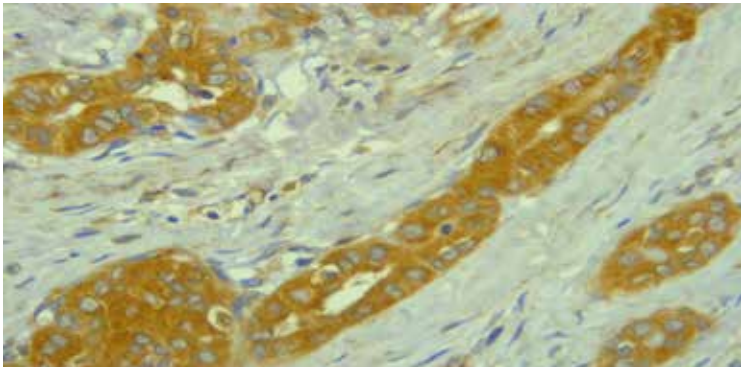


Chart. 11: Correlation between BRAF antibody expression and histotypes of thyroid tumors. NT (normal thyroid tissue), AH (adenomatous hyperplasia), FA (follicular adenoma), PTC (enc) (encapsulated papillary carcinoma), PTC (mic)(papillary microcarcinoma), PTC (Papillary carcinoma)- (classic variant), PTC (MN)(multifocal Papillary carcinoma), PTC

(ex)(papillary carcinoma with extrathyroid extension), FC (follicular carcinoma).

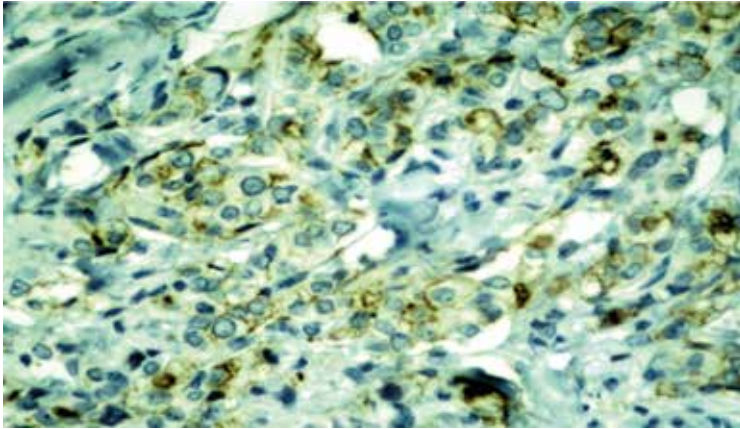


Picture 7 Papillary carcinoma, BRAF- antibody strong expression, 10X.

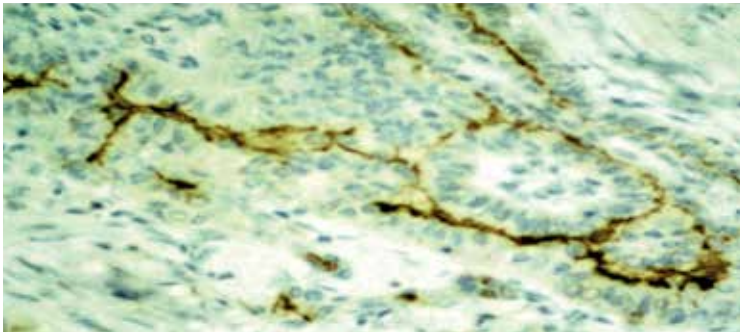


Picture 8. Papillary carcinoma, BRAF- antibody expression, 40X.

According to our study, it was found out, that HBME-1 antibody showed strong membrane expression during classic form of papillary carcinoma, and in cases that were characterized by extrathyroidal extension and multifocal growth. Cases of encapsulated papillary carcinoma showed weak or negative expression in 66.7% and moderate or strong expression in 33.3%. The above marker was negative or only weakly manifested in adenomatous hyperplasia, follicular adenomas and follicular carcinomas. Thyroid papillary microcarcinomas showed negative expression in 11.1% and strong expression in 88.9%.

