

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.313>
<https://orcid.org/0000-0002-9926-0528>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Romena Laukienė

Skyd liaukės karcinomų miRNR analizė ir prognostinė vertė

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicinos kryptis (M 001)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2016-2021 metais Vilniaus universitete Medicinos fakultete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Loreta Cimbalistienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.313>
<https://orcid.org/0000-0002-9926-0528>

VILNIUS UNIVERSITY

Romena Laukienė

miRNA expression analysis and prognostic significance in thyroid carcinomas

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health sciences,
Medicine (M 001)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2016 and 2021 in Vilnius University Faculty of Medicine.

The research was supported by Research Council of Lithuania.

Scientific supervisor: Prof. Dr. Loreta Cimbalistienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Academic consultant: Prof. Dr. Algirdas Utkus (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

TURINYS

1. SANTRUMPOS	8
2. ĮVADAS	10
2.1. Darbo aktualumas	10
2.2. Darbo tikslas	12
2.3. Darbo uždaviniai	12
2.4. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė	12
2.5. Ginamieji disertacijos teiginiai	13
3. LITERATŪROS APŽVALGA	14
3.1. Skydliaukės mazgai	14
3.2. Skydliaukės karcinoma (SK)	19
3.3. Diferencijuotos skydliaukės karcinomos patogenezė	20
3.4. Papilinė skydliaukės karcinoma (PSK)	22
3.4.1. Klinikiniai patologiniai papilinės skydliaukės karcinomos agresyvumo – prognostiniai veiksniai	25
3.4.2. Molekuliniai genetiniai papilinės skydliaukės karcinomos diagnostiniai žymenys	27
3.4.3. Molekuliniai genetiniai papilinės skydliaukės karcinomos prognostiniai žymenys	29
3.5. miRNR	31
3.5.1. miRNR biogenezė	31
3.5.2. miRNR funkcijos	33
3.5.3. miRNR vaidmuo onkologijoje	34
3.5.4. miRNR – skydliaukės karcinomos diagnostinis veiksnys	35
3.5.5. miRNR - skydliaukės papilinė karcinomos metastazavimo į kaklo limfmazgius rizikos veiksnys	37
4. DARBAI DISERTACIJOS TEMA	42
4.1. Straipsniai disertacijos tema	42
4.2. Pranešimai disertacijos tema	42
4.2.1. Žodiniai pranešimai	42
4.2.2. Stendiniai pranešimai	43

5. DARBO METODOLOGIJA	44
5.1. Tyrimo organizavimas.....	44
5.2. Tiriamieji asmenys	44
5.2.1. Tiriamųjų asmenų įtraukimo į tyrimą kriterijai	44
5.2.2. Tiriamųjų asmenų grupės:	44
5.3. Asmenų pakvietimo dalyvauti tyrime procedūra	45
5.4. Biomedicininio tyrimo duomenų rinkimo etapai	46
5.4.1. Tyrimo etapas iki operacijos	46
5.4.2. Tyrimo etapas po operacijos.....	47
5.5. Procedūros	47
5.5.1. Skyd liaukės mazgų citologinių mėginių paėmimas	47
5.5.2. Citologinis skyd liaukės mazgo aspirato tyrimas	47
5.5.3. Chirurginis gydymas	48
5.5.4. RNR išskyrimas.....	48
5.5.5. miRNR raiškos nustatymas naujos kartos sekoskaitos metodu skyd liaukės mazgų mėginiuose	48
5.5.6. Pasirinktų miRNR ištyrimas RL-PGR metodu pacientų skyd liaukės mazgų mėginiuose.....	49
5.6. Statistinė duomenų analizė.....	49
6. TYRIMO REZULTATAI	51
6.1. Tyrimo imties sudarymas. Bendrieji demografiniai tiriamųjų požymiai	51
6.2. I etapas. miRNR ištyrimas naujos kartos sekoskaitos metodu	55
6.2.1. Bendrieji demografiniai – klinikiniai pacientų duomenys	55
6.2.2. miRNR raiškos ištyrimo naujos kartos sekoskaitos metodu rezultatai	57
6.3. II etapas. miRNR raiškos pokyčių patvirtinimas realaus laiko PGR metodu.....	59
6.3.1. Bendrieji demografiniai – klinikiniai pacientų duomenys.	59
6.3.2. Parinktų miRNR raiškos pokyčių patvirtinimo RL-PGR metodu rezultatai	63
REZULTATŲ APTARIMAS	82

IŠVADOS.....	88
REKOMENDACIJOS.....	89
LITERATŪROS SAĀRAŠAS.....	90
PRIEDAI	106

1. SANTRUMPOS

ASP – aspiracinė skydliaukės punkcija
AUC – plotas po kreive (angl. *area under the curve*)
BRAF – B tipo *RAF* kinazė (angl. *B-type Raf kinase*)
CKLM – centriniai kaklo limfmazgiai
Ct – slenkstinis ciklas
DKT – daugiasluoksnė kompiuterinė tomografija
DNR – deoksiribonukleorūgštis
DSK – diferencijuota skydliaukės karcinoma
EU-TIRADS – Europos skydliaukės vaizdinimo protokolo ir duomenų sistema (angl. *European Thyroid Imaging Reporting and Data System*)
FSK – folikulinė skydliaukės karcinoma
IQR – kvartilų skirtumas (angl. *interquartile range*)
iRNR – informacinė ribonukleorūgštis
kDNR – kopijinė deoksiribonukleorūgštis
KLM – kaklo limfmazgiai
LM – limfmazgiai
LKLM – lateraliniai kaklo limfmazgiai
MAPK – mitogeno aktyvuota proteinkinazė
MKLM – metastazės kaklo limfmazgiuose
MCKLM – metastazės centriniuose kaklo limfmazgiuose
miRNR – mikro ribonukleorūgštis
MLKLM – metastazės lateralinuose kaklo limfmazgiuose
MRT – magnetinio rezonanso tomografija
MTS – metastazės
NIFTP – neinvazinė folikulinė skydliaukės neoplazija su papildomam navikui būdingais branduolio pakitimais (angl. *noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary like nuclear features*)
NKS – naujos kartos sekoskaita
NPV – neigiama prognostinė vertė
NSM – nepiktybiniai skydliaukės mazgai
OnkomiR – onkogeninė miRNR
OR – šansų santykis (angl. *odds ratio*)
PAX8 genas – porinis genas 8 (angl. *Paired Box Gene 8*)
PI – pasikliautinis intervalas
PI3-AKT – fosfatidilinositolio 3 kinazė/proteinkinazė B (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/Protein Kinase B*)
PPAR γ – Peroksisomų proliferatoriaus aktyvinto γ receptorius

PSK – papilinė skydliaukės karcinoma
PSMK – papilinė skydliaukės mikrokarcinoma
pre-miRNR – nesubrendusi miRNR
pri-miRNR – miRNR pirminis transkriptomas
RISC – RNR-indukuotas nutildymo kompleksas (angl. *RNA-induced silencing complex*)
RL-PGR – realaus laiko polimerazės grandininė reakcija
SN – standartinis nuokrypis
SK – skydliaukės karcinoma
TPV – teigiama prognostinė vertė
TTH – tireotropinis hormonas
UGT – ultragarsinis tyrimas
VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

2. ĮVADAS

2.1. Darbo aktualumas

Skyd liaukės karcinoma (SK) yra dažniausias endokrininės sistemos piktybinis navikas [1]. Du histologiniai diferencijuotos skyd liaukės karcinomos (DSK) potipai: papilinė skyd liaukės karcinoma (PSK) ir folikulinė skyd liaukės karcinoma (FSK) išsivysto iš folikulinių skyd liaukės epitelio ląstelių ir sudaro apie 94 % visų skyd liaukės karcinomų [2]. SK dažnis per pastaruosius 20 metų visame pasaulyje smarkiai išaugo ir tikėtina, kad iki 2030 metų SK bus ketvirta pagal dažnumą piktybinių navikų forma [3]. SK dažnio didėjimą išskirtinai lemia PSK atvejų skaičiaus augimas [4][5]. Ultragarsono ištyrimo pažanga pagerina ankstyvą skyd liaukės karcinomos nustatymą, tačiau atsiranda ir hiperdiagnostikos galimybė, kuri lemia nereikalingą, agresyvią operaciją ir su ja susijusias pooperacines komplikacijas, bloginančias pacientų gyvenimo kokybę [6]. Tarptautinės profesinės organizacijos, įskaitant Europos skyd liaukės asociaciją [7], Amerikos skyd liaukės asociaciją [8] ir Amerikos radiologijos kolegiją [9], parengė skyd liaukės mazgų rizikos stratifikavimo kriterijus, kuriais vadovaujamasi atliekant ultragarasinį skyd liaukės mazgų ištyrimą ir gydant skyd liaukės mazgus [10]. Ultragarso tyrimas ir plonos adatos aspiracinė biopsija yra „auksinis standartas“ diferencijuojant nepiktybinius skyd liaukės mazgus nuo piktybinių. Aspiracinės punkcinės biopsijos rezultatai pateikiami pagal *Bethesda* skyd liaukės citopatologijos sistemą, pasižyminčią dideliu diagnostiniu specifiškumu [11]. Nepaisant to, 10-20 % skyd liaukės mazgų po atlikto citologinio įvertinimo lieka neapibrėžti [12]. Tai lemia santykinai didelį diagnostinių operacijų skaičių.

Nors sergamumas PSK nuolat auga, mirtingumas nuo skyd liaukės karcinomos per pastaruosius penkis dešimtmečius pasikeitė minimaliai [13]. Paprastai PSK prognozė yra gera, mirtingumas santykinai žemas, tačiau nedidelei daliai pacientų pasireiškia agresyvi ligos forma, su naviko invazija į aplinkinius audinius, metastazėmis [14]. Metastazės kaklo limfmazgiuose (MKLM) dažnai stebimos jau ankstyvoje ligos stadijoje. Paprastai PSK metastazuoja į centrinius kaklo limfmazgius (CKLM), rečiau į lateralius kaklo limfmazgius (LKLM). MKLM sąlygoja dažnesnę lokalų SK recidyvą, kas yra blogesnės ligos prognozės rodiklis [15][16][17]. Tiek ultragarso kaklo LM ištyrimas, tiek daugiasluoksnė kompiuterinė tomografija (DKT) ar magnetinio rezonanso tomografija (MRT), nepadedą pilnai nustatyti

navikinio proceso išplitimo iki operacijos [18]. Aiškūs limfmazgių struktūriniai ir dydžio pokyčiai dažniausiai diagnostinių sunkumų nesukelia. Labiau komplikauta situacija su mažomis iki 1cm dydžio MKLM. Neretai dėl specifinių požymių nebuvimo, net ir preciziškai DKT ir MRT tyrimais vertinant LM trumpąją ašį, jo struktūrą, ribas, kontrastinio preparato kaupimo pobūdį bei šalia naviko esančias audinių struktūras, tiksliai įvertinti mažų MKLM nepavyksta. Tai trukdo iki operacijos tiksliai nustatyti ligos stadiją.

Kinijos tyrėjų atliktos meta analizės duomenys parodė, kad ultragarsinio tyrimo specifiškumas diagnozuojant MCKLM yra 93 %, kai tuo tarpu jautrumas tik 33 %, diagnozuojant MLKLM atitinkamai 84 % ir 70 % [19]. Daugiausia diagnostinių problemų kelia retrofaringinių ir mediastinalinių CKLM verifikavimas. Histologiškai diagnozuojama net iki 60 % MKLM, kurios iki operacijos nebuvo nustatytos vaizdinimo tyrimais [20].

Amerikos skydliaukės asociacijos tarptautinės gairės [21] pacientams, kuriems iki operacijos yra nustatomi pakitimai kaklo limfmazgiuose, rekomenduoja atlikti CKLM pašalinimą. Tačiau profilaktinės CKLM pašalinimo operacijos svarba yra kontraversiška [8]. Nors profilaktinė CKLM limfadenektomija sumažina lokalaus PSK recidyvo riziką, tačiau padidina pooperacinių komplikacijų, tokių kaip praeinančio ar pastovaus gerklų grįžtamojo nervo pažeidimo, praeinančios ar pastovios hipokalcemijos tikimybę [22].

Todėl labai svarbu iki operacijos identifikuoti onkologinio proceso išplitimą, kas leistų parinkti optimalų ir individualų PSK gydymą, lemiantį mažesnę skydliaukės karcinomos recidyvavimo riziką. Kadangi turimais vaizdinimo tyrimais tiksliai diagnozuoti PSK išplitimo nepavyksta, ieškoma kitų klinikinių pataloginių rizikos veiksnių. Atliktų meta analizių duomenys parodė, kad vyriška lytis, jaunas amžius (<45 metų), pirminio naviko dydis, daugiažidiniškumas bei plitimas už skydliaukės ribų galėtų būti nepriklausomi metastazavimo į kaklo limfmazgius rizikos veiksniai [23][24]. Tačiau ir to nepakanka, svarbi naujų biožymenų, galinčių padėti diferencijuoti nepiktybinius skydliaukės mazgus nuo piktybinių, taip pat leidžiančius nustatyti ligos progresavimą ir tinkamą gydymo parinkimą, paieška.

Mikro ribonukleorūgštis (miRNR) yra nekoduojančių nukleorūgščių molekulės, reguliuojančios genų transliaciją ar produktų degradavimą ir

dalyvaujančios įvairiuose ląstelių funkcijas reguliuojančiuose procesuose. Mokslinių tyrimų duomenimis miRNR raiškos pokyčiai nustatomi įvairių ligų, taip pat ir vėžio, patogenezės mechanizmuose. Todėl svarbu identifikuoti miRNR reikšmę diferencijuotos skydliaukės karcinomos diagnozės ir metastazinių kaklo limfmazgiuose nustatymui.

2.2. Darbo tikslas

Įvertinti miRNR raiškos reikšmę papildinės skydliaukės karcinomos diagnostikai ir ligos išplitimui prognozuoti.

2.3. Darbo uždaviniai

1. Nustatyti miRNR raišką skydliaukės mazgų plonos adatos aspiratuose, kuriuose yra įtariama PSK.
2. Palyginti miRNR raiškos įverčius piktybinių ir nepiktybinių skydliaukės mazgų ląstelėse.
3. Įvertinti miRNR raiškos sąsajas su klinikiniais patologiniais PSK požymiais.
4. Palyginti miRNR raišką skydliaukės mazgų aspiratuose tiriamiesiems, kuriems buvo nustatytos PSK metastazės kaklo limfmazgiuose ir, kuriems nebuvo nustatytos metastazės kaklo limfmazgiuose.

2.4. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Klinikinėje praktikoje gydytojai susiduria su iššūkiu subalansuoti papildinės skydliaukės karcinomos gydymo taktiką taip, kad mažesnę skydliaukės karcinomos riziką turintys pacientai nebūtų gydomi pernelyg agresyviai. Kartu jie turi identifikuoti pacientus, kurių liga yra labiau pažengusi, kuriems gresia didelė recidyvavimo rizika ir kuriems reikalingas agresyvesnis gydymo metodas. Todėl svarbu ieškoti naujų biožymenų, kurie padėtų tiksliau diagnozuoti skydliaukės karcinomą ir įvertinti ligos išplitimą prieš operaciją. Yra atlikta tyrimų, kurie parodo, kad kai kurios miRNR gali būti potencialūs biožymenys navikinio proceso metastazavimui prognozuoti, pvz.: miR21 krūties karcinomos [25]; miR21 ir miR31 storžarnės karcinomos [26] bei miR1207-5p skrandžio karcinomos atveju [27]. miRNR ryšį su PSK metastazavimu į kaklo limfmazgius nagrinėjančios publikacijos pasirodė 2010 metais [28]. Nors yra atlikta nemažai darbų, nagrinėjančių įvairių miRNR pritaikymą PSK diagnostikai, ligos progresavimo bei recidyvo

rizikai, tačiau iki šiol paskelbti duomenys yra prieštaringi. Dauguma tyrimų buvo atlikta Kinijoje. Lietuvoje darbų, tyrinėjančių miRNR sąsaja su PSK, nedaug [29][30][31].

Pasirinkta mokslinio darbo tema turėtų praktinį klinikinį pritaikymą. miRNR raiškos analizė skydliaukės plonos adatos aspiraciniuose mėginiuose gali pagerinti pacientų priešoperacinį ištyrimą, kas leistų parinkti tinkamą gydymo taktiką, operacinių sprendimų priėmimą. Tai leistų sumažinti pooperacinių komplikacijų skaičių ir pagerintų pacientų gyvenimo kokybę.

2.5. Ginamieji disertacijos teiginiai

1. miRNR raiška skydliaukės plonos adatos aspiratuose reikšmingai skiriasi tarp piktybinių ir nepiktybinių skydliaukės mazgų.
2. miRNR raiška skydliaukės plonos adatos aspiratuose reikšmingai skiriasi tarp skirtingus patologinius požymius turinčių papilinės skydliaukės karcinomų.
3. miRNR raiška skydliaukės papilinės karcinomos plonos adatos aspiratuose reikšmingai skiriasi tarp tiriamųjų, kuriems diagnozuotos metastazės kaklo limfmazgiuose ir, kuriems metastazės kaklo limfmazgiuose nenustatytos.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. Skyd liaukės mazgai

Tiek pavieniai, tiek daugybiniai skyd liaukės mazgai yra dažnas radinys klinikinėje praktikoje. Dažnesniam skyd liaukės mazgų atsiradimui įtakos turi moteriška lytis, amžius, jonizuojanti spinduliuotė bei jodo trūkumas. Mazgų paplitimo dažnis priklauso nuo tirtos populiacijos ir nuo naudoto tyrimo metodo. Diagnozuojant skyd liaukės mazgus palpaujant, jų paplitimas – 2-6 %, tiriant ultragarsu – 19-35 %, autopsijos metu randama iki 65 % [5]. Plačiai klinikinėje praktikoje taikant jautrius vaizdinimo tyrimus (kompiuterinę tomografiją, magnetinį rezonansą, pozitronų emisijos tomografiją ir kt.) vis dažniau skyd liaukės mazgai diagnozuojami atsitiktinai [32]. Skyd liaukės mazgus gali sąlygoti tiek nepiktybiniai, tiek piktybiniai susirgimai, todėl, nustačius mazgus, svarbu atmesti piktybinius pakitimus, kurie diagnozuojami nuo 7 iki 15 % atvejų [33].

Išsami ligos istorija, paciento apžiūra, laboratoriniai tyrimai, kaklo ultragarsinis tyrimas (UGT) ir, esant indikacijoms, plonos adatos aspiracinė skyd liaukės punkcija (ASP), padeda atskirti mažos ir didelės skyd liaukės karcinomos rizikos grupes.

Veiksniai didinantys piktybiškumo riziką pateikti 1-oje lentelėje [21].

Didelės skiriamosios gebos kaklo UGT yra jautriausias tyrimo metodas, naudojamas nustatyti ir išmatuoti mazginius pakitimus skyd liaukėje, diferencijuoti skyd liaukės mazgus nuo kitos kilmės kakle esančių patologinių darinių bei įvertinti difuzinius skyd liaukės audinio pokyčius [34].

2017 metais Europos skyd liaukės asociacija, remiantis literatūros duomenimis, įvairių tarptautinių organizacijų (Amerikos klinikinių endokrinologų asociacijos, Amerikos skyd liaukės asociacijos bei Korėjos skyd liaukės asociacijos) rekomendacijomis, išleido skyd liaukės mazgų piktybiškumo rizikos stratifikavimo gaires EU-TIRADS (angl. *European Thyroid Imaging Reporting and Data System*) (2 lentelė) [7].

Skyd liaukės mazgų ASP kontroliuojant ultragarsu ir citologinis aspirato ištyrimas yra „auksinis standartas“ skyd liaukės karcinomos diferencinėje diagnostikoje.

1 lentelė. Skyd liaukės karcinomos riziką didinantys veiksniai

Anamnezė	<ul style="list-style-type: none">• Vaikystėje apšvita galvos-kaklo srityje• Viso kūno apšvita prieš kaulų čiulpų transplantaciją• Kitu būdu gauta jonizuojanti spinduliuotė (pvz., aknės ar apgamų gydymas, darbas su jonizuojančia spinduliuote)• Pirmos eilės giminaičiams diagnozuotas piktybinis skyd liaukės susirgimas arba skyd liaukė karcinomos sindromas (pvz., <i>Cowden</i> sindromas, <i>Carney</i> kompleksas, dauginė endokrininė neoplazija 2 tipas, šeiminė polipozė)• Vyriška lytis• Amžius <20 arba >70 metų
Apžiūra	<ul style="list-style-type: none">• Kaklo limfadenopatija• Balso užkimimas• Kieta mazgo konsistencija• Nepaslankus mazgas
Laboratoriniai ir instrumentiniai tyrimai	<ul style="list-style-type: none">• Skyd liaukę stimuliuojantis hormonas – tireotropinis hormonas (TTH) ties viršutine riba ar padidėjęs• Ultragarsiniai požymiai: mazgo solidiškumas, hipoechogeniškumas, mazgas “labiau aukštas nei platus”, mikrokalcinatai, nelygūs mazgo kraštai, įtartinais pakitę limfmazgiai)• Ne „karštas“ mazgas skenuojant su ⁹⁹Tc• Aktyvūs mazgai pozitronų emisijos tomografijoje• Serumo kalcitoninas >50-100 pg/ml

2 lentelė. EU-TIRADS kategorijos ir piktybiškumo rizika

<i>Kategorija</i>	<i>Ultragarsinio tyrimo požymiai</i>	<i>Piktybiškumo rizika %</i>
EU-TIRADS 1: norma	Nėra mazgų	Nėra
EU-TIRADS 2: nepiktybiniai mazgai	Cista „Kempinės“ struktūros mazgai	~0
EU-TIRADS 3: žema rizika	Ovalūs, izoechogeniški/hiperechogeniški Nėra aukšto piktybiškumo požymių	2-4
EU-TIRADS 4: vidutinė rizika	Ovalūs, švelniai hipoechogeniški Nėra aukšto piktybiškumo požymių	6-17
EU-TIRADS 5: aukšta rizika	Turi bent vieną iš aukšto piktybiškumo požymių: Neovali, netaisyklinga forma (ilgesnis statmenas kūno paviršiui mazgo matmuo) Nelygūs kraštai Mikrokalcinatai Ryškiai hipoechogeniškas (ir solidinis)	26-87

Nustačius žemą TTH koncentraciją, prieš atliekant ASP, mazgų funkciniam aktyvumui įvertinti rekomenduojama atlikti skydliaukės radionuklidinį skenavimą. Tam gali būti naudojamas jodo¹²³ izotopas (I-123) arba natrio pertechnetas (⁹⁹Tc) [34].

Remiantis radionuklidų kaupimu, mazgai gali būti klasifikuojami į hiperfunkcionuojančius („karštus“), hipofunkcionuojančius („šaltus“) ar tarpinius („šiltus“). Kliniškai reikšmingi piktybiniai pakitimai beveik niekada nebūna „karštuose“ mazguose, tačiau „šaltuose“ ar „šiltuose“ mazguose piktybinių pakitimų dažnis svyruoja nuo 3 iki 15 % [35].

Indikacijos aspiracinei skydliaukės mazgų punkcijai [7]:

EU-TIRADS 2 – gerybiniai mazgai. Cistos ir „kempininės“ struktūros mazgai. Tokie mazgai vertinami kaip gerybiniai ir ASP nėra indikuotina. Cistos ASP gali būti atliekama terapiniu tikslu, esant spaudimo simptomams

į gretimas struktūras.

EU-TIRADS 3 – žemos piktybiškumo rizikos mazgai. ASP atliekama, jei mazgas didesnis nei 2 cm.

EU-TIRADS 4 – vidutinio piktybiškumo rizikos mazgai.

Šios kategorijos mazgai punktuojami, jei mazgas didesnis nei 1,5 cm.

EU-TIRADS 5 – aukštos piktybiškumo rizikos mazgai. Visi šios kategorijos virš 1 cm dydžio mazgai turi būti ištirti citologiškai. Gavus citologinio tyrimo išvadą, kad mazgas yra gerybinis, siekiant išvengti klaidingai neigiamų tyrimų, rekomenduojama pakartoti ASP 3 mėn. laikotarpiu.

Iki 1 cm EU-TIRADS 5 kategorijos mazgai turi būti aktyviai stebimi. Mazgai didėjant, atsiradus plitimui už skydliaukės ribų ar atsiradus patologiškai pakitusiam limfmazgiui, atliekama ASP.

ASP rezultatai turėtų būti klasifikuojami į diagnostinius (pakankamus) ir nediagnostinius (nepakankamus). Mėginys „diagnostiniu“ vadinamas tuomet, kai jame yra ne mažiau nei 6 gerai išsilaikiusios skydliaukės epitelio ląstelių grupės, kurių kiekviena sudaryta iš ne mažiau nei 10 ląstelių, arba randamas gausus koloidas.

Citologinė diagnozė skirstoma į šešias kategorijas naudojant *Bethesda* sistemą [11].

I Bethesda kategorija – neinformatyvi (nediagnostinė).

Mėginiai žymimi kaip „nediagnostiniai“ tuomet, jei juose nėra pakankamo skydliaukės ląstelių skaičiaus. Ši citologinė diagnozė gali būti dėl storo tepinėlio, dėl blogos preparatų paruošimo technikos ir dėl to blogai išsilaikiusios diagnostinės medžiagos. Jeigu mėginiuose dominuoja makrofolikulai, stebimas gausus ir vandeningas koloidas, tokius mėginius leidžiama priskirti gerybiniais, nors ir nesant 6-ioms ląstelių grupėms. Išskiriamas pogrupis – limfocitinis tiroiditas, kuris taip pat vertinamas kaip nepiktybinis. Mėginiai, kuriuose yra tik cistinis komponentas, vertinami kaip neinformatyvūs, tačiau reikia vertinti koreliaciją su ultragarsiniu vaizdu. Šios kategorijos piktybiškumo rizika – 5-10 %. Rekomenduojama kartoti ASP – pakartotinos punkcijos laikas parenkamas individualiai.

II Bethesda kategorija – nepiktybiniai pokyčiai. Nepiktybiniai citologiniai radiniai būdingi koloidiniams, hiperplastiniams mazgams, gerybinėms cistoms arba esant limfocitiniams ar granuliuotiniams tiroiditui. Šios citologinės diagnozės mazgo piktybiškumo tikimybė yra 0-3 %.

III Bethesda kategorija – nenustatytos reikšmės folikulinio epitelio atipija. Ši kategorija nustatoma tuomet, kai aptinkamos ląstelės (folikulinės,

limfoidinės eilės ar kitos) su architektonine ar branduolio atipija, tačiau jos negali būti klasifikuojamos kaip piktybinis navikas ar folikulinė neoplazija ar jų įtarimas. Atipija yra taip pat per didelė, kad pakitimus būtų galima vertinti kaip nepiktybinius. Ši kategorija nustatoma apie 7 % ASP mėginių. Piktybiškumo rizika siekia 10-30 %. Rekomenduojama kartoti ASP, atlikti molekulinis genetinius tyrimus ar lobektomiją.

IV Bethesda kategorija – folikulinė neoplazija arba folikulinės neoplazijos įtarimas. Folikulinėms neoplazijoms priskiriami visi mėginiai, kuriuose randamos gausios mikrofolikulai besidėstančios folikulinio epitelio ląstelės su išreikštu branduolių persidengimu. Neženklūs branduolių atipijos požymiai, būdingi papilinei karcinomai leidžiami šioje kategorijoje. Folikuliniai pokyčiai gali būti randami atliekant ASP iš adenomatozinės hiperplazijos židinių, folikulinės adenomos ir karcinomos, *Hürthle* ląstelių adenomos arba karcinomos [36]. Folikuliniai pokyčiai mėginyje matomi kaip gausus kiekis vienodų ląstelių, išsidėsčiusių mikrofolikulinėmis struktūromis, sumažėjęs koloido kiekis arba jo visai nėra. *Hürthle* ląstelių neoplazijos diagnozuojamos tuomet, kai aspirate randamos beveik vien tik *Hürthle* ląstelės, dažniausiai be ar su menku koloido kiekiu, tačiau nėra limfoidinių ląstelių, būdingų lėtiniam autoimuniniam tiroiditui. Folikulinės adenomos pakitimai gali būti atskirti nuo folikulinės skydliaukės karcinomos tik remiantis kapsulės peraugimu ir kraujagysline invazija, todėl tiksli diagnostika remiantis citologiniu tyrimu nėra galima. Piktybiškumo rizika siekia 25-40 %. Rekomenduojami molekuliniai genetiniai tyrimai, lobektomija.

V Bethesda kategorija – piktybinio naviko įtarimas. Didelės rizikos neapibrėžtos reikšmės citologinių pokyčių kategorija, kuriai priskiriami atvejai, turintys piktybiniam procesui būdingų citologinių požymių, tačiau šie požymiai nėra pakankami, kad atvejis būtų priskirtas VI kategorijai. Piktybiškumo rizika – 50-75 %. Rekomenduojama atlikti tiroidektomiją ar lobektomiją.

VI Bethesda kategorija – piktybinis navikas. Šiai kategorijai priskiriami atvejai, kai įtariama papilinė karcinoma, anaplastinė karcinoma, medulinis karcinoma, limfomos, metastatiniai navikai. Piktybiškumo rizika – 97-99 %. Rekomenduojamas operacinis gydymas – tiroidektomija.

Nors ASP su citologiniu tiriamosios medžiagos įvertinimu yra „auksinis standartas“ skydliaukės karcinomos diferencinėje diagnostikoje, tačiau šis ištyrimas turi ir trūkumų. Didžiausias trūkumas yra III ir IV *Bethesda* kategorijos, kurios patenka į „pilkąją“ neapibrėžtą diagnostinę zoną, kai nėra

atsakoma į klausimą, ar procesas yra piktybinis, ar nepiktybinis. Net apie 25 % citologinių mėginių būtent patenka į neapibrėžtą kategoriją, kur piktybiškumo dažnis varijuoja nuo 14 iki 48 % [37][38]. Siekiant išvengti nereikalingo operacinio gydymo, vis ieškoma būdų kaip tiksliau atskirti piktybinius pakitimus nuo nepiktybinių, kuriems būtent toks gydymas reikalingas.

3.2. Skydliaukės karcinoma (SK)

SK – dažniausia onkologinė endokrininės sistemos liga. Ji sudaro apie 1 % visų piktybinių navikų [2]. Sergamumas skydliaukės piktybiniais susirgimais pasaulyje yra 10,2/100000 moterų ir 3,10/100000 vyrų [39]. Sergamumo skaičius visame pasaulyje ir toliau didėja, vis plačiau klinikinėje praktikoje taikant vaizdinimo tyrimus ir aktyvų pacientų stebėjimą [13]. SK yra penktas dažniausiai pasitaikantis piktybinis navikas moterų tarpe Jungtinėse Amerikos valstijose, o bendras naujų susirgimų skaičius šioje šalyje 2020 metais siekė 52 890 atvejus [40]. Nacionalinio vėžio instituto duomenimis 2015 metais Lietuvoje bendras naujų skydliaukės vėžio susirgimų skaičius buvo 344 atvejai, iš jų 282 atvejai nustatyti moterims ir 62 atvejai – vyrams. SK histologiniai tipai [41]:

- Diferencijuota skydliaukės karcinoma:
 - ✓ Papilinė skydliaukės karcinoma
 - ✓ Folikulinė skydliaukės karcinoma
 - ✓ Blogai diferencijuota skydliaukės karcinoma
 - ✓ *Hurthle* ląstelių karcinoma
- Medulinė karcinoma
- Anaplastinė karcinoma
- Kiti piktybiniai navikai – limfoma, angiosarkoma ir kt.

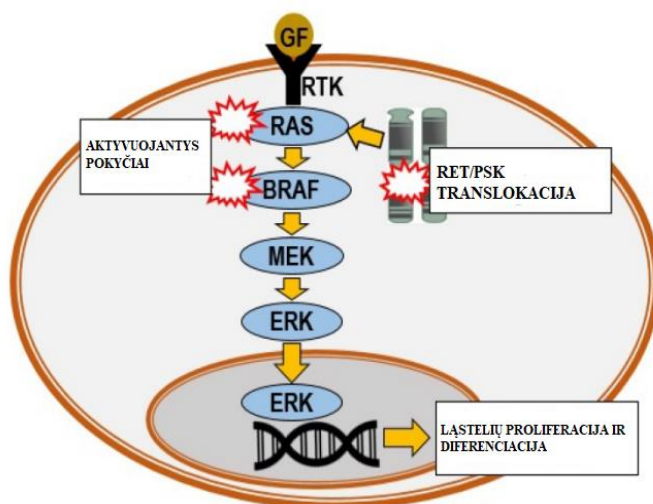
Dažniausiai pasitaikantis SK histologinis tipas yra diferencijuota skydliaukės karcinoma, kurios 85 % sudaro PSK ir 12 % FSK. Retesnė yra medulinė karcinoma, sudaranti apie 2 % visų SK. Rečiausia – anaplastinė karcinoma <1% visų SK. Bendrai paėmus, SK prognozė yra puiki. Penkių metų bendras išgyvenamumas siekia 96,1 %, o pacientų vienu metų išgyvenamumas po diagnozės nustatymo – 98,2 % [42]. Gerą prognozę labiausiai lemia PSK, mažiau palankios kitų SK histologinių variantų prognozės [33].

3.3. Diferencijuotos skydliaukės karcinomos patogenezė.

Daug tyrimų, atliktų per paskutinį dešimtmetį, pagilino žinias apie skydliaukės karcinomos molekulinę patogenezę.

BRAF pokyčio ir mitogeno aktyvios proteinkinazės (MAPK) kelias

BRAF protoonkogenas, koduojantis baltymą – serino-treonino kinazę, priklausančią baltymų *RAF* šeimai, kuri dalyvauja signalo perdavime *MAPK* kelyje. *MAPK* yra tarpląstelinio signalo perdavimo kelias yra svarbus užtikrinant ląstelių augimą, proliferaciją, apoptozę ir diferenciaciją. *BRAF* pokytis potencialiai aktyvuoja šį kelią. Viena iš geriausiai ištirtų genų pokyčių, turinčių svarbų vaidmenį skydliaukės karcinogenezėje yra *BRAF* geno pokytis [43]. Taškinis *BRAF-V600E* pokytis lemia nuolatinę serino-treonino kinazės aktyvaciją, kuri aktyvina kancerogeninį *MAPK* signalo perdavimo kelią (1 paveikslas). Šių taškinių pokyčių dažnis gali siekti iki 90 %, bet vidutiniškai nustatoma iki 45 % PSK atvejų [44]. *BRAF-V600E* pokytis nėra nustatoma nepiktybiniuose skydliaukės mazguose.



1 pav. Kancerogeninio MAPK signalo perdavimo kelio aktyvavimas [54].

Signalo perdavimo kelio aktyvavimas prasideda augimo faktoriui (AF) prisijungus prie tirozinkinazės receptoriaus (RTK), kuris aktyvuoja *RAS*, *BRAF*, *MEK* ir *ERK* fosforilinimo kaskadą. *MEK*: *MAPK* kinazė, *ERK*: ekstracelulinį signalą reguliuojanti kinazė.

RAS pokytis ir fosfatidilinositolio 3 kinazės/proteinkinazės B (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/Protein Kinase B*) (*PI3-AKT*) kelias

RAS pokytis yra antras pagal dažnį aptinkamas DSK pokytis [44].

RAS dar viena genų šeima koduojanti baltymus, kurie dalyvauja signalo perdavimo sistemoje ląstelės viduje. *RAS* genai koduoja fermentus – guanozintrifosfato kinazes (GTFazės). GTFazės yra didelė fermentų hidrolazių šeima, kuri jungiasi su nukleotidu guanozino trifosfatu (GTF) ir hidrolizuoja jį iki guanozino difosfato (GDF). *RAS* baltymas yra aktyvus, kai yra susijungęs su GTF. GTFazei GTF hidrolizavus iki GDF, *RAS* baltymas susijungęs su GDF pasidaro neaktyvus, tokiu būdu sustabdomas signalo perdavimas į ląstelės branduolį.

Įvykus pokyčiui *RAS* gene, GTFazės būna neaktyvi, tokiu būdu *RAS* baltymas pasidaro pastoviai aktyvus. Yra trys *RAS* baltymų izoformos – *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*. Skyd liaukės karcinomos atveju pokytis dažniausiai įvyksta *NRAS* gene.

Nors *RAS* gali aktyvinti tiek *MAPK*, tiek *PI3-AKT* kelius, tačiau, esant šiam pokyčiui, pastarojo aktyvinamas yra svarbesnis. *PI3-AKT* signalinis kelias dominuoja folikulinėse neoplazijose, įskaitant FSK, kas nulemia naviko invaziškumą ir metastazavimą [45].

RET/PSK translokacija

RET protoonkogenas koduoja ląstelės membranos receptoriaus tirozinkinazę. *RET* geno raiška būna stipriai padidėjusi skyd liaukės parafolikulinėse C ląstelėse. Paprastai folikulinėse skyd liaukės ląstelėse šio geno raiška nėra aptinkama. Tačiau įvykus persitvarkymui – *RET/PSK* translokacijai, *RET* genas yra aktyvuojamas, tokiu būdu yra aktyvinama tirozinkinazė [46]. *RET/PSK* aktyvuoja *MAPK* ir *PI3-AKT* signalo perdavimo kelius.

Yra nustatyta daugiau nei 10 translokacijų, pačios dažniausios yra *RET/PSK1* ir *RET/PSK3* [44]. *RET/PSK1* ir kartu *RET/PSK3* pasitaiko iki 80 % DSK atvejų [45][47].

RET/PSK1 randama gerai diferencijuotos skyd liaukės karcinomos ląstelėse, tuo tarpu *RET/PSK3* dažniau nustatoma agresyvesnėje radiacijos sukeltaje solidinės PSK ląstelėse [48].