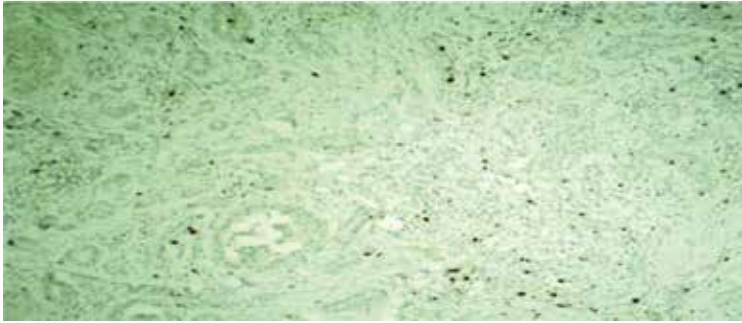


Picture 9 Papillary microcarcinoma, HBME-1 strong expression, 40X

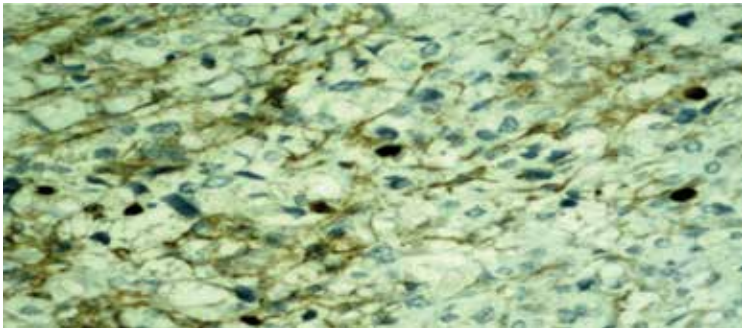


Picture 10 Papillary mcarcinoma (Tall cell type) HBME-1 expression, 40X
Within our study, we studied CK-16 antibody expression characteristics in thyroid nodular lesions, accordingly we revealed, that expression of this immunomarker is similar to HBME-1 antibody expression in different sub-types of papillary carcinoma. CK-19 shows weak or negative expression in cases of follicular lesions and adenomatous nodules.

Unlike this, Ki-67 antibody, which is well known as tumor growth and proliferation marker, was moderately expressed during follicular carcinoma, papillary carcinoma with extrathyroidal extension and multifocal growth, strong expression was revealed in none of the cases. Indicated immunomarker showed weak or negative expression in adenomatous hyperplasias and encapsulated forms of papillary carcinoma. Cases of papillary microcarcinomas showed moderate positivity in only 66.7%, and very weak expression in 33.3%. Classic variants of papillary carcinoma only in 70.59% showed moderate and not strong positivity and were weakly positive in 29.41%.

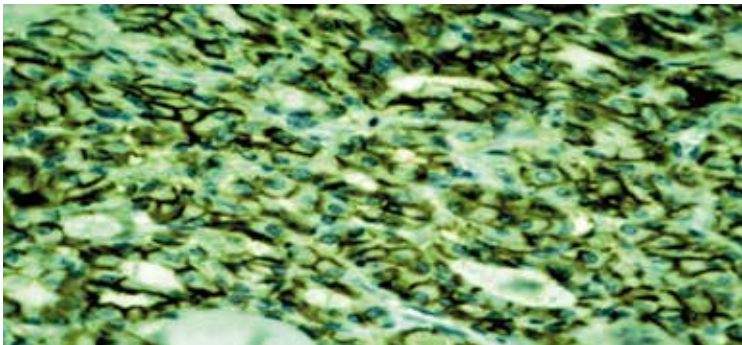


Picture 11. Papillary carcinoma Ki-67 expression, 10X

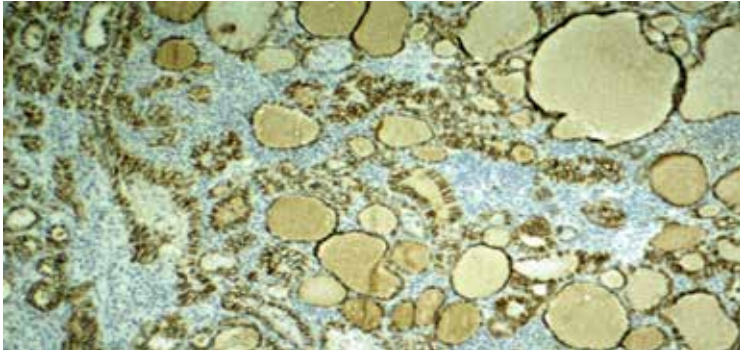


Picture 12. Papillary microcarcinoma, nodular and papillary hyperplasia, oxyphilic metaplasia, Ki-67 expression, 40X

CD-56, as follicular cell marker, was strongly positive in follicular lesions, as follicular adenoma and carcinoma. This antibody was not revealed in any types of papillary carcinomas.



Picture 13. Follicular adenoma CD-59 strongly positive, 40X



Picture 14. Follicular adenoma Hürthle cell type, CD-59 strongly positive, 10X

Picture 15. Papillary carcinoma, TTF-1 strong expression, 10X.

Follicular cell marker TTF-1 was used on all examined material, to confirm that all material had follicular genesis. Accordingly, this marker was strongly expressed in benign lesions, as well as in malignant lesions.

According to our study, antibody expression is summarized in the following table:

Table 1: Correlation between antibody expression and various types of thyroid nodular lesions.

Histotype/ anti.exp	NT n=4	AH n=6	FA n=5	PTC(enc) n=3	PTC(mic) n=9	PTC n=17	PTC(MN) n=4	PTC(EX) n=3	FC n=3
BRAF	Neg 4 100%	6 100%	5 100%	3 100%	4 44,4%	7 41,2%	1 25%		3 100%
	Pos				5 55,5%	10 58,9%	3 75%	3 100%	
HBME1	Neg 4 100%	6 100%	5 100%	2 66,7%	1 11,1%	1 5,9%			3 100%
	pos			1 33,3%	8 88,9%	16 94,1%	4 100%	3 100%	
CK-19	Neg 4 100%	6 100%	5 100%	1 33,3%	1 11,1%	1 5,9%			3 100%

	Pos				2 66,6%	8 88,9%	16 94,1%	4 100%	3 100%	
CD 56	Neg				3 100%	9 100%	17 100%	4 100%	3 100%	
	Pos	4 100%	6 100%	5 100%						3 100%
KI 67	Neg	4 100%	6 100%	5 100%	3 100%	3 33,3%	5 29,41%	1 25%	1	1
	Pos					6 66,7%	12 70,59%	3 75%	2 100%	2 100%

In 54 examined cases has been performed multivariable statistical analysis. Odd ratio (OR) was defined. Weak or or negative expression was considered as norm, moderate or strong expression was designated as 1. During OR determination it was revealed that upon increasing the grade of aggressiveness anti-BRAF antibody expression was increased 3,677-fold, in respect to other antibodies, and CD-56 expression chance was decreased 8,6-fold.

Based of univariable analysis, where BRAF antibody is dependent variable, and all other antibodies are predictors, constant variables, it was revealed that in most cases HBME-1 antibody expression is associated with BRAF antibody expression ($p=0,001$). Also CK-19 and Ki-67 antibody expression is associated with BRAF antibody expression ($p>0,05$). CD-56 antibody expression is not associated with BRAF antibody expression ($p=0,05$). Mentioned correlations are presented in the following table:

Antibody	Unstandardized Coefficients anti-BRAF	P-value
HBME-1	0,569	0,000
CK-19	0,735	0,000
KI-67	0,641	0,000
CD 56	-0,615	0,000
TTF-1	0,479	0,382

Table: Correlation between BRAF mutation expression and HBME-1, CK-19, Ki-67, CD-56, TTF-1 expression. *Dependent Variable - antiBRAF, Predictors, Constant Variables - HBME-1, CK-19, KI-67 CD-56, TTF-1

Discussion:

Our research is the first in Georgia in which cytopathological diagnosing was carried out based on the Bethesda System of classification.

In our study, the rate of inadequate diagnosis – group I by Bethesda system was reported in 8,7% of cases. Aspirational biopsy assessment, as inadequate, was associated with the existence of cystic formations or macrocalcifications, however it should be noted that the inadequacy of material was not related to dehydrated or incorrectly stained or fixed preparations, as provided by many researchers (33). Bethesda Classification does not include the risk of malignancy in this category, however, it should be noted that this category is also at a particular risk, as within our study 1 case after re-aspiration has been assessed as a malignant lesion.