PAX8 (angl. Paired Box 8)/Peroksisomų proliferatoriaus aktyvinto γ receptoriaus (PPAR γ) genų pokytis

PAX8/PPAR γ pokytis – tai (2;3)(q13;p25) translokacija, kuri sukelia PAX8 ir PPAR γ genų susiliejamą [49]. PAX8/PPAR γ translokacija FSK randama iki 30-60 %, o PSK folikuliniame variante apie 38 % [44][50]. Nėra nustatyta, kad PAX8/PPAR γ ir RAS pokyčiai kartu būtų tame pačiame navike. Tai leidžia galvoti, kad FSK gali vystytis dviem skirtingais keliais [51].

Kiti genetiniai pokyčiai

Žmogaus atvirkštinės transkriptazės(angl. Telomerase Reverse Transcriptase) (TERT) promotoriaus geno pokytis (TERT).

Tai yra naujai atrastas mechanizmas, kuriuo ląstelės įgyja telomerazės aktyvumą.

TERT pokytis siejamas su agresyvesne ligos eiga [52].

mikroRNR (miRNR) yra nekoduojančių nukleorūgščių molekulės, reguliuojančios genų transliaciją ar produktų degradavimą ir dalyvauja įvairiuose ląstelių funkcijas reguliuojančiuose procesuose. Manoma, kad miRNR raiškos pokyčiai yra svarbūs skyd liaukės karcinomos vystymuisi ir progresavimui [53].

Pastebėta skirtinga miRNR raiška tarp nepiktybinių ir piktybinių skyd liaukės navikų.

3.4. Papilinė skyd liaukės karcinoma (PSK)

PSK diagnozuojama bet kurios amžiaus grupės pacientams. Dažniausia diagnozuojama 30-50 metų amžiaus pacientams. Su amžiumi susirgimų dažnis didėja, moterys serga 2-4 kartus dažniau nei vyrai [55]. PSK etiologija kelia didelį tyrėjų susidomėjimą. Vienintelis gerai ištirtas aplinkos veiksnys, turintis neabejotinos įtakos PSK išsivystymui yra apšvitęs poveikis (taikyta spindulinė terapija galvos ar kaklo srityje, gyvenimas atominių elektrinių avarijų paveiktose vietovėse) [56]. Kiti rizikos veiksniai – lydintys nepiktybiniai skyd liaukės mazgai ir šeiminė PSK anamnezė [54].

PSK – tai dažniausiai pasitaikanti ir geriausių prognozę turinti SK. Tačiau šiai skyd liaukės karcinomos formai 20-90 % atvejų būdingas ankstyvas metastazavimas į sritinius limfmazgius, sąlygojantis recidyvus ir ligos progresavimą [57]. Visgi iki 10 % atvejų liga būna progresuojančios eigos, pasireiškianti plitimu už skyd liaukės ribų, į limfmazgius ar į kitus organus.

Ligos atsinaujinimas po pradinio chirurginio gydymo siekia apie 15-20 % atvejų [58][59]. Būtent dėl galimos įvairios PSK eigos kyla dilema parenkant individualų optimaliausią gydymo metodą.

2017 m. Pasaulinės sveikatos organizacijos skydliaukės navikų klasifikacijoje išskiriami šie histologiniai PSK potipiai [41]:

- Klasikinė PSK
- Folikulinis PSK variantas
- Papilinė mikrokarcinoma
- Stulpinių ląstelių PSK
- Onkocitinis PSK variantas
- Kiti variantai: difuziškai sklerozuojantis, aukštų ląstelių, kribriforminis – morularinis, su *Hobnail* požymiais, fibromatozinis/su į fasciją panašia stroma, solidinis –trabekulinis, skaidrių ląstelių, verpstės formos ląstelių, *Warthin-like* variantai.

Skydliaukės karcinomos stadija yra nustatoma remiantis 8-uju Amerikos jungtinio vėžio komiteto patvirtintu Vėžio stadijavimo vadovu (3 lentelė) [60].

Citologiškai diagnozavus skydliaukės karcinomą, paprastai atliekama totali tiroidektomija su pakitusių limfmazgių pašalinimu. Iki operacijos ultragarsu nenustačius pakitusių limfmazgių, dažnu atveju atliekama profilaktinė centrinė limfadenektomija. Iš dalies tokios gydymo taktikos imamasi dėl to, kad UGT metu ir citologiškai nėra galimybių identifikuoti naviko agresyvumo ar tiksliai diagnozuoti nedidelių metastazių kaklo limfmazgiuose. Kuo platesnė operacijos apimtis, tuo daugiau pooperacinių komplikacijų. Jei iki operacijos pavyktų tiksliai nustatyti naviko išplitimą ir agresyvumą, išplėstinio chirurginio gydymo, padidinančio ne tik pooperacinių komplikacijų skaičių, bet ir bloginančio pacientų gyvenimo kokybę, galima būtų išvengti [61]. Dėl to, planuojant operacijos apimtį, svarbu ne tik įvertinti sritinių limfmazgių vaizdinius pakitimus, bet ir nustatyti rizikos veiksnius prognozuojančius vėžio metastazavimą bei agresyvumą.

3 lentelė. Skyd liaukės karcinomos klasifikacija

Pirminis navikas – T

<i>T kategorija</i>	<i>T kriterijai</i>
Tx	Pirminis navikas neįvertintas
T0	Pirminio naviko nėra
T1	≤2 cm, neišplitęs už skyd liaukės ribų navikas
T1a	≤1 cm, neišplitęs už skyd liaukės ribų navikas
T1b	>1 cm, bet ≤2 cm, neišplitęs už skyd liaukės ribų navikas
T2	>2 cm, bet ≤4 cm, neišplitęs už skyd liaukės ribų navikas
T3	>4 cm, neišplitęs už skyd liaukės ribų navikas arba bet kokio dydžio navikas, esant išplitimui už skyd liaukės ribų tik į apatinius poliežuvinis raumenis.
T3a	>4 cm, neišplitęs už skyd liaukės ribų
T3b	Bet kokio dydžio navikas, esant išplitimui už skyd liaukės ribų tik į apatinius poliežuvinis raumenis (<i>m.sternothyroideus</i> , <i>m.sternothyroideus</i> , <i>m.thyrohyoideus</i> ar <i>m.omohyoideus</i>)
T4	Išplitęs į pagrindinis kaklo struktūras
T4a	Bet kokio dydžio navikas, išplitęs už skyd liaukės kapsulės ir peraugantis poodinius minkštuosius audinius, gerklas, trachėją, stemplę arba grįžtamąjį gerklų nervą
T4b	Bet kokio dydžio, peraugantis prevertebralinę fasciją arba apgaubiantis miego arteriją arba tarpuplaučio kraujagysles
Pastaba:	Kiekviena kategorija gali būti suskirstyta: (S) – solitarinis navikas, (m) – daugiažidininis (didžiausio naviko dydis apsprendžia kategoriją).

Sritiniai limfmazgiai – N

<i>N kategorija</i>	<i>N kriterijai</i>
NX	Sritiniai limfmazgiai neįvertinti
N0	Metastazių sritiniuose limfmazgiuose nėra

3 lentelės tęsinys

N0a	Vienas ar daugiau citologiškai ar histologiškai patvirtintų nepiktybinių limfmazgių
N0b	Radiologiškai ir kliniškai nenustatyta metastazių kaklo sritiniuose limfmazgiuose
N1	Metastazės sritiniuose kaklo limfmazgiuose
N1a	Metastazės VI ar VII srities (pretrachėjiniuose, paratrachėjiniuose, prelaringiniuose / Delphiniuose ar viršutinio tarpuplaučio limfiniuose mazguose). Išplitimas gali būti vienusis ar dvipusis.
N1b	Metastazės vienusės, dvipusės ar priešingos pusės šoniniuose kaklo limfmazgiuose (I, II, III, IV ar V sritis) ar retrofaringiniuose limfmazgiuose.
Tolimosios metastazės – M	
M kategorija	M kriterijai
M0	Nėra tolimųjų metastazių
M1	Tolimosios metastazės

Diferencijuotos skyd liaukės karcinomos stadijos

<i>Amžius</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>Stadija</i>
<55 metų	Bet koks T	Bet koks N	M0	I
	Bet koks T	Bet koks N	M1	II
>55 metų	T1	N0/NX	M0	I
	T1	N1	M0	II
	T2	N0/NX	M0	I
	T2	N1	M0	II
	T3a/T3b	Bet koks N	M0	II
	T4a	Bet koks N	M0	III
	T4b	Bet koks N	M0	IVA
	Bet koks T	Bet koks N	M1	IVB

3.4.1. Klinikiniai patologiniai papilinės skyd liaukės karcinomos agresyvumo – prognostiniai veiksniai

Histologiniai PSK potipiai

Nepaisant to, kad dauguma PSK yra gerai diferencijuotos su mažu recidyvų

ar metastazių (regioninių ar tolimųjų) dažniu, yra nedidelė agresyvių PSK histologinių variantų grupė.

Patys agresyviausi PSK potipai yra difuziškai sklerozuojantis, aukštų ląstelių, solidinis, stulpinių ląstelių ir su *Hobnail* požymiais [62]. Šie histologiniai PSK variantai dažniau linkę metastazuoti, recidyvuoti, blogiau pasiduota gydymui radiojodui (I-131), taip pat sąlygoja blogesnę išgyvenamumą [63].

Amžius. Paciento amžius ligos diagnozės nustatymo metu yra vienas iš svarbiausių klinikinių metastazių kaklo limfmazgiuose ir PSK recidyvavimo rizikos veiksnių. Atliktos metaanalizės parodė, kad jaunas amžius (<45 metų) 1,27-1,52 karto padidina PSK metastazių kaklo limfmazgiuose atsiradimo riziką [24][64]. Tačiau yra ir prieštaringų rezultatų. K. Gou ir Z.Wang atlikta metaanalizė parodė, kad jaunas amžius kaip rizikos veiksnys reikšmingai skyrėsi tik Vakarų šalyse, o Azijos šalyse reikšmingo skirtumo nebuvo [15]. Todėl svarių įrodymų, kad jaunesnis pacientų amžius gali būti siejamas su didesne PSK MTS kaklo limfmazgiuose dar trūksta. Tai įrodyti reikėtų atlikti prospektyvinius tyrimus su didesne tiriamųjų imtimi.

Lytis. Nors sergamumas PSK yra ženkliai didesnis moterų tarpe, bet, eilė atliktų tyrimų parodė, kad vyrams dažniau aptinkamos MTS kaklo limfmazgiuose. Remiantis metaanalizės duomenimis vyrams, sergantiems PSK, rizika yra 1,68 karto didesnė turėti MTS kaklo limfmazgiuose nei moterims [24]. Todėl vyriška lytis galėtų būti nepriklausomas PSK MTS kaklo limfmazgiuose prognostinis veiksnys.

Naviko dydis. Naviko dydis yra svarbus klinikinis patologinis kriterijus nustatant ligos stadiją pagal TNM klasifikaciją. Nedideli (< nei 10 mm) navikai yra priskiriamas prie mikrokarcinomų. 2015 metų Amerikos Skydliaukės Asociacijos gairėse nurodoma, kad skydliaukės papilinė mikrokarcinoma yra siejama su mažesne metastazių kaklo limfmazgiuose rizika, todėl papilinės mikrokarcinomos daugeliu atveju gali būti aktyviai stebimos, o ne operuojamos [21]. Nors kai kurie tyrimai parodė, kad pacientams, sergantiems skydliaukės papiline mikrokarcinoma MTS kaklo limfmazgiuose gali būti randamos net iki 64 % [65]. Be to, papilinės skydliaukės karcinomos MTS kaklo limfmazgiuose 11-22 % didina recidyvo, ypač sritiniuose limfmazgiuose, riziką [66]. Paskutinė literatūroje paskelbta metaanalizė nurodo, kad naviko dydis ≥ 10 mm siejamas su ženkliai didesne metastazių buvimo KLM rizika negu, kai naviko dydis <10 mm (šansų santykis (OR) = 3,53; 95% PI 2,62-4,76, $p < 0.00001$) [24].

Daugiažidiniškumas. PSK gali metastazuoti ne tik už skydliaukės ribų, bet ir pačioje skydliaukėje. Daugiažidiniškumas taip pat svarbus PSK metastazavimo į sritinius kaklo limfmazgius rizikos veiksnys. Atlikti tyrimai parodė, kad daugiažidininės papilinės karcinomos atveju MTS į sritinius kaklo limfmazgius rizika yra ženkliai didesnė nei solitarinio naviko (OR = 2,05; 95% PI 1,45–2,89) [24]. Daugiažidiniškumo metastazavimo prognostinę reikšmę ypač padidina karcinomos dydis yra >10 mm [67].

Naviko lokalizacija. Patikimų įrodymų, kad tam tikra naviko lokalizacija didina metastazavimo į sritinius kaklo limfmazgius riziką nėra.

Yra tyrimų įrodančių, kad naviko lokalizacija viršutiniame skydliaukės trečdalyje yra dažniau lydima MTS kaklo limfmazgiuose nei naviko lokalizacija viduriniame – apatiniame trečdaliuose [24][68]. Tačiau yra tyrėjų, kurie teigia priešingai – didesnė metastazavimo rizika yra, jei navikas lokalizuojasi apatiniame ar viduriniame trečdaliuose [69][70].

Plitimas už skydliaukės kapsulės. Svarbus PSK agresyvumo rizikos veiksnys yra skydliaukės kapsulės peraugimas. Pacientams, kuriems nustatomas PSK plitimas už skydliaukės kapsulės turi didesnę MTS kaklo limfmazgiuose riziką (OR = 2,03; 95% PI 1,78-2,31). Taip pat svarbu paminėti, kad pacientai, kuriems nustatomas didelis plitimas už skydliaukės kapsulės, turi didesnę recidyvo riziką nei tie, kuriems plitimas nedidelis, nustatomas tik histologiškai [24].

3.4.2. Molekuliniai genetiniai papilinės skydliaukės karcinomos diagnostiniai žymenys

ASP biopsija su citologiniu įvertinimu išlieka „auksiniu standartu“ diferencijuojant piktybinius skydliaukės mazgus nuo nepiktybinių. Citologinės *Bethesda* kategorijos leidžia įvertinti punktuoto mazgo piktybiškumo riziką [11]. Tačiau net iki 15-30 % atvejų vien iš ASP gautos tiriamosios medžiagos citologinio įvertinimo negalima nustatyti, ar mazgas yra piktybinis [71]. Piktybiškumo rizika, esant nenustatytos reikšmės atipjai (III *Bethesda* kategorija) yra 10-30 %, o folikulines neoplazijos atveju (IV *Bethesda* kategorija) – net 25-40 % [11]. Tai yra iššūkis gydytojams specialistams, nes piktybiškumo rizika yra per didelė, kad galima būtų ją ignoruoti. Norint nustatyti tikslią histologinę diagnozę, reikėtų atlikti diagnostinę operaciją, kuri net iki 70-80 % būtų atlikta be reikalo. Be to, gavus agresyvesnę histologinį variantą, gali tekti dar kartą operuoti pacientą,

išplečiant operacijos apimtį. Todėl daug mokslinių tyrimų yra atliekama identifikuojant molekulinis genetinius žymenis, kurie leistų tiksliau dar iki operacijos nustatyti skydliaukės karcinomos diagnozę.

BRAF V600E

BRAF V600E pokytis – tai labiausiai ASP mėginiuose ištirtas molekulinis žymuo, nustatomas iki 45 % visų PSK atvejų. Šis pokytis retai nustatoma FSK atveju ir nerandama nepiktybiniuose skydliaukės mazguose. 18 tyrimų, kuriuose *BRAF* pokytis buvo tiriamas ASP mėginiuose, apžvalga parodė, kad 99,8 % *BRAF* teigiamų mėginių buvo piktybiniai [45]. *BRAF* pokyčio tyrimo taikymas kaip diagnostinio žymens diferencijuojant piktybinius mazgus nuo nepiktybinių mazgų yra ribotas, dėl nedidelio tyrimo jautrumo. Tačiau nepaisant kokiai citologinei kategorijai priklauso tiriamoji medžiaga, nustčius *BRAF V600E* pokytį, skydliaukės karcinomos diagnozė labai tikėtina, dėl mažai klaidingai teigiamų atvejų [72]. *BRAF V600E* pokyčio tyrimo jautrumas diagnozuojant skydliaukės karcinomą varijuoja nuo 32 % [73] iki 82 % [74], o specifiškumas net 99-100 % [21].

RAS

Trijų *RAS* genų šeimos atstovų (*HRAS*, *NRAS* ir *KRAS*) pokyčiai nustatomi skydliaukės karcinomos ląstelėse. Dažniausias *RAS* pokytis aptinkamas *NRAS* gene, rečiau *HRAS* ir rečiausiai *KRAS* genuose [54].

RAS pokytis nustatoma iki 40-50 % FSK atvejų ir 10-20 % PSK.

Daugiausia PSK atvejų, kur nustatomas *RAS* pokytis yra folikulinis PSK variantas. Tačiau *RAS* pokytis nėra specifiškas piktybiniams navikams, nes 20-40 % randamas ir folikulinėse skydliaukės adenomose. Tai dažniausias pokytis nustatomas tarpiniame tarp piktybinio ir nepiktybinio naviko – neinvazinėje folikulinėje skydliaukės neoplazijoje su papildiniam navikui būdingais branduolio pakitimais (NIFTP) [45]. Todėl *RAS* pokytis negali būti kaip vienintelis skydliaukės naviko piktybiškumo žymuo.

RET/PTC

RET/PTC translokacija aptinkama 15-20 % sporadinių suaugusių PSK atvejų. Šis pokytis dažnesnis spindulinės apšvitos sukeltos ir vaikų PSK [75][76].

Atliekant retrospektyvinę analizę buvo lyginti pacientų ASP mėginiai su histologine medžiaga po tiroidektomijos. *RET/PTC* pokytis nustatytas 50 %

ASP mėginių – visiems jiems po operacijos buvo patvirtinta PSK. Klaidingai teigiamų rezultatų nebuvo [77]. Rezultatai patvirtino, kad *RET/PTC* pokytis yra specifinis PSK. Be to, buvo pastebėta, kad šis molekulinis genetinis tyrimas informatyvus nedideliuose (I *Bethesda* kategorija) ASP mėginiuose. Dvejuose iš šešių ASP nedideliuose (su nepakankamu ląstelių kiekiu citologinei diagnozei nustatyti) mėginių, kuriems vėliau histologiškai buvo patvirtinta PSK, *RET/PTC* pokytis buvo rastas ASP mėginiuose. Iš 15 pacientų su neapibrėžtais (III-IV *Bethesda*) ASP mėginiais, kuriems histologiškai buvo patvirtinta PSK, devyniems ASP mėginiuose buvo nustatytas *RET/PTC* pokytis. Tačiau, remiantis vien *RET/PTC* pokyčiu, diagnozuojant PSK, jų būtų diagnozuota tik 50 % [77].

Genomo variantų rinkinių tyrimai

Per paskutinius dešimtmečius įvairūs autoriai pabrėžė tam tikrų specifinių somatinių variantų, genų pokyčių ir/ar miRNR raiškos profilio tyrimų aukštą specifiskumą ir prognostinę vertę diagnozuojant piktybinius skydliaukės susirgimus.