In our study, Bethesda's category 2, benign lesions was reported in 63% of cases and most of them were placed in the II and III or middle age groups. Generally, most researches (34) claim that from 34% to 87.5% of the examined materials received from aspiration biopsy can be attributable to the benign processes according to the Bethesda categorization. In our study from 378 benign cases or cases assessed as Category 2 by Bethesda classification (63%) we have tried to determine the malignancy risk, however according to our study it can be regarded as quite controversial issue, because it has become possible to find only small part of surgical material of patients enrolled in our study. This can be associated to the fact that majority of these patients, according to recommendations by Bethesda classification, are under clinical supervision.

Eighty-eight (14,6%) out of 600 patients who underwent FNAB were assessed as Bethesda System, category 3, the most heterogeneous category and included in the indeterminate (cells of undetermined significance) category. Based on the same study, we totally agree the opinion expressed in the above mentioned study, as in single cases cytology is unable to give exact interpretation, however interpretation by Bethesda categorization is the powerful tool to determine pre-surgical risk.

54 patients out of 88 patients enrolled in our study (61,4%) underwent partial or total thyroidectomy. Based of histopathological and cytopathological diagnostic, has been determined the malignancy risk and it was 20,3%. Research data (35) conducted by HO.Allen.S et al. is similar to our research results. M StudThe goal of his study was to determine the risk of malignancy in bioaptates that were assessed as atypia indeterminate, from patients whose diagnoses were included to Bethesda Category 3, 64.7% underwent surgery, 17,7% made repeated biopsy and 17.6% remained under supervision. 38.5% of repeated biopsy cases, were again assessed as atypia indeterminate, out of this 26,3% cases after resection were evaluated as

having malignancy process.

Category 4 by Bethesda classification – 38 cases (6,3%) of materials enrolled in our study were assessed as follicular neoplasia. Based on the given results, malignancy risk in Category 4 of Bethesda system within our study is high (30,2%).

Based on different studies, malignancy risk in this group varies from 2,2% to 36,1% (36).

Since in our study we have identified age-dependency by Bethesda System in age groups, it should be noted that no age group has been identified in the third and fourth categories of Bethesda classification, with a slight increase in the second and third age groups, ie in middle age group.

12 cases were assigned to category 5 of Bethesda System, 2% of examined materials. Similar results were presented in the following studies (37). Study (38), which was conducted by Theoharis et.al, on aspiration biopsy material of 2468 patients showed, that only 43 patients (1,3%) belong to this diagnostic category, and all of them were suspicious for papillary carcinoma.

After histological examination, 87% of cases were reported as papillary carcinoma. Within our study 91,6% were assessed as malignant lesions that is similar to the above mentioned studies. However it should be taking into account, that only part of these lesions were reported as classic papillary carcinoma, and 54,5% was assessed as follicular encapsulated variant of papillary carcinoma, and this data is similar to data of modern studies that confirms assignment of this type of papillary carcinoma in Bethesda 4 or 5 category. As for distribution of this category in age groups, mostly it is presented in 1 and 3 age groups.

According to Y.Jo. et.al (39) study, 7% of nodular lesions is malignant process, and malignancy rate in this category is 98%. Results of indicated study are coincident with our study results, where 5% of nodular lesions were reported as malignant process. All cases were confirmed histologically and assessed as cancer. Results, that were shown by Montal et.al (40) study (4,7%) are almost identical to our study results (5%). Malignancy risk in our study in Bethesda category 6 equals to 98%. From 30 (5%) malignant cases in our study, 14 cases (46,6%) were revealed in I age group. It should be also noted, that in I age group, all these 14 cases presented histopathologically diagnosed classical variant of papillary carcinoma. This result confirms once more our hypothesis that classic variant of papillary carcinoma is mostly seen at young age.

After histopathological examination we grouped materials used in our study according to tumor aggressiveness, defined tumors with multifocal, extrathyroidal extension or metastasis formation in lymph nodes. Material

found in our study, such as adenomatous hyperplasia, as well as follicular adenomas and carcinomas show negative or weak BRAF antibody expression. This idea is confirmed by all studies, performed in this field (41).