Kadangi pavienių genų pokyčių tyrimai skydliaukės karcinomos diagnostikai yra nepakankamai jautrūs ir tikslūs, todėl ASP mėginių ištyrimui pasitelkiami genomo variantų rinkiniai. Diagnostiniai genomo variantų rinkiniai dažniausiai apima *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS*, taip pat *RET/PTC1* ir *RET/PTC3* pokyčius, kai kuriuose rinkiniuose kartu tiriami *PAX8/PPAR γ* persitvarkymai [78].

Reikėtų atkreipti dėmesį, kad duomenys genomo variantų rinkinių taikymo srityje yra riboti. Publikuotos pavienės vieno centro studijos, kuriose buvo griežta pacientų atranka, o didžioji dauguma tyrimų finansuotos farmacijos kompanijų.

3.4.3. Molekuliniai genetiniai papildinės skydliaukės karcinomos prognostiniai žymenys

Skydliaukės karcinomos prognostiniai žymenys, tokie kaip paciento amžius, naviko dydis, naviko išplitimas už skydliaukės ribų, tolimųjų metastazių ir metastazių kaklo limfmazgiuose buvimas, pooperacinis ultragarsinis kaklo ištyrimas ir pooperacinis tireoglobulino įvertinimas yra naudojami ligos recidyvo ir mirtingumo rizikai prognozuoti [21]. Deja, dauguma šių veiksnių nėra žinomi iki operacijos. Pastaruoju metu ypač daug dėmesio skiriama molekuliniais genetiniams žymenims, kurie leistų numatyti pacientų, sergančių skydliaukės karcinoma, ligos eigą. Tokių molekulinų genetinių žymenų įtraukimas į rizikos vertinimą, leistų parinkti tinkamą operacijos apimtį bei pooperacinį gydymą.

BRAF-V600E pokytis

Dažniausiai pasitaikantis PSK atveju yra *BRAF-V600E* pokytis. Šio geno pokyčio prognostinis potencialas yra plačiausiai ištirtas.

BRAF-V600E paprastai prognozuoja blogesnę PSK baigtį. Šis pokytis siejamas su agresyvesniais patologiniais radiniais, dažnesniais ligos recidyvais, radiojodoterapijos veiksmingumo praradimu, o atsinaujinus ligai, nesėkmingu gydymu [79][80].

Atlikta metaanalizė parodė, kad PSK pacientams, turintiems *BRAF-V600E* pokytį 1,5-2,1 karto dažniau nustatomas nevisiškas pasveikimas ar ligos recidyvas. Tokiems pacientams dažniau aptinkamas naviko plitimas už skydliaukės ribų, metastazės kaklo limfmazgiuose bei diagnozuojama aukštesnė TNM stadija [81].

Kitoje metaanalizėje, į kurią buvo įtraukti 3437 papildinę skydliaukės mikrokarcinomą (PSMK) turintys pacientai, buvo lyginti *BRAF-V600E* pokytį turintys su minėto pokyčio neturinčiais pacientais. *BRAF-V600E* pokyčio dažnis siekė 47,48 %, o pacientų pasiskirstymas pagal lytį (vyrai ir moterys) ir amžių (jaunesni nei 45 metų ir 45 metų ar vyresni) grupėse reikšmingai nesiskyrė. Atlikta statistinė analizė parodė, kad *BRAF-V600E* pokytis yra susijęs su PTMC naviko daugiažidiniškumu (OR = 1,38; 95 % PI 1,04-1,82), naviko išplitimu už skydliaukės ribų (OR = 3,09; 95 % PI 2,24-4,26), metastazėmis kaklo limfmazgiuose buvimu (OR = 2,43; 95 % PI 1,28-4,60) ir pažengusia stadija (OR = 2,39; 95 % PI 1,38-4,15). Taigi šios metaanalizės rezultatai įrodo, kad *BRAF-V600E* pokyčio nustatymas siejamas su agresyvesnėmis naviko formomis net ir įprastai mažos rizikos PSMK sergantiems pacientams [82].

Italijos mokslininkų grupė tyrinėjo *BRAF-V600E* pokyčio įtaka mažos recidyvo rizikos grupės pacientams, kuriems buvo diagnozuota intratiroidinė PSK be metastazių kaklo limfmazgiuose. Tyrimas parodė, kad *BRAF-V600E* pokytis yra blogas ligos pilno pasveikimo prognostinis veiksnys. Šiems pacientams reikėjo didesnės radioaktyvaus jodo dozės, kad būtų pasiektas pilnas terapinis efektas [83].

Dar viena didelės apimties metaanalizė parodė, kad *BRAF-V600E* pokytis svarbus prognozuojant pacientų išgyvenamumą be ligos, bet neturi reikšmingo poveikio prognozuojant ligos specifinį išgyvenamumą [84]. Tačiau, kaip teigia patys autoriai, šį reikšmingą poveikį reikėtų vertinti atsargiai, nes tarp įtrauktų į metaanalizę tiriamųjų kohorta buvo ganėtinai heterogeniška. Įdomu tai, kad reikšmingą *BRAF-V600E* pokyčių ryšį su nepalankiu išgyvenamumu be ligos ir ligai specifiniu išgyvenamumu ši metanalizė nustatė tik stebint pacientus trumpą/vidutinį (≤ 5 m.) laikotarpį. O

stebint pacientus ilgiau nei 5 metus, reikšmingo *BRAF-V600E* pokyčio poveikio išgyvenamumui nelieta. Taigi, *BRAF-V600E* pokytį kaip PSK prognozavimo žymenį galima būtų naudoti tik vertinant trumpalaikę, bet netinka vertinant ilgalaikę prognozę. Tačiau svarbu pažymėti, kad didžioji dalis PSK recidyvų įvyksta per pirmuosius penkerius stebėjimo metus [85], todėl galima svarstyti *BRAF-V600E* pokyčio naudojimą kaip PSK prognozės veiksnį.

TERT pokytis

Atliktos metaanalizės duomenimis, *BRAF* pokytis kartu su *TERT* pokyčiu pasireiškė iki 6,2 % PSK atvejų, o vien tik *TERT* – 4,2 % PSK atvejų. *TERT* promotoriaus pokytis siejamas su prastesniu išgyvenamumu be ligos ir prastesniu ligai specifiniu išgyvenamumu. *TERT* pokytis reikšmingai susijęs su nepalankiu išgyvenamumu tiek trumpo ir (arba) vidutinio, tiek ilgalaikio stebėjimo metu. Tačiau dauguma tyrimų yra retrospektyvūs, todėl tai įrodyti reikia didesnės tiriamųjų imties prospektyvinių tyrimų [45].

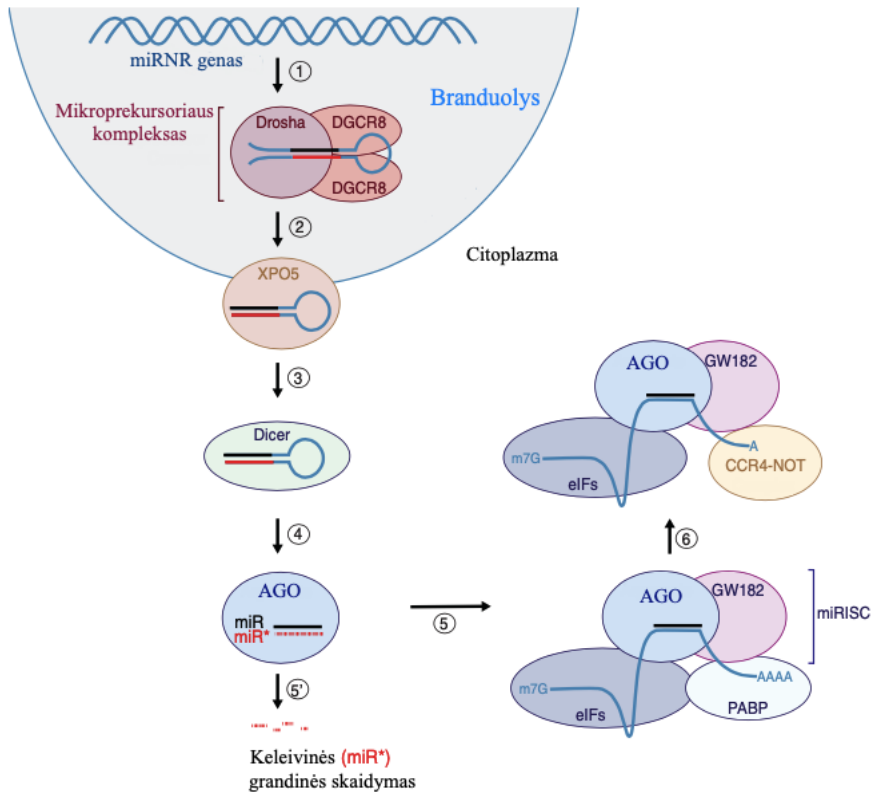
3.5. miRNR

miRNR – tai nekoduojančios mažos RNR molekulės, sudarytos iš 18-24 nukleotidų. Jos visos rišasi su *Argonaute (Ago)* šeimos baltymais, sudarydamos taip vadinamus RNR indukuotus nutildymo kompleksus (RISC), kuriuose vykdo potranskripcinius genų – taikinių nutildymo procesus. miRNR turi didelę reikšmę organizmo funkcijų palaikyme bei ligų išsivystyme. Jos lemia daug su onkogeneze susijusių procesų, tokių kaip proliferacija, ląstelių dalijimosi ciklo kontrolė, apoptozė, diferenciacija ir migracija [86](82)(83).

Pirmą kartą miRNR kaip piktybinio naviko biožymenys buvo nustatyti 2008 m., tiriant difuzinę didelių B ląstelių limfomą [87].

3.5.1. miRNR biogenezė

miRNR biogenezės etapai vyksta ląstelių branduolyje ir citoplazmoje. Pirmiausia branduolyje RNR polimerazės II/III transkribuoja miRNR pirminį transkriptą (pri-miRNR) nuo jį koduojančių genų. Pri-miRNR yra susilankstęs į stiebo-kilpos (angl. *stem-loop*) struktūrą su laisvais 3' ir 5' galais. Ši struktūra yra skeliama RNazės III tipo fermento *Drosha-DGCR8* komplekso, nukerpančios laisvus viengrandžius segtuko galus [88]. Taip susidaro 60-70 nukleotidų ilgio segtuko formos fragmentas, vadinamas nesubrendusiomis mi-RNR (pre-miRNR) (2 paveikslas).



2 pav. miRNR biogenezės apžvalga. (adaptuota pagal Medley ir kt., 2020)[88].

(1) miRNR transkripcija branduolyje ir stiebo-kilpos struktūros susidarymas; (2) stiebo-kilpos struktūros apdorojimas mikroprekursoriaus kompleksu, kurį sudaro *Drosha* ir *DGCR8*; (3) apdorotos miRNR perkėlimas į citoplazmą dalyvaujant *Exportin-5*; (4) *Dicer* apdoroja stiebo-kilpos miRNR struktūrą pašalindamas kilpą, o miRNR dupleksas prijungiamas prie *AGO* baltymo; (5) Keleivinės grandinės skaidymas ir *miRISC* komplekso susidarymas; (6) *miRISC* prisijungimas prie taikinio iRNR.

Pre-miRNR toliau *Exportin 5* baltymo transporterio (*Exp5*, koduojamo *XPO5* geno) per poras membranoje yra pernešama iš branduolio į citoplazmą, kur kerpama kitos endonukleazės – *Dicer*. Tokiu būdu susiformuoja ~22 nukleotidų subrendusių miRNR dupleksas, sudarytas iš „vedančiosios“ (angl. *guide strand*) ir „keleivinės“ (angl. *passenger guide*) sekų (miRNR-5p (5p) ir miRNR-3p (3p) sekų).

Po miRNR duplekso susidarymo, sekos atskiriamos ir „vedančiosios“

miRNR jungiasi prie baltymo *Argonaute (Ago2)*, kuris patenka į RNR-indukuotą nutildymo kompleksą – RISC (angl. *RNA-induced silencing complex*), o kita „keleivinė“ grandinė nėra funkcionali ir yra degraduojama [89]. RISC kompleksuose miRNR reikalingos taikinių atpažinimui. Taikiny yra atpažįstamas pagal Votsono-Kriko susiporavimą tarp miRNR „vedančiosios“ grandinės ir jos iRNR-taikinio (2 paveikslas) [88].

3.5.2. miRNR funkcijos

Pagrindinis miRNR vaidmuo žmogaus organizme yra genų reguliavimas, dalyvaujant iRNR skaldyme, taip pat reguliuojant transkripciją ir translacią kanoniniais ir nekanoniniais mechanizmais [90].

Kanoninis mechanizmas reiškia, kad miRNR – RISC kompleksas, kuriame yra „vedančioji“ aktyvi miRNR grandinė, jungiasi prie geno taikinio iRNR sekos 3' UTR gale. Procesas vyksta pagal miRNR „pamatinę“ (angl. *seed site*) 2-7 nukleotidų seką. Šis susijungimas sukelia iRNR degradaciją ir/arba iRNR translacijos slopinimą [91]. Visiškas komplementarumas tarp miRNR ir iRNR taikinės sekos yra retas reiškinys žinduoliuose, bet susijungimas „pamatinę“ seka, kuri apima nuo 2-7 nukleotidų 5' miRNR gale, yra pakankamas, kad būtų nuslopinta specifinių genų raiška potranskripciniame lygmenyje. Tačiau žmogaus ląstelėse apie 60 % miRNR-RISC komplekso ir iRNR sąveikų yra nekanoninės, o tai reiškia, kad jų grandinės ne visada yra visiškai komplementarios [92]. Tai leidžia manyti, kad viena miRNR potencialiai gali būti nukreipta į daugybę iRNR, o tuo pat metu vienoje iRNR gali būti daugybė miRNR prisijungimo vietų, todėl atsiranda galimybė, kad šia sąveika gali būti reguliuojama daugybė biologinių procesų [89].

Kitas svarbus miRNR vaidmuo yra tarpląstelinis signalizavimas. Nors dauguma miRNR randama ląstelės viduje, didelė jų dalis migruoja už ląstelės ribų ir gali būti randama organizmo skysčiuose [93]. Tai vadinamosios cirkuliuojančios miRNR, jos išsiskiria į kraują, šlapimą, seiles, motinos pieną [94] ir kitus skysčius dėl audinių pažeidimo, apoptozės ir nekrozės arba aktyviai pernešamos, mikrovezikulėse, egzosomose ar prisijungusios prie baltymo [95]. Cirkuliuojančios miRNR gali reguliuoti kitų ląstelių veiklą, veikti kaip tarpląstelinės signalinės molekulės, o patekusios į įvairius kūno skysčius, nukeliauti ir veikti kitų organų ląstelių veiklą.

Tyrimai parodė, kad apie 10 % cirkuliuojančių miRNR yra išskiriamos egzosomose, o kiti 90 % sudaro kompleksus su tokiais baltymais kaip *Ago2*, *nukleofosminas 1* ir didelio tankio lipoproteinai [96]. Toks kompleksas

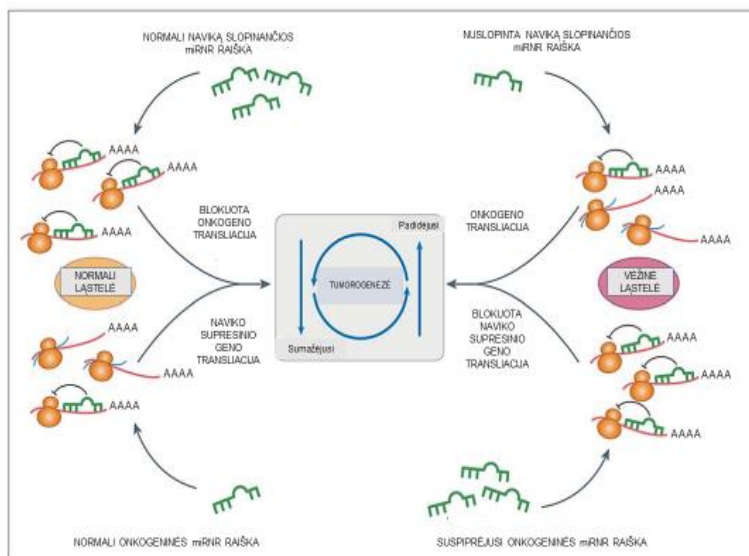
būtinai, kad organizmo skysčiuose esančios RNazės nesuardytų miRNR [89].

3.5.3. miRNR vaidmuo onkologijoje

miRNR raiška įvairių onkologinių ligų metu pakinta, dėl pakitusių epigenetinių procesų reguliavimo, atsiradusių miRNR sričių patogeninių variantų, onkogenų ir/ar naviką slopinančių genų raiškos pokyčių.

miRNR, skatinančios piktybinio naviko išsivystymą, vadinamos onkogeninėmis miRNR (angl. *oncogenic miRNAs*). Tos, kurios užkerta kelią naviko formavimuisi arba slopina jų vystymąsi, bendrai vadinamos navikus slopinančiomis miRNR (angl. *tumor-suppressive*). Paprastai onkogeninės miRNR (onkomiR) yra aukštai/stipriai ekspresuojamos sergant vėžiu, o naviką slopinančios miRNR yra nuslopintos raiškos (3 paveikslas) (82).

OnkomiR būdinga padidėjusi raiška gali būti siejama su sustiprėjusia onkomiRNR geno transkripcija dėl transkripcijos veiksnių prieinamumo, jo promotoriaus hipometilinimo arba jo vietos intra- arba intergeninėje srityje. OnkomiR taip pat gali būti reguliuojama dėl biogenezes defektų ir (arba) subrendusios miRNR stabilumo (83).



3 pav. Naviką slopinančių ir onkogeninių miRNR vaidmuo normaliose ir vėžinėse ląstelėse (adaptuota iš Ludvikova M. ir kt. 2015) [97].

3.5.4. miRNR – skydliaukės karcinomos diagnostinis veiksnys

Daugybė tyrimų atliekama siekiant panaudoti miRNR kaip potencialių biožymenį skydliaukės karcinomos diagnostikai, prognozei ar gydymo efektyvumui vertinti. miRNR yra labai specifiškos tam tikroms ląstelėms ar patologijoms, santykinai stabilios dėl savo trumpos struktūros (22-24 nukleotidai), todėl jas galima nustatyti ir patikimai išmatuoti įvairiose biologinėse medžiagose, įskaitant šviežiai šaldytus ir formalinu fiksuotus audinius, plonos adatos aspiratus, kraujo plazmą ar serumą.

miRNR raiška labai skiriasi tarp skirtingų skydliaukės piktybinių navikų, net jei jie kilę iš tos pačios rūšies skydliaukės ląstelių. Pavyzdžiui, iš C ląstelių kilusios medulinės skydliaukės karcinomos miRNR raiška labai skiriasi nuo skydliaukės navikų, kilusių iš folikulinių ląstelių [98].

Nors papildinės karcinomos, folikulinės adenomos ir karcinomos bei onkocitinės folikulinės adenomos yra kilusios iš folikulinių ląstelių, bet jos pasižymi skirtinga miRNR raiška [99].

Tikslus biologinis miRNR vaidmuo skydliaukės kancerogenezeje dar nėra iki galo iširtas, bet specifinė miRNR raiška skydliaukės navikuose, palyginus su nepakitusių skydliaukės audiniu, gali būti svarbi diagnozuojant ir gydant skydliaukės neoplazijas. Be to, skirtingų skydliaukės navikų skirtinga miRNR raiška galėtų pasitarnauti kaip atitinkamas skydliaukės navikų tipų diagnostinis žymuo [98].

miRNR raiškos analizė ir cirkuliuojančių miRNR nustatymas gali būti pritaikyti ankstyvajai skydliaukės karcinomos diagnostikai ir atsako į gydymą stebėsenai [100].

Didelė molekulinė tyrimų, tame tarpe ir miRNR, reikšmė galėtų būti III, IV ir V *Bethesda* citologinių kategorijų, kurios patenka į „pilkąją“ neapibrėžtą diagnostinę zoną, kai nėra atsakoma į klausimą, ar procesas yra piktybinis, ar nepiktybinis.

Dabartinėje literatūroje trys dažniausiai PSK ląstelėse aptinkamos miRNR yra miRNR -146B, -221 ir -222.

PSK ląstelėse miRNR 221-222 raiška yra didesnė lyginant su nepakitusių skydliaukės audiniu. Preliminarūs tyrimai rodo, kad šių miRNR raiška skydliaukės karcinoma sergančių pacientų organizme yra didesnė nei sveikų kontrolinės asmenų grupės [101].

Vienu metu naudojant 221-222 miRNR raiškos lygio matavimą ir citologinį vertinimą galima padidinti ASP tyrimo jautrumą ir specifiskumą. Homologinės 221 ir 222 miRNR yra labai panašios viena į kitą ir yra išsidėsčiusios kaip klasteris X chromosomoje. 221 ir 222 miRNR didina

prolifraciją, telomerų aktyvumą, angiogenezę ir autofagiją bei dalyvauja apoptozėje ir ląstelių ciklo reguliavime. Šių miRNR raiškos tyrimas galėtų būti naudingas diagnozuojant PSK ir valdant ligos gydymą [102].

Kitas tyrimas parodė, kad padidėjusi miR221-222 raiška būna ne tik lyginant su nepakitusiu skydliaukės audiniu, bet ir su folikuline adenoma ar hiperplastiniais skydliaukės mazgais [103].

Y. Liu su bendraautorais atliko metaanalizę ir nustatė, kad cirkuliuojančios miR222 turi didelę diagnostinę vertę nustatant PSK Azijos populiacijoje. Konkrečiai miR222 jautrumas buvo 70 %, specifiškumas – 90 % [104].

Nemažai tyrimų nustatė, kad miR146B raiška yra didesnė PSK ląstelėse lyginat su sveiku skydliaukės audiniu ar nepiktybiniais mazgais [105]. Neseniai atliktas tyrimas parodė, kad miR146B raiška PSK navikuose yra net 28,9 karto didesnė, lyginant su kontroliniais audiniais [106].

Dviejuose atskiruose tyrimuose buvo tiriama miR375 raiška ASP mėginiuose. Nustatyta, kad padidėjusi miRNR-375 raiška slopina PSK ląstelių proliferaciją ir sukelia apoptozę. Tyrimai su gyvūnų modeliais parodė, kad padidėjęs šios miRNR kiekis mažina navikinių ląstelių migraciją ir invaziją. ERBB2 molekulė suaktyvėja, kai suaktyvėja MAPK ir PI3K-AKT keliai, o padidėjusi šios molekulės raiška skatina ląstelių proliferaciją ir mažina apoptozę. ERBB2 yra miR375 taikiny, ir kai ši miRNR ją suskaido, proliferacija slopinama. Todėl manoma, kad miR375 sumažėjusi raiška gali atlikti naviką slopinantį vaidmenį PSK atveju [107][108].

S. Cantara su bendraautorais nustatė, kad miR95 ir miR190 yra tikslūs ir jautrūs diagnostiniai PSK žymenys baltosios rasės žmonėms. Jų rezultatai parodė, kad miR95 jautrumas yra 94,9 %, o specifiškumas 98,7 %, padedantis atskirti PSK nuo nepiktybinių skydliaukės mazgų ir normalaus skydliaukės audinio. Jautrumas padidėja iki 100 %, kai miR95 derinama su miR190, kuri taip pat turi didelę diagnostinę reikšmę [109].

E.Toraik su bendraautorais neseniai atliko sisteminę literatūros apžvalgą, kur analizavo skystos biopsijos RT-PGR būdu ištirtą miRNR raišką tarp sergančių PSK ir kontrolinės grupės. Į analizę buvo įtraukta 12 publikacijų, 1164 PSK ir 540 kontrolinių mėginių. Visi į analizę įtraukti tiriamieji buvo azijiečiai. Geriausi nustatyti diagnostiniai biožymenys, pasižymintys didžiausiu jautrumu, buvo miR16-2-3p, miR223-5p, miR130a-3p ir miR182-5p (jautrumas atitinkamai 94 %, 91 %, 90 %, 94 %). Dideliu specifiškumu pasižymėjo miR34c-5p. Taip pat buvo pastebėta, kad kelių miRNR diagnostinė vertė yra didesnė nei pavienės miRNR. Šešios 2-4 egzosominių miRNR grupės pasižymėjo didesne diagnostine verte, kai plotas po kreive (AUC) svyravo nuo 0,906 iki 0,981. Geriausiai atskirti piktybinius ir

nepiktybinius pakitimus padėjo miR146B-5p + miR223-5p + miR182-5p (AUC = 0,981, jautrumas = 93,8 % (84,9-98,3), specifiškumas = 92,9 % (76,5-99,1)). Išanalizavę duomenis, autoriai padarė išvadą, kad egzosominių miRNR raiškos nustatymas gali padėti diagnozuojant PSK [110].

Dar viena sisteminė metanalizė, atlikta *S. Xu* ir kolegų, nagrinėjo, cirkuliuojančių miRNR svarbą diferencijuojant SK nuo nepiktybinių skydliaukės mazgų. Į analizę buvo įtraukti 9 publikacijos apimančios 35 tyrimus, 663 SK pacientus, 519 pacientus turinčius nepiktybinius skydliaukės mazgus ir 84 sveikus asmenis. Didžioji dauguma tiriamųjų buvo azijiečiai. SK tipai analizėje nebuvo išskirti. Metanalizė parodė, kad bendras miRNR raiškos vertinimo jautrumas, specifiškumas, teigiamas tikėtumo santykis, neigiamas tikėtumo santykis, diagnostinis šansų santykis (OR) ir plotas po ROC kreive (AUC) buvo 0,81 (95% PI 0,75-0,86); 0,81 (95% PI 0,75-0,86); 4,3 (95% PI 3,2-5,6); 0,24 (95% PI 0,18-0,31); 18 (95% PI 12-28) ir 0,88 (95% PI 0,85-0,90), kai kontrolinė grupė buvo nepiktybiniai skydliaukės mazgai ir, atitinkamai 0,81 (95% PI 0,75-0,86); 0,85 (95% PI 0,75-0,91); 5,3 (95% PI 3,3-8,7); 0,23 (95% PI 0,18-0,29); 24 (95% PI 14-39); 0,89 (95% PI 0,86-0,91), kai kontrolinė grupė – sveiki asmenys. Atlikus pogrupių analizę nustatyta, kad kelių miRNR tyrimų diagnostinis tikslumas buvo aukštesnis nei pavienių miRNR tyrimų. Pagal išanalizuotus duomenis, autoriai padarė išvadą, kad cirkuliuojančios miRNR yra reikšmingos diagnozuojant SK ir atskiriant SK nuo nepiktybinių skydliaukės mazgų [111].

3.5.5. miRNR - skydliaukės papilinė karcinomos metastazavimo į kaklo limfmazgius rizikos veiksnys

PSK gydymo taktikai, operacijos apimčiai parinkti svarbu iki operacijos tiksliai įvertinti kaklo limfmazgius. Metastazių kaklo limfmazgiuose, ypač smulkių, subklinikinių, nustatymas esamais vaizdinimo tyrimų metodais dažnai yra problematiškas. Iki 60 % metastazių yra diagnozuojamos histologiškai, nors iki operacijos vaizdinimo tyrimais jos nėra aptinkamos [18]. Todėl parinkta gydymo taktika ne visada gali būti adekvati. Amerikos skydliaukės asociacijos gydymo gairėse rekomenduojama operacijos metu pašalinti CKLM pacientams, kuriems kliniškai yra nustatomos MCKLM, tačiau profilaktinis CKLM šalinimas pacientams, kuriems kliniškai nenustatytos MCKLM, išlieka prieštaringas [21]. Profilaktinis CKLM šalinimas ženkliai sumažina PSK recidyvo riziką, tačiau padidina pooperacinių komplikacijų dėl taikomos operacijos apimties, skaičių. Pacientams, kuriems atliekama CKLM pašalinimo operacija, gerokai didėja trumpalaikio pasikartojančio gerklų nervo pažeidimo ir trumpalaikės ar

nuolatinės hipokalcemijos tikimybė [22]. Todėl tikslus MCKNM nustatymas yra labai svarbus optimizuojant individualų PTC gydymą.

Daugelis tyrėjų ieško naujų tyrimo metodų, kurie leistų nustatyti MKLM prieš operaciją. Pažangūs nauji molekuliniai genetiniai biožymenys galėtų padėti identifikuoti agresyviai PSK sergančius pacientus, kuriems būtų galima taikyti agresyvesnius gydymo metodus.

Pastarąjį dešimtmetį daug tyrimų buvo atlikta siekiant nustatyti miRNR, kaip diagnostinį PSK biožymenį. Keletas miRNR yra siejamos ir su PSK metastazėmis [112].

Šio darbo metu atlikta sisteminė literatūros apžvalga apibendrina dabartines žinias apie miRNR ryšį su PSK metastazavimu į regioninius kaklo limfmazgius [113].

Į apžvalgą buvo įtrauktos 27 publikacijos. Iš jų 17 tyrimų analizavo audinių miRNR, 5 – cirkuliuojančias miRNR, o 5 tyrimai analizavo ir audinių, ir cirkuliuojančių miRNR mėginius. miR146B, miR221, miR222, miR21, miR204, miR451, miR199a-3p ir miR30a-3p reikšmingas raiškos pokytis buvo bent dvejuose tyrimuose. Nemaža dalis tyrimų neparodė statistškai reikšmingų miRNR raiškos skirtumų tarp metastazes kaklo limfmazgiuose turinčių ir neturinčių pacientų. Šiuos neatitikimus galima paaiškinti skirtingomis metodikomis ir pacientų populiacijų skirtumais. Svarbus atliktos analizės trūkumas, kad dauguma tyrimų buvo atlikta su azijiečiais, tyrimų atliktų su baltosios rasės atstovais yra labai nedaug.

Šio darbo metu atliktos sisteminės analizės duomenimis toliau atskirai bus aptariamos atskiros miRNR.

miR146

Funkcinė miR146 analizė parodė, kad ji susijusi su įvairiomis ląstelių funkcijomis, įskaitant proliferaciją, migraciją ir invaziją [114][115]. *C.H.Chou* ir kt. įrodė, kad miR146B raiška yra nepriklausomas PSK blogos prognozės rizikos veiksnys [116]. Vienuolikoje straipsnių, įtrauktų į analizę, buvo tiriamas ryšys tarp miR146B raiškos padidėjimo ir MKLM PSK atveju. Aštuoniuose iš šių tyrimų analizuotos audinių miRNR (4 formaliniu fiksuoti, 3 šviežiai šaldyti mėginiai ir 1 ASP mėginys) [28][117][118][119][120][121][122][29], dvejuose – cirkuliuojančios miRNR (plazmos egzomosos) [123][124] ir viename – ir audinių, ir cirkuliuojančios miRNR (šviežiai šaldyti audiniai ir kraujas) [125]. Kelios

nepriklausomos tyrėjų grupės, tyrusios miRNR histologiniuose mėginiuose, nustatė, kad miR146B raiškos lygis yra reikšmingai padidėjęs pacientams su MKLM [120][121][29], tačiau likusiuose tyrimuose reikšmingo padidėjimo nenustatyta [119][28][125][118].

M. Sun ir kt. nustatė teigiamą ryšį tarp padidintos miR146A raiškos histologiniuose mėginiuose pacientų su PSK ir MKLM. Tačiau reikšmingo miR146A raiškos skirtumo periferiniame kraujyje tarp PSK tiriamųjų su MKLM ir be MKLM nenustatė. Reikšmingo miR146B raiškos skirtumo tų pačių tiriamųjų tiek histologiniuose mėginiuose, tiek ir periferiniame kraujyje tai pat nebuvo. Todėl autoriai padarė išvadą, kad miR146A ir miR146B raiškos tyrimas periferiniame kraujyje nėra reikšmingas prognozuojant MKLM buvimą PSK pacientams [125].

F. Yang ir kt. tyrinėję miR146B raišką ASP mėginiuose nustatė, kad šios miRNR raiška buvo reikšmingai didesnė PSK pacientų tiek su MKLM, tiek su labiau pažengusia karcinomos stadija [122].

K. Jiang su kolegomis tyrė plazmos egzosomines miRNR kaip potencialius biožymenis, leidžiančius prognozuoti MKLM buvimą PSK pacientams. Egzosominių miR146B-5p ir miR222-3p ROC analizė parodė, kad jų AUC yra atitinkamai 0,811 ir 0,834. Egzosominių miR146B-5p ir miR222-3p derinys pagerino diagnostinę vertę ir padidino AUC iki 0,895, jų jautrumas ir specifiškumas atitinkamai buvo 85,1 % ir 80,0 %. Todėl autoriai padarė išvadą, kad plazmos egzosominės miR146B-5p ir miR222-3p gali būti potencialūs PSK MKLM biožymenis [124].

miR221/222

Su miR221/222 yra daugiausia tyrimų, įrodančių jų raiškos pokyčio sąsają su tokiais klinikiniais patologiniais PSK požymiais, kaip MKLM, naviko plitimu už skydliaukės ribų, didesne ligos atkryčio rizika. Keletas tyrimų nustatė, kad PSK su MKLM turi didesnę miR221/222 raišką audiniuose, palyginti su PSK be MKLM [126][117][120][121][127][29]. *K. Jiang* su kolegomis nustatė, kad reikšmingai didesnė miR222 ir miR221 raiška serume randama PSK tiriamiesiems, kuriems yra diagnozuotos MKLM [124]. Padidintą miR222 raišką PSK su MKLM pacientų serume nustatė ir *S. Yu* su kolegomis [128]. Dar vienas tyrimas, atliktas *Y. S. Lee* ir kt. taip pat vertino pacientų, sergančių PSK, plazmos miRNR raišką. Tiriamųjų su MKLM plazmos miR221 ($-4,86 \pm 0,051$) ir miR222 ($-5,36 \pm 0,91$) raiškos pokyčiai buvo šiek tiek didesni nei pacientų be MKLM, kurių raiškos pokyčiai buvo atitinkami: miR221 ($-5,06 \pm$

0,074) ir miR222 ($-5,45 \pm 0,079$). Tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas [123].

miR451

Kita svarbi miRNR šeimos narė yra miR451, kurios raiškos sumažėjimas nustatomas daugelio onkologinių susirgimų metu. Įvairiose piktybinių navikų formose ji dažnai veikia kaip naviką slopinanti miRNR [129][130][131]. Tačiau mažai žinoma apie jos vaidmenį PSK atveju.

Darbo metu analizuotose publikacijose duomenys apie miR451 ryšį su PSK MKLM yra prieštaringi. *M. Zhang* ir bendraautoriai atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad miR451 raiška buvo reikšmingai sumažėjusi PSK pacientų su MKLM histologiniuose mėginiuose. Tai galėtų būti „geras“ MKLM biožymuo, kur apskaičiuotas $AUC = 0,792$. Tačiau tiriant miR451 raišką serume, tokio reikšmingo skirtumo tarp grupių nebuvo nustatyta. Šiuo atveju apskaičiuota AUC reikšmė siekė tik 0,690, ką galėtume vertinti tik kaip „vidutinį“ MKLM biožymenį [132].

Z. Wang ir kolegos savo tyrime gavo priešingus rezultatus. Histologiniuose pacientų su MKLM mėginiuose miR451 raiška buvo reikšmingai didesnė nei pacientų be MKLM mėginiuose. Remiantis šiais radiniais galima būtų manyti, kad miR451 veikia kaip onkogeninė miRNR [133]. Norint paaiškinti miR451 tyrimų nesutapimus, reikėtų atlikti didesnės apimties tyrimus.

miR199a-3p

C. Liu su kolegomis savo tyrime RT-PGR būdu nustatė, kad miR199a-3p raiška PSK histologiniame mėginyje buvo 7,1 (95% PI 3,9-12,4). Tai yra reikšmingai mažesnė nei normaliam skydliaukės audinyje, kuriame miR199a-3p raiška buvo 31,4 (95% PI 15,4-44,3) ($p = 0,002$). ROC analizė parodė, kad miR199a-3p galėtų būti potencialus PSK biožymuo, su gana didele AUC reikšme - 0,87 (95% PI 0,66-0,90; $p = 0,001$). Žemas miR199a-3p raiškos lygis siejamas su TNM stadija ($p = 0,026$), plitimu už skydliaukės ribų ($p = 0,02$), MKLM ($p = 0,036$), tolimosiomis metastazėmis ($p = 0,002$) ir recidyvuojančiomis MKLM ($p = 0,03$). Remiantis savo tyrimo rezultatais tyrėjai daro išvadą, kad miR199a-3p sumažėjimas skydliaukės audinyje siejasi su PSK invazyviškumu bei metastazavimu, ir galėtų būti potencialus terapinės intervencijos rodiklis [134]. *K. Jiang* su kolegomis atliko miR199a-3p tyrimą su 136 pacientų sergančiais PSK serumu. Reikšmingo skirtumo tarp pacientų su MKLM ir pacientų be MKLM tyrėjai nenustatė [124].

Vienas iš veiksnių, ribojančių skirtingų straipsnių miRNR raiškos pokyčių palyginimą, yra tas, kad daugumoje tyrimų naudojamos gana subjektyvios miRNR raiškos vertės ir nenustatomi absoliutūs tikslinių miRNR lygiai, o tai apsunkina miRNR, kaip klinikinio įrankio, patvirtinimą.

Cirkuliuojančių ir/arba ASP miRNR raiškos pokyčių analizė galėtų būti naudojama PSK kaklo limfmazgių metastazių diagnostikoje iki operacijos. Norint šiuos duomenis pritaikyti klinikinėje praktikoje, reikia atlikti didesnės tiriamųjų imties tyrimus, kad būtų nustatyta miRNR grupių prognostinė ir diagnostinė vertė. Standartizavus miRNR tyrimo metodus, būtų galima plačiau taikyti šiuos tyrimus nustatant individualias skydliaukės karcinoma sergančių pacientų gydymo strategijas.