According to international and multidisciplinary researches, it was currently revealed that follicular variant of the papillary carcinoma belongs to distinguished type of tumor and is characterized by best prognostic indicators (42). According to (43) study, absence of tumor capsule is the only histological parameter, which is significantly associated with the presence of BRAF mutation. According to our study, it should be noted that tumors having BRAF mutations were characterized with infiltrative edges and didn't have intact capsule. According to diagnostic criteria, these tumors should be assessed as "Non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features".

In respect of significant re-classification, encapsulated papillary carcinomas that we examined in our study, showed negative or very weak BRAF antibody expression (68%), accordingly our study confirmed the hypothesis that encapsulated forms of papillary carcinoma are mild and genetically, are probably differ from infiltrative tumors.

BRAF positive microcarcinomas were characterized by extrathyroidal extension, infiltrative edges, tumor associated fibrosis and desmoplasia and nuclear features of classic papillary carcinoma (44). The study showed that 70% of papillary microcarcinomas were BRAF positive (45), and all many other studies showed that this data was less than 50% (46). In our study we discussed nine cases of papillary microcarcinoma, four cases (44,4%) out of nine were totally BRAF antibody negative, and five cases (55,5%) were BRAF positive. These data indicates that our study by its results is similar to Korean study (47), according to which 65% of microcarcinomas is BRAF mutation positive.

Study (47) shows that desmoplasia is seen in 74% of examined microcarcinomas, and this is definitely associated with metastasis in lymph nodes and tumor diameter. 55% of our examined cases show the above mentioned pathological changes, that unquestionably indicates the tumor metastatic potential.

Based on all these studies and taking into account our study results we can boldly say that microcarcinomas, as well as classic papillary carcinomas are characterized by extrathyroidal extension potential and this completely depends on BRAF oncogene expression. BRAF antibody expression in case of microcarcinomas is significant prognostic marker.

The presence of nuclear changes is very important pathological criteria. In our study, as well as in other similar studies (48) nuclear features characteristic to papillary carcinoma (nuclear grooves and notches, cytoplasmic

pseudoinclusions) are more prominent and clear in positive cases of BRAF mutation. Within our study, cytoplasmic features were also evaluated, particularly the presence of abundant, squamous, solid and eosinophilic cytoplasm in most of BRAF positive cases (78%). Modern study (49), the goal of which was the correlation between cytomorphological features and positive BRAF mutation, shows the co-existence of large cells with abundant cytoplasm in most of BRAF positive mutations.

Wide cohort study shows that BRAF mutation was seen in 48% of classic papillary carcinomas, which is very close to our study data. Especially large number of BRAF mutations was seen in large Brazilian study (50), when tumor was divided according to histological subtypes, in case of classic type, its expression was seen in 66% of cases, compared to 21% of follicular type of papillary carcinoma.

In our study, single encapsulated forms of papillary carcinoma show only weak expression. These data is similar to the following studies (51), in which it is shown that in case of classic papillary carcinomas, BRAF expression varies from 38% to 69% and in case of follicular variant of papillary cancer from 0% to 32%.

Clinicopathological features that indicate unfavorable prognosis are the cancers with extrathyroidal extension, multifocality, formation of metastasis in lymph nodes and presence of distant metastasis. Lupi et.al studied 500 cases of papillary carcinoma, 43% out of 500 was BRAF positive, in this study BRAF positive patients were compared with patients showing BRAF antibody negative expression, and it was revealed that BRAF positive patients had more frequently extrathyroidal metastasis, multifocality and more strong and non-favourable disease features.

Based on our study results, in one case (25%) from 4 cases was not seen BRAF mutation, 3 cases (75%) was BRAF positive. This data confirms the accuracy of data received in other discussed studies.

In our study with the increase of tumor aggressiveness, we had a sharp rise in BRAF antibody expression. Almost all cases characterized by extrathyroidal extension were BRAF antibody positive or showed moderate expression to this antibody.

Study of 104 papillary cancers conducted by Nikiforova (52) in American patients, showed strong association between existence of BRAF mutation and extrathyroidal extension of cancer [(16/38 (42%) BRAF+ versus BRAF- 13/66 (20%), $P=0.03$].