4. DARBAI DISERTACIJOS TEMA

4.1. Straipsniai disertacijos tema

1. R. Laukienė, A. Padlipskaitė, E. Žurauskas. Uždegiminis miofibroblastinis navikas skydliaukėje kartu su folikuline karcinoma: reto klinikinio atvejo aprašymas. *Laboratorinė medicina*. 2017, t. 19, Nr. 1(73), p.61–65.
2. R. Laukienė, K. Misevičiūtė, D. Jocius. Klinikiniai diagnostiniai pirminės skydliaukės limfomos aspektai: literatūros apžvalga ir atvejo aprašymas. *Laboratorinė medicina*. 2021, t. 22, Nr. 2(86), p. 87–91.
3. Laukiene R., Jakubkevicius V., Ambrozaityte L., Cimbalistiene L., Utkus A. Dysregulation of microRNAs as the risk factor of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: systematic review. *Endokrynologia Polska* 2021; 72(2). DOI: 10.5603/EP. a2021.0010.
4. R. Laukienė, G. Mekionytė, D. Šeinin. Kaklo paraganglioma kartu su papiline skydliaukės karcinoma: retas klinikinis atvejis. *Laboratorinė medicina*. 2021, t. 23, Nr. 2(88), p. 74–80.
5. M. Kantautas, Ž. Židonis, R. Laukienė. Molekulinių žymenų tyrimo vertė, diagnozuojant skydliaukės karcinomą, esant folikulinei skydliaukės neoplazmai: sisteminė literatūros apžvalga ir metaanalizė // *Laboratorinė medicina*. 2021, Nr. 3 (23), p. 164-170.
6. R. Laukienė, L. Ambrozaitytė, L. Cimbalistienė, V. Sytnikova, A.E.Tamošiūnas. miRNR reikšmė papilinės skydliaukės karcinomos metastazėms kaklo limfmazgiuose diagnozuoti. *Laboratorinė medicina*. 2022, t. 24, Nr. 2(92), p. 63-70.
7. Laukiene, R.; Ambrozaityte, L.; Cimbalistiene, Utkus A, Tamosiunas A.E.; Diagnostic significance of FNAB miRNA expression in papillary thyroid carcinoma. *Diagnostics* 2022, 12, x. <https://doi.org/10.3390/> - priduota spaudai.

4.2. Pranešimai disertacijos tema

4.2.1. Žodiniai pranešimai

1. R. Laukienė. „Gerai diferencijuotos skydliaukės karcinomos klinikinų, citologinių ir molekulinų tyrimų diagnostinė reikšmė“. VED mokslinė praktinė konferencija „Endokrininių ligų diagnostikos ir gydymo aktualijos“. Vilnius, 2018.05.31.

2. R. Laukienė. „Skydliaukės TIRADS. Pirmieji rezultatai“. Mokslinė praktinė konferencija „Ultragarsinės diagnostikos vasaros mokykla: teorija ir praktika“. Dubingiai, 2018.07. 27-29.
3. R. Laukienė. „Daugybinių endokrininių neoplazijos sindromai: diagnostika, gydymas ir priežiūra“. LED mokslinė praktinė konferencija „Endokrininių susirgimų genetika“. Kaunas, 2019.05.10.
4. R. Laukienė, A. Beiša. „Skydliaukės vėžys: endokrinologo ir chirurgo tandemas – kas, kaip, kada?“. VED mokslinė praktinė konferencija „Onkologija endokrinologijoje“. Vilnius, 2021.04.29.

4.2.2. Stendiniai pranešimai

1. Laukiene R., Padlipskaite A., Zurauskas E. “Concomitant thyroid inflammatory myofibroblastic and follicular tumors”. 19th European Congress of Endocrinology, Lisbon, 20-23 May 2017.
2. Laukiene R., Cimbalištie L., Utkus A. “Thyroid microRNA analysis and prognostic value”. Life Sciences Baltics. Vilnius, 26-27 September 2018.
3. Laukiene R., Sestakauskaite J., Visockiene Z. “Risk factors of cervical lymph node metastasis of differentiated thyroid carcinoma”. 21th European Congress of Endocrinology. Lyon, 18-21 May 2019.
4. Laukiene R., Miseviciute K. “Primary Thyroid Lymphoma: Could Surgery Be Avoided?”, Congress of Endocrine Society ENDO2021. 20-23 March 2021.
5. Laukiene R., Ambrozaityte L. “Association of microRNA Expression with Cervical Lymph Node Metastases of Thyroid Carcinoma”. 23th European Congress of Endocrinology, 22-26 May 2021.
6. Laukiene R., Ambrozaityte L. “Analysis and prognostic significance of miRNAs in papillary thyroid carcinoma”. 24th European Congress of Endocrinology, Milan, 21-24 May 2022.

5. DARBO METODOLOGIJA

5.1. Tyrimo organizavimas

Biomedicininiam tyrimui atlikti 2017.03.07 gautas Vilniaus Regioninio Biomedicininių tyrimo Etikos komitetas leidimas Nr. 158200-17-905-414 (1 priedas). Tyrimo vieta – VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos (VUL SK). Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija išdavė leidimą Nr. 2R-2261 atlikti asmens duomenų tvarkymą mokslinio tyrimo tikslu (2 priedas). Tyrimas užregistruotas VUL SK Biomedicininių tyrimų registracijos sistemoje, registracijos numeris – 17BMT24. 2016-2021 m. atliktas monocentrinis prospektyvinis tyrimas, kuris neturėjo įtakos pacientų gydymo taktikai. Tyrimo metu taikyti standartizuoti VUL SK ligų gydymo ir diagnostikos metodai.

5.2. Tiriamieji asmenys

5.2.1. Tiriamųjų asmenų įtraukimo į tyrimą kriterijai

Tyrimo dalyvauti pakviesti VUL SK tirti ir gydyti pacientai, atitinkantys įtraukimo į tyrimą kriterijus (4 lentelė).

5.2.2. Tiriamųjų asmenų grupės:

1. Tiriamieji asmenys, kuriems citologiškai įtarta (III-VI *Bethesda* citopatologinė kategorija) ir po tiroidektomijos histologiškai patvirtinta papilinė skydliaukės karcinoma, be metastazių limfmazgiuose.
2. Tiriamieji asmenys, kuriems citologiškai įtarta (III-VI *Bethesda* citopatologinė kategorija) ir po tiroidektomijos histologiškai patvirtinta papilinė skydliaukės karcinoma, su metastazėmis limfmazgiuose.
3. Kontrolinė grupė. Tiriamieji asmenys, kuriems citologiškai įtarta (III-VI *Bethesda* citopatologinė kategorija), bet po tiroidektomijos ar skydliaukės rezekcijos histologiškai diagnozuoti gerybiniai pakitimai – adenoma ar mazginė hiperplazija.

4 lentelė. Tiriamųjų asmenų įtraukimo ir atmetimo į tyrimą kriterijai

	Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė
Įtraukimo kriterijai	<ul style="list-style-type: none"> • Informuoto asmens sutikimo davimas prieš pradėdant bet kokią su tyrimu susijusią veiklą. • Vyrai ir moterys, kurių amžius ≥ 18 metų. • Asmenys, kuriems citologiškai įtarta skydliaukės karcinoma (III-VI <i>Bethesda</i> citopatologinė kategorija). • Asmenys, kuriems atlikta tiroidektomija ar skydliaukės rezekcija. • Asmenys, kuriems po operacijos histologiškai patvirtinta papilinė skydliaukės karcinoma. 	<ul style="list-style-type: none"> • Informuoto asmens sutikimo davimas prieš pradėdant bet kokią su tyrimu susijusią veiklą. • Vyrai ir moterys, kurių amžius ≥ 18 metų. • Asmenys, kuriems citologiškai įtarta skydliaukės karcinoma (III-VI <i>Bethesda</i> citopatologinė kategorija). • Asmenys, kuriems atlikta tiroidektomija ar skydliaukės rezekcija. • Asmenys, kuriems po operacijos histologiškai bus patvirtinti nepiktybiniai pakitimai – adenoma ar mazginė hiperplazija
Atmetimo kriterijai	<ul style="list-style-type: none"> • Nėra 	<ul style="list-style-type: none"> • Nėra

5.3. Asmenų pakvietimo dalyvauti tyrime procedūra

Visiems pacientams, kuriems VUL SK 2017.01-2021.01 laikotarpyje buvo citologiškai nustatytas ar įtartas skydliaukės piktybinis procesas, buvo pasiūlyta dalyvauti biomediciniame tyrime. Tyrėjas paaiškino tyrimo tikslus, tyrimo eigą, galimybę bet kada ir dėl bet kokios priežasties pasitraukti

iš tyrimo. Pacientams buvo skiriama pakankamai laiko perskaityti informavimo apie biomedicininį tyrimą formai, buvo atsakyta į visus iškilusius klausimus. Savo sutikimą pacientai patvirtino pasirašydami informuoto asmens sutikimo formą, versija 1.1, 2017.02.26 (3 priedas). Vienas dokumento egzempliorius su paciento ir tyrėjo parašu atiduotas pacientui, o kitas paliktas tyrimo centre. Pacientui, sutikusiam dalyvauti tyrime, siekiant apsaugoti asmens duomenų konfidencialumą, suteiktas specialus kodas. Kiekvienam tiriamajam buvo užvesta popierinė byla, kurioje laikomi visi su pacientu susiję koduoti tyrimo duomenys. Sąrašas, kuriame yra pacientų vardai ir pavardės susiejami su kodu, yra tyrėjo segtuve. Visi su tyrimų susiję dokumentai yra saugomi rakinamoje spintoje, į kurią prieigą turi tik tyrėjai.

5.4. Biomedicininio tyrimo duomenų rinkimo etapai

5.4.1. Tyrimo etapas iki operacijos

Pagal įprastą klinikinę praktiką ir VšĮ VUL SK galiojančias procedūras, pacientams su įtariama skydliaukės patologija atliktas skydliaukės ir kaklo limfmazgių UGT bei, esant indikacijoms, skydliaukės mazgų plonos adatos aspiracinė punkcija. Plonos adatos aspiratas išsiunčiamas citologiniam ištyrimui. Visiems pacientams, kuriems citologiškai buvo nustatytos III, IV, V ar VI *Bethesda* citologines kategorijos, buvo siūloma dalyvauti biomedicininiame tyrime. Asmeniui sutikus dalyvauti ir pasirašius informuoto asmens sutikimo formą, iš ASP likučių išskirta RNR ir užšaldyta -80 °C temperatūroje. Mėginiai buvo pažymėti su specialiu konkrečiam pacientui priskirtu kodu.

Šiame etape buvo surinkti tokie tiriamųjų asmenų duomenys:

- Demografiniai:

- amžius – pilnas metų skaičius informuoto asmens sutikimo formos pasirašymo metu
- lytis

- Skydliaukės ultragarsinio tyrimo duomenys:

- punktuoto skydliaukės mazgo dydis (mm)
- mazgų skaičius – vienas ar daugiau nei vienas
- kaklo limfmazgių būklė – yra limfadenopatija ar ne

- Citologinė aspiruoto mazgo kategorija – pagal *Bethesda* III, IV, V, VI

- Skydliaukės funkcija – hipertireozė, hipotireozė, eutireozė

- Biocheminiai skydliaukės hormonų tyrimai: TTH koncentracija – jeigu buvo atlikti keli TTH tyrimai, paimtas arčiausiai operacijos datai atliktas matavimas

5.4.2. Tyrimo etapas po operacijos

Šiame etape surinkti tiriamųjų asmenų duomenys:

- Operacijos protokolas: operacijos apimtis

- Histologinis tyrimas:

- galutinė patologinė diagnozė
- naviko dydis (mm)
- limfocitinis tiroiditas – taip/ne
- naviko plitimas už skyd liaukės ribų – taip/ne
- MKLM – taip/ne

5.5. Procedūros

5.5.1. Skyd liaukės mazgų citologinių mėginių paėmimas

Medžiaga citologiniam tyrimui gauta atliekant perkutaninę skyd liaukės mazgo punkciją plonomis steriliomis adatomis. Procedūra atlikta kontroliuojant ultragarsu. Uždėjus ultragarso daviklį ant kaklo, skyd liaukės projekcijoje, ekrane išvedamas norimo punktuoti mazgo vaizdas. Viena ranka laikant daviklį, kita, laisva ranka – švirkštą su adata, durta statmenai ultragarso spinduliui nedideliu atstumu nuo daviklio. Sekant adatos galiuką, adata įvesta į norimą vietą ir staigiu judesiu švytuoklės principu atlikti dūriai. Aspiratas gautas švirkšte sudarant vakuumą, stūmoklis atleistas praėjus 2-3 sekundėms nuo aspiracijos pradžios. Norint gauti tyrimui tinkamą medžiagą, mazgai tos pačios procedūros metu punktuoti 2-3 kartus. Dalis ASP metu gautos skyd liaukės audinio medžiagos sušvirkšta į pažymėtą buteliuką su skysta terpe. Likusi aspiruotos medžiagos dalis paskleista ant pažymėto objekcinio stiklelio. Tepinėliai fiksuoti sausai (džiovinant ore).

5.5.2. Citologinis skyd liaukės mazgo aspirato tyrimas

Citologiniai skyd liaukės mazgų aspiratų tyrimai atlikti VUL SK Laboratorinės medicinos centre, hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje, pagal standartizuotą VUL SK diagnostikos metodą. Visi ASP mėginių aspiratai įvertinti dažytuose *Papanicolau* tepinėliuose ir automatizuota *BD Prep Stain* sistema paruoštuose tepinėliuose. ASP rezultatai klasifikuoti į diagnostinius (pakankamus) ir nediagnostinius (nepakankamus). Mėginys vadinamas „diagnostiniu“ tuomet, kai jame yra ne mažiau nei šešios gerai išsilaikiusios skyd liaukės epitelio ląstelių grupės, kurių kiekviena

sudaryta iš ne mažiau nei 10 ląstelių, arba randamas gausus koloidas. Citologinė diagnozė skirstoma į 6 kategorijas naudojant *Bethesda* sistemą [11] (3.1. skyrius).

5.5.3. Chirurginis gydymas

Operuojantis chirurgas nebuvo informuotas apie paciento dalyvavimą biomediciniame tyrime, todėl tai neturėjo įtakos sprendimui dėl indikacijų operaciniam gydymui ar pačios operacijos apimties. Pacientams buvo atlikta vienos skilties su tarpine dalimi ar visos skyd liaukės pašalinimo operacija. Tiems pacientams, kuriems iki operacijos ultragarsu buvo įtartos metastazės centriniuose kaklo limfmazgiuose, buvo atlikta terapinė centrinių kaklo limfmazgių limfadenektomija. Jeigu iki operacijos ultragarsu buvo nustatyti patologiškai pakitę lateraliniai kaklo limfmazgiai, kartu atlikta ir radikali modifikuota šoninių kaklo limfmazgių limfadenektomija. Daliai pacientų iki operacijos nebuvo diagnozuotos metastazės, todėl jiems atlikta profilaktinė vienos pusės ar abipusė centrinių limfmazgių pašalinimo operacija. Nedidelei daliai pacientų limfadenektomija nebuvo atlikta. Histologinis operacinės medžiagos ištyrimas atliktas Valstybiniame patologijos centre, VšĮ VUL Santaros klinikų filiale, autopsinių ir biopsinių tyrimų skyriuje.

5.5.4. RNR išskyrimas

RNR iš skyd liaukės mazgų aspiratų buvo išgryninta naudojant komercinį *Quick-DNA/RNA™ Microprep Plus Kit* rinkinį (*Zymo Research*, JAV). RNR kiekybinis įvertinimas atliktas naudojant spektrofotometrą *Nanodrop* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV). Išskirtos RNR mėginiai buvo laikomi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki tolimesnio miRNR ištyrimo.

5.5.5. miRNR raiškos nustatymas naujos kartos sekoskaitos metodu skyd liaukės mazgų mėginiuose

Mažųjų RNR praturtinimas ir mažųjų RNR fragmentų bibliotekų paruošimas buvo atliktas naudojant „*Ion Total RNA-Seq Kit v2 for Small RNA Libraries*“ rinkinį (*Thermo Fisher Scientific*, JAV). Pagal gamintojo protokolą, kiekvienam mėginiui naudota 1 μg RNR, atliktas RNR 3' adapterio ligavimas, RNR 5' adapterio ligavimas, kopijinės DNR (kDNR) sintezė, PGR amplifikacija, naudojant unikalios kiekvieno mėginio barkodų sekas, ir mažųjų RNR bibliotekos dydžio atranka. Sekoskaita atlikta naudojant naujos kartos sekoskaitos platformą *Ion Torrent PGM* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

miRNR sekoskaitos bioinformacinė duomenų analizė buvo vykdoma *Partek® Flow®* (*Partek incorporated, JAV*) kompiuterinės bioinformatinės analizės programa.

5.5.6. Pasirinktų miRNR ištyrimas RL-PGR metodu pacientų skydliaukės mazgų mėginiuose

miRNR raiška buvo matuojami atliekant kiekybinę atvirkštinės transkriptazės-polimerazės grandininės reakciją (RL-PGR), naudojant *TaqMan® Advanced miRNA Assays* (*Applied Biosystems, JAV*) rinkinius. Iš išgrynintos RNR, naudojant *TaqMan* miRNR atvirkštinės transkripcijos rinkinį, pagal gamintojo protokolą susintetinta kDNR. Susintetinta kDNR buvo gausinta naudojant *TaqMan®* miRNR zondus. Kiekvienam mėginiui, pagal gamintojo instrukcijas, buvo atliekamos trys PGR pakartojimai.

Slenkstinio ciklo (Ct) vertė buvo apibrėžta kaip kPGR ciklų skaičius, reikalingas fluorescenciniam signalui pasiekti ir viršyti medžiagos aptikimo slenkstinę vertę [135]. Pradinis Ct reikšmių apdorojimas ir normalizavimas buvo atliekamas naudojant *Expression Suite release v1.3* (*Thermo Fisher Scientific, JAV*) kompiuterinę duomenų analizės programą. Šios programos pagalba buvo suvidurkinti reakcijų pakartojimai. Kadangi nei vienos tirtos miRNR raiška nebuvo vienodai pasiskirsčiusi visuose mėginiuose, duomenų normalizavimui naudotas visuotinis vidurkio normalizavimas, kai normalizatoriumi naudojamas apskaičiuotas visų miRNR vidurkis. Pereita prie santykinų vienetų ir gauti duomenys perskaiciuoti logaritminėje skalėje. Santykinė raiška apskaičiuota taikant $2^{-\Delta Ct}$ metodą [135]. Taip apdoroti dydžiai buvo naudoti tolimesnėje statistinėje analizėje.

5.6. Statistinė duomenų analizė

Atliekant statistinę duomenų analizę buvo naudojama IBM SPSS Statistics programa, versija 23. Naudoti įvairūs, vienas kitą papildantys matematinės statistikos analizės metodai, siekiant kiek galima tikslesnių rezultatų. Taikant Šapiro – Vilko testą buvo tikrinama kiekybinių kintamųjų normalumo prielaida. Normalumo prielaidą tenkinančioms dviem nepriklausomoms imtims analizuoti pasirinktas Stjudento testas. Statistinis reikšmingumas vertintas, kaip p-reikšmė $< \alpha$ (α – reikšmingumo lygmuo; 0,05).

Kiekybinių dydžių, pasiskirsčiusių pagal normalųjį dėsnį, aprašymui taikyta padėties charakteristika – vidurkis (taškas, kuris vidutiniškai artimiausias visiems elementams) su savo standartiniu nuokrypiu (SN). Kiekybiniai duomenys, nepasiskirstę pagal normalųjį dėsnį, pateikti nurodant medianą bei

kvartilių skirtumą (kvartilių skirtumas skaičiuojamas Q3-Q1). Nominalieji kintamieji aprašyti absoliučiais duomenų skaičiais (n) bei jų procentine išraiška (proc.).

Duomenims nepasisiskirsčiusiems pagal normalųjį skirstinį, dviejų grupių duomenys buvo lyginti naudojant Mano-Vitnio kriterijų. Kai normalumo prielaida buvo pažeidžiama ir lygintos daugiau nei 2 grupės, taikytas Kruskalo-Voliso kriterijus.

Skirtumų tarp kategorinių kintamųjų statistiniam reikšmingumui įvertinti buvo skaičiuotas Pirsono (angl. *Pearson*) χ^2 (chi kvadratu) kriterijus, o kai kintamojo nors vienos reikšmės tikėtinas dažnis <5, Fišerio tikslusis (angl. *Fisher's exact*) kriterijus.

Kategorinių kintamųjų priklausomybei nuo kitų kintamųjų aprašyti, siekiant išsiaiškinti, nuo ko jis priklauso, taikytas daugianarės logistinės regresijos modelis. Modelio priskirtas kaip tinkamas jei:

1) klasifikavimo lentelėje teisingai suklasifikuotų atvejų kiekvienoje kategorijoje daugiau nei 50 %. Kuo didesnis teisingai suklasifikuotų atvejų procentas, tuo modelis geresnis.

2) tikėtinumo santykio chi-kvadratu statistikos p reikšmė mažesnė nei 0.05. Parodė, kad modelyje buvo bent vienas reikalingas (reikšmingas) regresorius;

3) Kokso Snelo ir Nagelkerkės determinacijos pseudokoeficientai didesni už 0,20, kurie parodė bendrą modelio tikimą.

miRNR raiškos tyrimų, klasifikuojant piktybinius ir nepiktybinius skydliaukės mazgus, tikslumui nustatyti buvo naudotos ROC (angl. *Receiver operating characteristic*) kreivės, įvertinant plotą po kreive. ROC kreivė rodo teisingai kvalifikuotų teigiamų rezultatų skaičiaus priklausomybę nuo neteisingai kvalifikuotų neigiamų rezultatų skaičiaus. Nubraižytose ROC kreivėse galima vizualiai įvertinti ir palyginti biožymenų klasifikacinį veiksmingumą. Kuo ROC kreivė yra arčiau kairiojo viršutiniojo kampo, tuo geresnis klasifikacinis veiksmingumas. Taip pat paskaičiuotas plotas po ROC kreivėmis (AUC – angl. *area under curve*). Modelis laikomas tinkamu tik tada, kai jo kreivė yra aukščiau įstrižai grafiką kertančios tiesės, paprastai modelio veiksmingumas vertinamas nuo 0,5 (bevertis modelis) iki 1 (idealus modelis).

Tyrimo imties dydžiui nustatyti naudota *EpiTools* (angl. *epidemiological calculators*, www.epitools.ausvet.com.au) bei *GPower* 3.1 programos. Kriterijaus reikšmingumo lygmuo pasirinktas $\alpha=0,05$. Atsižvelgta į tai, kad kriterijaus galia būtų ne mažesnė nei 0,8. Pasirinktas tirtų imčių dydis atitinka reikalavimus.

6. TYRIMO REZULTATAI

6.1. Tyrimo imties sudarymas. Bendrieji demografiniai tiriamųjų požymiai

Nuo 2017 m. gegužės mėn. iki 2021 m. sausio mėn. 239 pacientai sutiko dalyvauti biomedicininiam tyrimo ir pasirašė informuoto asmens sutikimo formą (3 priedas). Jų citologiniai skyd liaukės mazgų aspiratų mėginiai buvo surinkti, išskirta RNR ir užšaldyta -80°C temperatūroje VšĮ VUL SK Medicininės genetikos centre, Molekulinės genetikos ir citogenetikos laboratorijoje.

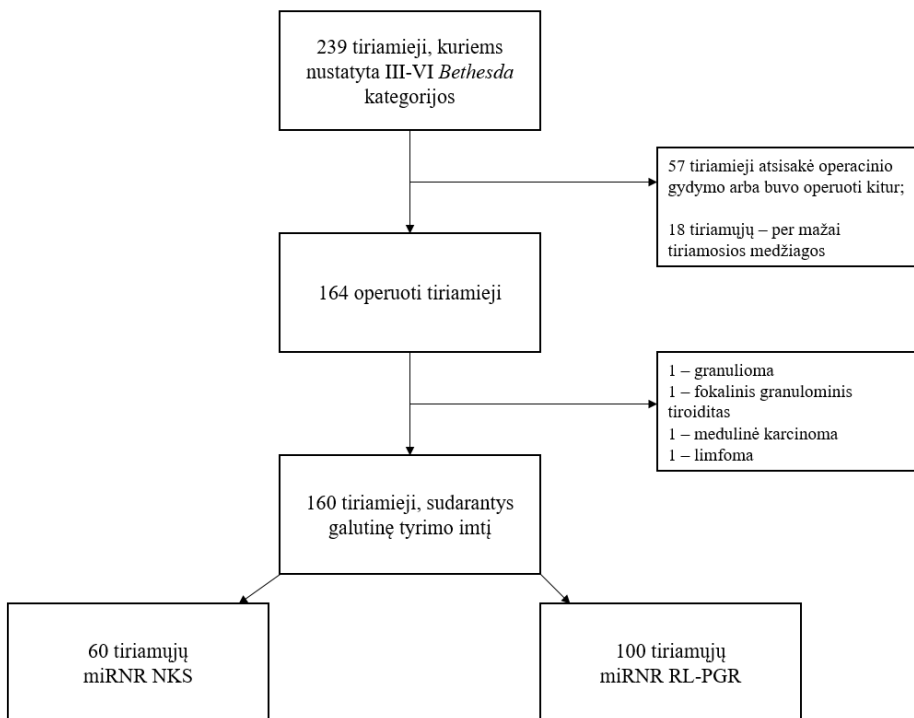
Vėliau 79 pacientai iš tyrimo buvo pašalinti, nes:

- 57 pacientai atsisakė chirurginio gydymo arba buvo išoperuoti kitose gydymo įstaigose,
- 18 pacientų skyd liaukės mazgų aspiratų citologiniuose mėginiuose buvo likę per mažai tiriamosios medžiagos molekuliniams genetiniams tyrimams atlikti,
- 4 pacientai netiko dėl histologinio skyd liaukės mazgo varianto (1 pacientui diagnozuota granuliozė, 1 - fokalinis granuliozinis tiroiditas, 1- medulinė karcinoma, 1- limfoma).

Pacientų įtraukimo ir atmetimo iš biomedicininio tyrimo schema pateikta 4 paveiksle.

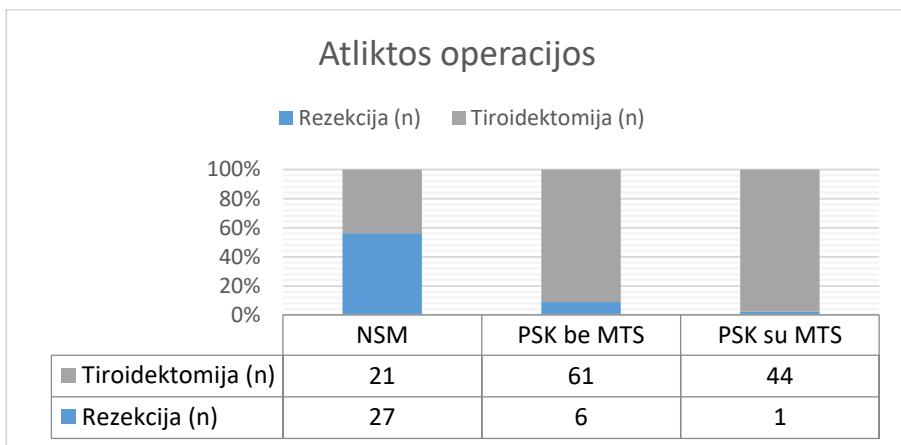
Galutinę tyrimo imtį sudarė 160 tiriamųjų, kurie atitiko įtraukimo į tyrimą kriterijus. Iš jų 28 (17,5 %) vyrai ir 132 (82,5 %) moterys; 34 (21,25 %) pacientams buvo atlikta skyd liaukės rezekcija (lobistektomija ar lobektomija), 126 (78,75 %) – tiroidektomija. 59 (36,88 %) pacientams kaklo limfmazgiai nešalinti, 79 (49,38 %) – atlikta profilaktinė CKLM limfadenektomija, 22 (13,75 %) – atlikta terapinė kaklo limfmazgių limfadenektomija, iš kurių 18 (81,8 %) – CKLM limfadenektomija ir 4 (18,2 %) – CKLM ir LKLM limfadenektomijos. 48 (30,0 %) pacientams histologiškai patvirtinti nepiktybiniai skyd liaukės mazgai (NSM) ir 112 (70,0 %) pacientų – PSK.

Atliktų skyd liaukės operacijų ir limfadenektomijų pasiskirstymas tarp tiriamųjų grupių pavaizduotas 5A ir 5B paveiksluose.

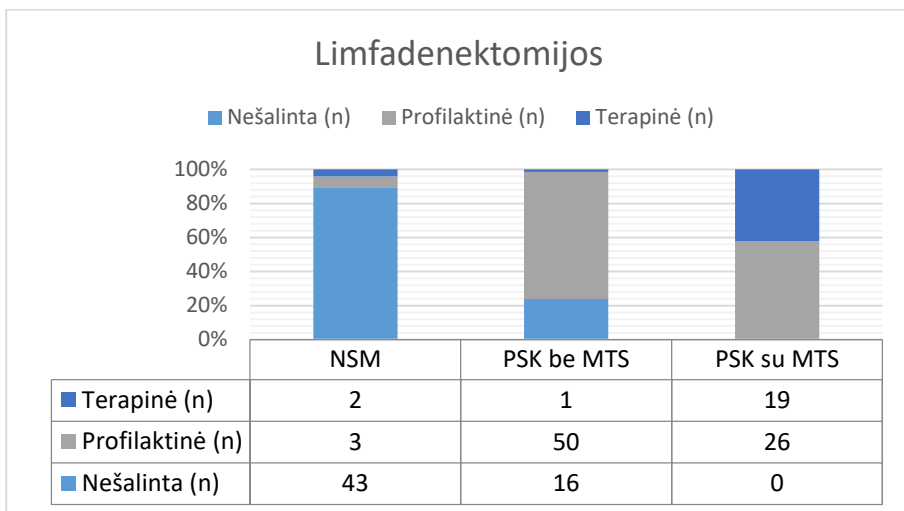


4 pav. Įtraukimo ir atmetimo į tyrimą schema.

NKS – naujos kartos sekoskaita. RL-PGR - realaus laiko polimerazės grandininė reakcija.



5A pav. Skydliaukės operacijų pasiskirstymas tiriamųjų grupėse.



5B pav. Limfadenektomijų pasiskirstymas tiriamųjų grupėse.

Vertinant *Bethesda* sistemos kategorijų pasiskirstymą PSK ir NSM grupėse, paaiškėjo, kad reikšmingai dažniau IV kategorija nustatyta NSM grupėje, o V ir VI kategorijos dažniau nustatytos PSK grupėje, ($p < 0,05$). III kategorija tarp NSM ir PSK grupių reikšmingai nesiskyrė, ($p = 0,62$). *Bethesda* sistemos kategorijų dažniai ir priklausomybių įvertinimai tarp grupių pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal *Bethesda* kategorijas

Bethesda kategorija	NSM (n, %)	PSK (n, %)	Viso (n, %)	P reikšmė
III	17 (10,6)	20 (12,5)	37 (23,1)	0,62*
IV	21 (13,1)	3 (1,9)	24 (15,0)	0,001**
V	6 (3,8)	23 (14,4)	29 (18,1)	0,001*
VI	4 (2,5)	66 (43,8)	70 (43,8)	<0,001**
Viso (n, %)	48 (30)	112 (70)	160 (100)	

*Pirsono χ^2 (chi kvadrato) kriterijus, **Tikslusis Fišerio kriterijus

I etape, pirmiesiems 60-čiai tiriamųjų buvo atliktas miRNR raiškos ištyrimas naujos kartos sekoskaitos metodu.

Šie tiriamieji pagal pooperacinį galutinį histologinį rezultatą, buvo paskirstyti į tris grupes: 12 (20 %) tiriamųjų su nepiktybiniais skyd liaukės mazgais, 33 (55 %) tiriamieji su piktybiniais mazgais be metastazių kaklo limfmazgiuose,

15 (25 %) tiriamųjų su piktybiniais mazgais su metastazėmis kaklo limfmazgiuose. Tiriamieji, kuriems histologiškai buvo patvirtinta PSK, bet nebuvo šalinti kaklo limfmazgiai, taip pat buvo priskirti prie tiriamųjų su piktybiniais mazgais be metastazių kaklo limfmazgiuose grupės.

II etape, likusiems 100-ai tiriamųjų pasirinktų miRNR (miR125a, miR146b, miR200b, miR221, miR222, miR4324) raiškos ištyrimui buvo atliktas RL-PRG tyrimas. Pastarieji pagal galutinį histologinį rezultatą taip pat buvo padalinti į analogiškas grupes: 36 (36 %) – nepiktybinių mazgų, 34 (34 %) – piktybinių be metastazių kaklo limfmazgiuose ir 30 (30 %) – piktybinių su metastazėmis kaklo limfmazgiuose. Kaip ir pirmo etapo metu, tiriamieji, kuriems histologiškai buvo patvirtinta PSK, bet nebuvo šalinti kaklo limfmazgiai, taip pat buvo priskirti prie tiriamųjų su piktybiniais mazgais be metastazių kaklo limfmazgiuose grupės. Bendra tiriamųjų grupių charakteristika pateikta 6 lentelėje.

6 lentelė. Tiriamųjų asmenų pasiskirstymas į grupes

	I etapas (NKS)	II etapas (RL-PGR)
Nepiktybiniai (n, %)	12 (20)	36 (36)
Amžius (metai, SN)*	50,3 (+/-14,5)	56,1 (+/-13,7)
Lytis (n, %):		
moterys	11 (91,7)	25 (69,4)
vyrai	1 (8,7)	11 (30,6)
PSK be MKLM (n, %)	33 (55)	34 (34)
Amžius (metai, SN)*	52,7 (+/-14,4)	47,5 (+/-15,4)
Lytis (n, %):		
moterys	29 (87,9)	30 (88,2)
vyrai	4 (12,1)	4 (11,8)
PSK su MKLM (n, %)	15 (25)	30 (30)
Amžius (metai, SN)*	44,0 (+/-14,6)	45,1 (+/-14,1)
Lytis (n, %):		
moterys	15 (100)	22 (73,3)
vyrai	0 (0)	8 (26,7)

*Simboliu pažymėti kiekybiniai kintamieji yra pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį, jų padėties charakteristikai aprašyti naudotas vidurkis su standartiniu nuokrypiu (SN).

NKS – naujos kartos sekoskaita, RL-PGR – realaus laiko PGR.

6.2. I etapas. miRNR ištyrimas naujos kartos sekoskaitos metodu

6.2.1. Bendrieji demografiniai – klinikiniai pacientų duomenys

Iš pirmųjų 60 tiriamųjų asmenų skydliaukės plonos adatos aspiratų medžiagos išskirtos RNR buvo ištirta miRNR raiška naujos kartos sekoskaitos metodu. Šiame etape į tyrimą buvo įtraukti 5 (8,3 %) vyrai ir 55 (91,7 %) moterys. Bendras tiriamųjų amžiaus vidurkis 50,3 +/-14,5 metų. 46 (76,7 %) tiriamiesiems buvo atlikta tiroidektomija, 14 (23,3 %) tiriamųjų atlikta skydliaukės rezekcija (lobektomija arba lobistmektomija). 16 (26,7 %) tiriamųjų kaklo limfmazgiai nebuvo šalinti, 38 (63,3 %) tiriamiesiems atlikta profilaktinė limfadenektomija, 4 (6,7 %) tiriamiesiems – terapinė centrinė limfadenektomija ir 2 (3,3 %) tiriamiesiems – terapinė centrinė bei radikali modifikuota šoninių kaklo limfmazgių limfadenektomija. Naviko mediana 12 (7) mm. 12 (20 %) tiriamųjų diagnozuoti nepiktybiniai skydliaukės mazgai, 48 (80 %) tiriamiesiems – papilinė skydliaukės karcinoma.

Skydliaukės karcinoma sergančiųjų grupę sudarė 4 (8,3 %) vyrai ir 44 (91,7 %) moterys. 43 (89,6 %) tiriamiesiems atlikta tiroidektomija ir 5 (10,4 %) tiriamiesiems – skydliaukės rezekcija (lobektomija arba lobistmektomija). 5 (10,4 %) tiriamiesiems kaklo limfmazgiai nebuvo šalinti, 37 (77,1 %) tiriamiesiems atlikta profilaktinė limfadenektomija, 4 (8,3 %) tiriamiesiems – terapinė centrinė limfadenektomija ir 2 (4,2 %) tiriamiesiems – terapinė centrinė bei radikali modifikuota šoninių kaklo limfmazgių limfadenektomija. 43 (89,5 %) tiriamiesiems buvo diagnozuota klasikinė PSK, 3 (6,3 %) tiriamiesiems diagnozuota PSK folikulinis variantas, 1 (2,1 %) tiriamajam aukštų ląstelių PSK ir 1 (2,1 %) tiriamajam onkocitinė PSK. Bendri PSK sergančių pacientų demografiniai klinikiniai požymiai pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. NKS etapo PSK sergančių tiriamųjų bendri demografiniai klinikiniai požymiai.