According to our study, it should be also noted that other antibodies used in the study in BRAF positive cases are in strong correlation with its expression. HBME-1 antibody expression in cases of follicular adenomas and carcinomas was not seen, moderate expression was manifested in 33%

of follicular type of encapsulated papillary carcinoma cases, it should be emphasized that all cases of presented encapsulated form were negative to BRAF antibody. Ki-67, which is widely known as proliferative marker, showed negative expression in encapsulated forms. This fact confirms once again the opinion that follicular tumor type encapsulated papillary carcinomas have low risk of malignancy and aggressiveness. Cases of papillary microcarcinoma used in the study, as well as other types of papillary carcinomas in most cases were positive to HBME-1 antibody. Based on univariable analysis, HBME-1 antibody expression within our study is associated with BRAF antibody expression ($p=0,001$). Also CK-19 and Ki-67 antibody expression is associated with BRAF antibody expression ($p<0,05$). CD-56 antibody expression is not associated with BRAF antibody expression ($p<0,05$).

Conclusions

1. Based on our study, in cases diagnosed as Bethesda Category 3 the malignancy risk is high and comes to 20,3%.
2. From malignant cases of our study, 46,6% cases revealed in I age group (from 20 to 35 year). This fact confirms our hypothesis that at younger age the risk of thyroid cancer development is high. According to our study, all cancers in age group I represented the classical variant of histopathologically diagnosed papillary carcinoma. This also confirms the fact that classical variant of papillary carcinoma is mostly seen at younger age.
3. Our study confirms the hypothesis that encapsulated types of papillary carcinoma, particularly “non-invasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features”, as it was named by re-classification, are characterized by weak course. Encapsulated papillary carcinomas examined in our study showed BRAF antigen negative or very weak expression (68%).
4. Absence of tumor capsule is the only histological parameter, which is significantly associated with the presence of BRAF mutation. In our examined material we noticed that tumors having BRAF mutation were characterized by infiltrative edges and absence of intact capsule.
5. Based on our study, microcarcinomas, as well as classical papillary carcinomas, are characterized by extrathyroidal extension potential and show high expression of BRAF mutation. BRAF antibody expression in case of presence of microcarcinomas represents the significant prognostic factor.
6. BRAF antibody expression increases with the increase of aggressiveness grade of thyroid nodular lesions ($p < 0,005$). Increased expression of BRAF antibodies causes 3,677-fold increase of thyroid papillary carcinoma aggressiveness.

Practical recommendations

Based on our study data, thyroid cancer, particularly papillary carcinoma, is more frequently manifested at a young age. This fact enables us to recommend close monitoring of thyroid gland in indicated age group.

It is very important that diagnostics of FNA biopsy material to be totally based on Bethesda classification, because this system enables us to differentiate therapeutic and surgical pathologies, to conduct correct monitoring and determine malignancy risk probability in each category of this system. Existence of Category 3 in Bethesda system of classification, enables us to comply with Bethesda recommendations, to perform more active su-

pervision or cytological examination of reaspirated biopsy material, as in turn will lead us to complete interpretation. During category 3 of Bethesda system, combined with cytomorphological data, it is desired to assess the presence of genetic pathology.

BRAF mutation is almost not seen in cases of follicular variant of encapsulated papillary carcinoma. This fact can help us to differentiate non-invasive follicular neoplasia with papillary like nuclear changes (NIFTP) from invasive follicular variant of papillary carcinoma (IFVPTC), and based on this fact to plan correctly further surgical therapy.

BRAF antibody expression in microcarcinomas, represent significant prognostic marker, accordingly, in case of positive BRAF mutation, the decision should be made to do total thyroidectomy, lymphadenectomy and therapy with radioactive iodine.

Determination of BRAF mutation is an important factor for further management of thyroid papillary carcinoma,. Presence of BRAF mutation is associated with unfavourable prognosis and according to our study, BRAF antibody expression is increased with the increase of aggressiveness grade of thyroid nodular lesions.

Publications:

1. Distribution of thyroid pathologies in different age groups in Georgia__ Georgian Medical News, N-9(246), Sep. 2015, Pp 41-46.
2. Accurate diagnosis of thyroid nodules: a review of diagnostic dilemmas on thyroid fine-needle aspiration biopsies__Georgian Medical News- N-3(252), MMarch 2016, Pp 89-95.
3. BRAF antibody expression in the different types of thyroid nodular lesions __ Georgian Medical News_ N10 (271)oct 2017, Pp. 107-113.
4. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology: Hospital Based Study in Georgia----Students and young Scientists III International Scientific Conference, Tbilisi, Georgia, 2015
5. Morphomolecular diagnostics in thyroid cytology----41st European Conference of Cytology, Madrid, Spain, 2018

References:

1. Gharib H, Papini E et al. Thyroid nodules: Clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36:707–35.
2. L. S. Ward and H. Graf, et al. “Thyroid cancer: increased occurrence or simply its detection?” *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 52, no. 9, pp. 1515–1516, 2008.
3. M. P. Curado, B. Edwards, H. R. Shin et al. Cancer analysis (preliminary)_Final_cc72355e-f239-4f46-845c-cfb6e66b0996.pdf. *Cancer Incidence in Five Continents*, vol. 9 of IARC Scientific Publications, No. 160, IARC, Lyon, France, 2007.
4. Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, et al: Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol* 2007; 3:e225.
5. Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, et al: Patient age is significantly related to the progression of papillary microcarcinoma of the thyroid under observation. *Thyroid* 2014; 24: 27–34.
6. Gabriella Pellegriti,1 et al. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors *Journal of Cancer Epidemiology*. Volume 2013 (2013), Article ID 965212, 10 pages
7. Santarpia L, Sherman SI, Marabotti A, Clayman GL, El-Naggar AK et al. Detection and molecular characterization of a novel BRAF activated domain mutation in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum. Pathol.* 2009;40:827–833.
9. N. Howlader, N. N. A, M. Krapcho et al., Eds., *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations)*. 2012. *Eur Thyroid J* 2015;4:164–173
10. Haugen BR 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; 26:1-133.
11. J. Yang, V. et al, “Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations,” *Cancer*, vol. 111, no. 5, pp. 306–315, 2007.
12. G. V. Teixeira, et al, “Incidence of malignancy in thyroid nodules determined to be follicular lesions of undetermined significance on fine-needle aspiration,” *World Journal of Surgery*, vol. 36, no. 1, pp. 69–74, 2012.
13. Alexander EK. et al.: Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. *N Engl J Med* 2012.
14. Leina Zhao et al. Cytological, molecular, and Clinical Features of Non-

invasive Follicular Thyroid neoplasm with Papillary-like Nuclear features Versus Invasive forms of follicular variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Cytopath.* Volume 125/issue 5, 2017, pp 323

15. S.J. Kim et al. Risk of malignancy according to sub-classification of atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance (AUS/FLUS) category in Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Cytopathology*, volume 28, 2017, pp-65-73.

16. Nishino m. et al. Molecular Cytopathology for Thyroid nodules: areview of methodology and test performance. *Cancer Cytopathology* 2016, 124:14-27.

17. Kazakov VS, et al:Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 1992; 359: 21.

18. Baverstock K, et al: Thyroid cancer after Chernobyl.*Nature* 1992; 359: 21–22.

19. Cancer Genome Atlas Research Network: Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014; 159: 676–690.

20. Rabes HM, Demidchik EP, Siderov JD, et al:Pattern of radiation induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1093–1103.

21. Hamatani K, Eguchi H, Ito R, et al: RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose.*Cancer Res* 2008; 68: 7176–7182.

22. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, et al: Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2003; 115: 94–101.

23. Mingzhao Xing et.al BRAF Mutation Testing of Thyroid Fine-Needle Aspiration Biopsy Specimens for Preoperative Risk Stratification in Papillary Thyroid Cancer Published online before print May 4, 2009, doi:10.1200/JCO.2008.20.1426JCO June 20, 2009 vol. 27 no. 182977-298.

24. Adrienne L. Melck, et al. The Utility of BRAF Testing in the Management of Papillary Thyroid Cancer First published online in THE ONCOLOGIST Express on December 8, 2010.

25. Mesa C, Mirza M, Mitsutake N, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res* 2006;66:6521–6529

26. Ming Gao et.al. Progression of solitary and multifocal papillary thyroid

carcinoma- a retrospective study of 368 patient. Chinese medical journal vol.225.dec 20,2012

27. Hillary Kimbrell et.al. BRAF Testing in multifocal PTC. Hindawi Publishing Corporation. Vol 2015,ID 486391.

28. Seo ki kim, et al.BRAF mutation: Differential impact central lymph node metastasis by tumor size in PTC- Doi 10 1002/hed.24192, 2015, viley online library.

29. Espinosa A, Porchia L, Ringel M. et al. Targeting BRAF in thyroid cancer. Br. J. Cancer. 2007;96:16–20.

30. Sapio MR, et al. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. Endocr. Relat. Cancer. 2007;14:1089–1097.

31. Kumagai A, et al. Clinical implications of pre-operative rapid BRAF analysis for papillary thyroid cancer. Endocr. J. 2007;54:399–405.

Bonzanini

32. Nikiforov et.al. Nomenclature Revision for encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma. JAMA oncol.2016;2(8):1023-1029.

33. Castro-Gomez L, et al. Cytologic criteria of cystic papillary carcinoma of the thyroid. Acta Cytol 2003;47:590-4.

34. J. T. Broome et.al. “The impact of atypia/follicular lesion of undetermined significance on the rate of malignancy in thyroid fine-needle aspiration: evaluation of the Bethesda system for reporting thyroid cytopathology,” Surgery, vol. 150, no. 6, pp. 1234–1241, 2011.010.

35. Ho, Allen S et al. Malignancy Rate in Thyroid Nodules Classified as Bethesda Category III (AUS/FLUS).Thyroid;May2014, Vol. 24 Issue 5, p832

36. Barroeta JE et.al: Diagnostic value of differential expression of CK19, Galectin-3, HBME-1, ERK, RET, and p16 in benign and malignant follicular-derived lesions of the thyroid: an immunohistochemical tissue microarray analysis.Endocr Pathol 2006, 17:225-234.

37. M. M. Al-Shraim, O. M. Kaood, M. R. Hussein et al., “Assessment of malignancy rate in thyroid nodules according to the Bethesda system of fine-needle aspiration: report from a tertiary center in the Southwestern region of Saudi Arabia,” Saudi Medical Journal, vol. 33, no. 2, pp. 167–171, 2012

38. Harshan M, et al. Papillary thyroid carcinoma with atypical histiocytoid cells on fine-needle aspiration. Diagn Cytopathol 2009;37:244-50.

39. Y. Jo et al. Malignancy Risk for Fine-needle Aspiration of Thyroid Lesions according to the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology.Am J Clin Pathol. 2010;134(3):450-456.

40. Mondal et al, The Bethesda system for reporting thyroid fine needle

- aspirates: A cytologic study with histologic follow-up. *Cytol.* 2013 Apr-Jun; 30(2): 94–99.doi: 10.4103/0970-9371.112650
41. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO & Kang DY 2004 Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Medical Journal* 45 818–821.
 42. Nikiforov et.al. Nomenclature Revision for encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *JAMA oncol.* 2016;2(8):1023–1029.
 43. Lupi C. et.al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92:4085–4090.
 44. Rossi ED, et al. Braf mutation analysis on LBC-processed aspiration biopsies predict bilaterality and nodal involvement in Papillary Thyroid microcarcinoma. *Cancer Cyt.* 2013;121;291–297
 45. Finkelstein A, Levy GH, Hui P, et al. Papillary thyroid carcinomas with and without BRAF V600E mutations are morphologically distinct. *Histopathology* 2012;60:1052–1059.
 46. Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:625–627.
 47. Koperek O, Asari R, Niederle B, et al. Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma. *Histopathology* 2011;58:919–924.
 48. Kwak JY, Kim EK, Chung WY, et al. Association of BRAFV600E mutation with poor clinical prognostic factors and US features in Korean patients with papillary thyroid microcarcinoma. *Radiology* 2009;253:854–860
 49. G.Fadda et al. Morphological Features that can predict BRAF-mutated carcinoma in pediatric thyroid cytology. *Cytopathology.* Volume 28, Issue1, February 2017.
 50. Gisele Oler MSc, Janete M. Cerutti et al. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas† 17 January 2009
 51. Adrienne L. Melck. The Utility of BRAF Testing in the Management of Papillary Thyroid Cancer. *Oncologist.* 2010Dec;15(12):1285–1293. Published online 2010 Dec 8.
 52. Nikiforova MN, Nikiforov YE et al. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19:1351–1361.