Požymis	Tiriamieji (n)	Procentai
Lytis		
<i>Vyrai/Moterys</i>	4/44	8,3/91,7
Amžius		
<i>≤55 metai/>55metai</i>	32/16	66,7/33,3
Naviko dydis (mm, IQR)^x		
10 (7)		
Naviko dydis		
<i>≤10mm (mikrokarcinoma)</i>	25	52,1
<i>>10mm (makrokarcinoma)</i>	23	47,9
Daugiažidiniškumas		
<i>Vienas židinytis/≥2 židiniai</i>	31/17	64,6/35,4
MTS kaklo limfmazgiuose		
<i>Ne/Taip</i>	33/15	68,75/31,25
Plitimas už skyd liaukės kapsulės		
<i>Ne/Taip</i>	26/22	54,2/45,8
Hašimoto tiroiditas		
<i>Ne/Taip</i>	27/21	56,25/43,75
Histologiniai potipiai		
<i>Klasikinė PSK</i>	43	89,5
<i>Folikulinis PSK variantas</i>	3	6,3
<i>Onkocitinė PSK</i>	1	2,1
<i>Aukštųjų ląstelių</i>	1	2,1
T kategorija (TNM)		
<i>T1</i>	32	66,7
<i>T2</i>	4	8,3
<i>T3</i>	12	25
<i>T4</i>	0	0
N kategorija (TNM)		
<i>N0</i>	33	68,75
<i>N1a</i>	13	27,08
<i>N1b</i>	2	4,17
M kategorija (TNM)		
<i>M0</i>	47	97,9
<i>M1</i>	1	2,1

7 lentelės tęsinys

Operacija		
<i>Skydliaukės rezekcija/Tiroidektomija</i>	5/43	10,4/89,6
Limfadenektomija n = 43		
<i>Profilaktinė CKLM</i>	37	86,0
<i>Terapinė CKLM</i>	4	9,3
<i>Terapinė CKLM ir LKLM</i>	2	4,7

^x Simboliu pažymėtas kiekybinis kintamasis nėra pasiskirstęs pagal normalųjį dėsnį, jo padėties charakteristikai aprašyti naudota mediana su kvartilų skirtumu (IQR).

6.2.2. miRNR raiškos ištyrimo naujos kartos sekoskaitos metodu rezultatai

Lyginant miRNR raiškos skirtumus, buvo atliktos dvi analizės:

1) pacientų (n = 33), sergančių PSK be metastazių kaklo limfmazgiuose ir pacientų (n = 15), sergančių PSK su metastazėmis kaklo limfmazgiuose, grupių;

2) pacientų (n = 12), sergančių nepiktybiniais skydliaukės mazgais ir pacientų (n = 48), kuriems diagnozuota PSK, grupių. PSK grupė suformuota apjungus abi PSK grupes PSK su MTS ir PSK be MTS.

Lyginant PSK su MTS ir PSK be MTS grupes, į analizę buvo įtrauktos tos miRNR, kurių vidutinis sekų skaičius mėginyje buvo didesnis nei 20, statistiškai patikimu laikytas pokytis, kai raiška didėja/mažėja >2 , $p < 0,05$. Nustatytos 10 miRNR, kurių pokytis kartais skyrėsi reikšmingai (6A paveikslas). Labiausiai tarp tiriamų grupių skyrėsi miR4324 raiška ir miR200B raiška (8 lentelė).

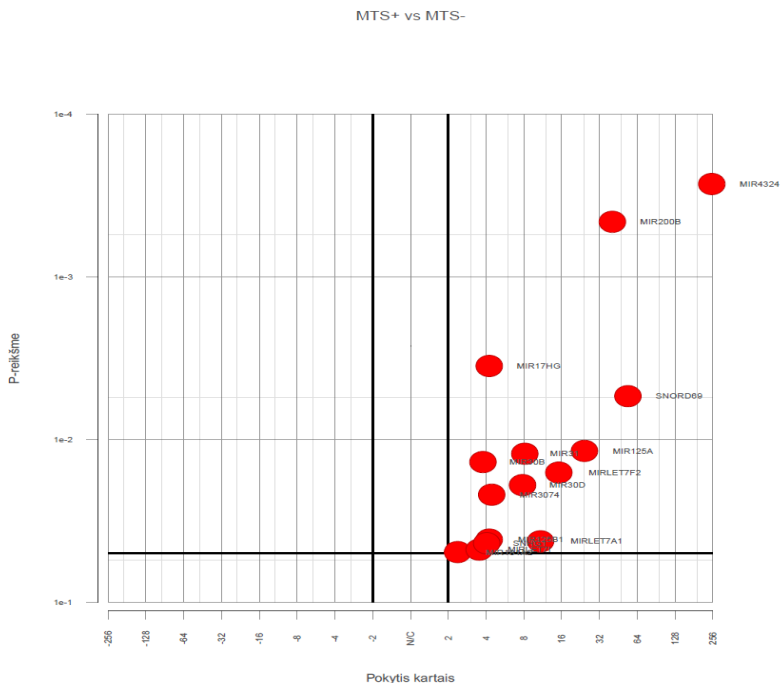
Lyginant PSK su nepiktybinių mazgų grupe, į analizę buvo įtrauktos tos miRNR, kurių vidutinis sekų skaičius mėginyje buvo didesnis nei 0, statistiškai patikimu laikytas pokytis, kai raiška didėja >2 , $p < 0,05$. Nustatytos 12 miRNR, kurių pokytis kartais skyrėsi reikšmingai (6B paveikslas). Labiausiai tarp tiriamų grupių skyrėsi miR4324 ($p < 0,02$), miR200B ($p < 0,02$) ir miR125A ($p < 0,03$) raiška.

Iš reikšmingai besiskiriančių miRNR tarp PSK ir nepiktybinių mazgų, bei tarp PSK su MTS ir PSK be MTS, šešios miRNR (miR4324, miR200B, miR125A, miRLET7A1, miRLET7F2, miR30D) sutapo. Iš jų trys labiausiai besiskiriančios miRNR: miR4324, miR200B, miR125A, buvo atrinktos tolimesniam patvirtinimo etapui. Atlikus literatūros apžvalgą [113], dar trys miRNR: miR146B, miR221 ir miR222, kurios daugiausia aprašytos tiek

diferencijuojant PSK su nepiktybiniais skydliaukės susirgimais, tiek diferencijuojant agresyvesnes PSK formas, buvo pasirinktos tolimesniam ištyrimui.

8 lentelė. miRNR, kurių raiška pakitusi PSK su MTS mėginiuose, lyginant su PSK be MTS, sąrašas.

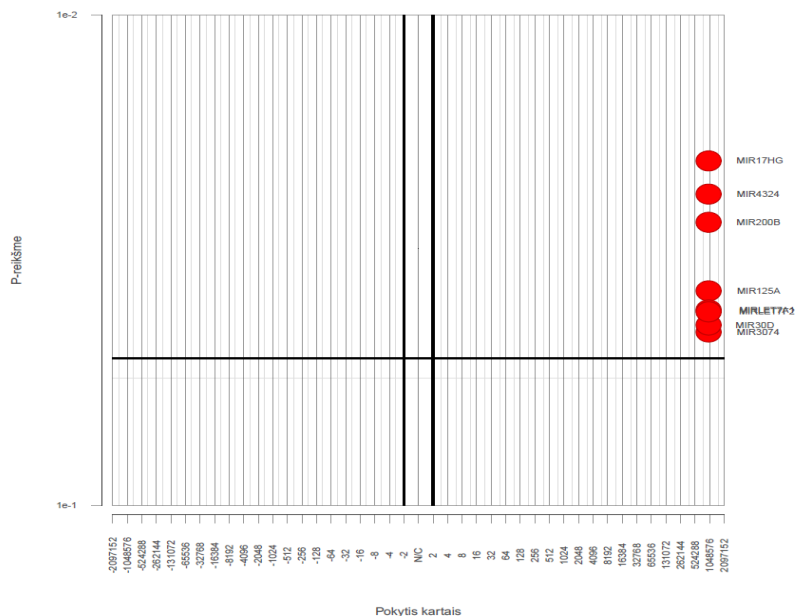
miRNR	Pokytis kartais	p-reiškė
miR4324	250,87	<0,001
miR200B	40,54	<0,001
miR125A	24,29	0,01
miR31	8,13	0,01
miR30B	3,78	0,01
miRLET7F2	15,17	0,02
miR30D	7,80	0,02
miR3074	4,43	0,02
miR125B	4,24	0,04
miRLET7A1	10,84	0,04



6A pav. miRNR raiškos naujos kartos sekoskaitos metodu rezultatai.

Reikšmingai besiskiriančias miRNR tarp PSK su MTS ir PSK be MTS.

PSK vs Nepiktybiniai



6B pav. miRNR raiškos naujos kartos sekoskaitos metodu rezultatai.

Reikšmingai besiskiriančias miRNR tarp PSK ir nepiktybinių mazgų.

6.3. II etapas. miRNR raiškos pokyčių patvirtinimas realaus laiko PGR metodu

6.3.1. Bendrieji demografiniai – klinikiniai pacientų duomenys.

Tiriant skydliaukės mazgų aspiratų mėginius, dėl gana didelės duomenų variacijos, būtina raiškos pokyčius patvirtinti kuo didesnėje tiriamųjų imtyje. Kadangi sekoskaita buvo vykdyta ribotoje mėginių imtyje, todėl toliau pasirinktų miRNR raiška buvo įvertinta RL-PGR metodu.

Šiame etape į tyrimą įtraukta 100 tiriamųjų. Dalyvavo 77 (77 %) moterys ir 23 (23 %) vyrai. Bendras tiriamųjų amžiaus vidurkis 49,7+/-15,2 metai. 80 (80 %) tiriamųjų atlikta totali tiroidektomija, 20 (20 %) tiriamųjų – skydliaukės rezekcija (lobistmektomija ar lobektomija). 43 (43 %) tiriamiesiems kaklo limfmazgiai nešalinti, 41 (41 %) tiriamajam atlikta profilaktinė centrinių kaklo limfmazgių limfadenektomija, 13 (13 %)

tiriamųjų atlikta terapinė centrinių kaklo limfmazgių limfadenektomija, 3 (3 %) tiriamiesiems – terapinė centrinė bei radikali modifikuota šoninių kaklo limfmazgių limfadenektomija. 36 (36%) tiriamiesiems po operacijos histologiškai buvo patvirtinti nepiktybiniai skydliaukės mazgai ir 64 (64 %) tiriamiesiems histologiškai diagnozuota PSK. Pagal galutinę histologinę diagnozę pacientai buvo paskirstyti į NSM (n = 36) ir PSK (n = 64) grupes, kurių pastaroji dar buvo padalinta į PSK be MTS (n = 34) ir PSK su MTS kaklo limfmazgiuose (n = 30) grupes. Tiriamiesiems, kuriems buvo nustatyta PSK, tačiau kaklo limfmazgiai nešalinti, taip pat pateko į PSK be MTS grupę. Tiriamųjų pasiskirstymas į tiriamąsias grupes ir visų tiriamųjų demografiniai – klinikiniai duomenys pateikti 9 lentelėje.

PSK tiriamųjų tarpe iki 55 metų amžiaus asmenys sudarė 71,9 %, o vyresni nei 55 metai 28,1 %. 21 (32,8 %) tiriamajam buvo diagnozuota mikrokarcinoma (≤ 10 mm) ir 43 (67,2 %) tiriamiesiems – makrokarcinoma (>1 mm). 53 (82,8 %) PSK tiriamiesiems buvo atlikta limfadenektomija, iš kurių 34 (64,2 %) tiriamiesiems buvo rastos metastazės, likusiems 19 (35,8 %) tiriamųjų pašalintuose limfmazgiuose metastazių nebuvo rasta. Net 23 (67,6 %) PSK be MTS grupės tiriamiesiems buvo atlikta profilaktinė CKLM limfadenektomija.

58 (90,6 %) tiriamiesiems buvo diagnozuota klasikinė PSK, 5 (7,8 %) tiriamiesiems diagnozuota PSK folikulinis variantas, 2 (3,1 %) ir 1 (1,6 %) tiriamajam – solidinė-trabekulinė PSK.

Bendri PSK sergančių tiriamųjų demografiniai, klinikiniai požymiai pateikti 10 lentelėje.

9 lentelė. RL-PGR etapo tiriamosios grupės. Demografiniai – klinikiniai duomenys.

Požymis	NSM n = 36	PSK be MKLM n = 34	PSK su MKLM n = 30
Lytis (n, %): Vyrai Moterys	11 (30,6) 25 (69,4)	4 (11,8) 30 (88,2)	8 (26,7) 22 (73,3)
Amžius (metai, SN)* ≤55 metai (n, %) >55 metai (n, %)	56,1 (+/-13,7) 16 (44,4) 20 (55,6)	47,5 (+/-15,4) 23 (67,6) 11 (32,4)	45,1 (+/-14,1) 23 (76,7) 7 (23,3)
<i>Bethesda</i> kategorija (n, %): III IV V VI	12 (33,3) 19 (52,8) 3 (8,3) 2 (5,6)	7 (20,6) 1 (2,9) 5 (14,7) 21 (61,8)	5 (16,7) 1 (3,3) 8 (26,7) 16 (53,3)
Skydliaukės funkcija (n, %): Eutireozė Hipertireozė Hipotireozė	29 (80,6) 5 (13,8) 2 (5,6)	26 (76,5) 2 (5,9) 6 (17,6)	25 (83,4) 1 (3,3) 4 (13,3)
Atlikta operacija (n, %): Lobektomija/lobistektomija Tiroidektomija	18 (50,0) 18 (50,0)	2 (5,9) 32 (94,1)	0 (0,0) 30 (100,0)
Limfadenektomija (n, %):	4 (11,1)	23 (67,6)	30 (100,0)
Naviko dydis (mm, IQR) ^x ≤10 mm (n, %) >10 mm (n, %)	25,0 (12,3) 4 (11,1) 32 (88,9)	11,5 (10,0) 16 (47,1) 18 (52,9)	14,0 (9,0) 5 (16,7) 25 (83,3)
Hašimoto tiroiditas (n, %) Taip Ne	6 (16,7) 30 (83,3)	12 (35,3) 22 (64,7)	10 (30,3) 20 (70,7)

*Simboliu pažymėtas kiekybinis kintamasis yra pasiskirstęs pagal normalųjį dėsnį, jo padėties charakteristikai aprašyti naudotas vidurkis su standartiniu nuokrypiu (SN).

^x Simboliu pažymėtas kiekybinis kintamasis nėra pasiskirstęs pagal normalųjį dėsnį, jo padėties charakteristikai aprašyti naudota mediana su kvartilų skirtumu (IQR).

10 lentelė. RL-PGR etapo, PSK sergančiųjų tiriamųjų bendri demografiniai, klinikiniai duomenys.

Požymis	Tiriamieji (n)	Procentai
Lytis		
<i>Vyrai</i>	12	18,75
<i>Moterys</i>	52	81,25
Amžius		
<i>≤55 metai</i>	46	71,9
<i>>55 metai</i>	18	28,1
Naviko dydis (mm, IQR)^x	13 (10,5)	
Naviko dydis		
<i>≤10 mm (mikrokarcinoma)</i>	21	32,8
<i>>10 mm (makrokarcinoma)</i>	43	67,2
Daugiažidiniškumas		
<i>Vienas židiny</i>	41	64,1
<i>Daugybiniai židiniai (≥2)</i>	23	35,9
MTS kaklo limfmazgiuose		
<i>Ne</i>	34	53,1
<i>Taip</i>	30	46,9
Plitimas už skydliaukės kapsulės		
<i>Ne</i>	40	62,5
<i>Taip</i>	24	37,5
Hašimoto tiroiditas		
<i>Ne</i>	42	65,6
<i>Taip</i>	22	34,4
Histologiniai subtipai		
<i>Klasikinė PSK</i>	56	87,5
<i>Folikulinis PSK variantas</i>	5	7,8
<i>Kiti (solidinis-trabekulinis; konvencinis)</i>	3	4,7
T kategorija (TNM)		
<i>T1</i>	49	76,5
<i>T2</i>	9	14,1

10 lentelės tęsinys

<i>T3</i>	5	7,8
<i>T4</i>	1	1,6
N kategorija (TNM)		
<i>N0</i>	34	53,1
<i>N1a</i>	22	34,4
<i>N1b</i>	8	12,5
M kategorija (TNM)		
<i>M0</i>	62	96,9
<i>M1</i>	2	3,1
Operacija		
<i>Lobistmektomija</i>	2	3,1
<i>Tiroidektomija</i>	62	96,9
Limfadenektomija		
<i>Profilaktinė centrinių kaklo limfmazgių</i>	39	73,59
<i>Terapinė centrinių kaklo limfmazgių</i>	11	20,75
<i>Terapinė centrinių ir lateralinių kaklo limfmazgių</i>	3	5,66

^x Simboliu pažymėtas kiekybinis kintamasis nėra pasiskirstęs pagal normalųjį dėsnį, jo padėties charakteristikai aprašyti naudota mediana su kvartilų skirtumu (IQR).

6.3.2. Parinktų miRNR raiškos pokyčių patvirtinimo RL-PGR metodu rezultatai

Šiam etapui buvo pasirinktos 6 miRNR: miR125A, miR200B, miR146B, miR221, miR222 ir 4324. Kadangi miR222 RL-PGR tyrimo metu nebuvo gautos gausinimo kreivės, todėl ši miRNR į tolimesnę analizę nebuvo įtraukta.

Pasirinktų miRNR santykinės raiškos skirtumų įvertinimas pagal klinikinius demografinius PSK tiriamųjų požymius.

Nesant duomenų pasiskirstymui pagal normalųjį dėsnį, dviejų grupių duomenys lyginti naudojant Mano-Vitnio kriterijų. miRNR santykinės raiškos medianos ir kvartilų skirtumai pateikti 11 lentelėje.

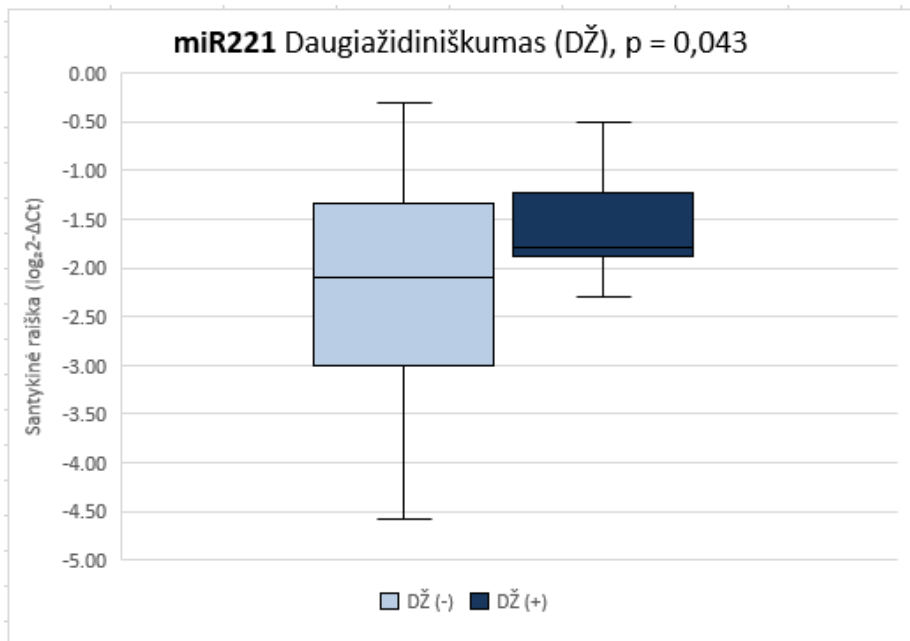
11 lentelė. miRNR santykinės raiškos palyginimas tarp klinikinių – demografinių PSK požymių.

Klinikinis požymis	n	miR125A	miR146B	miR200B	miR221	miR4324
Naviko dydis						
≤10mm	21	0,53 (0,46)	-0,10 (0,42)	-2,35 (1,84)	-1,79 (1,14)	0,49 (0,50)
>10mm	43	0,37 (0,43)	-0,21 (0,42)	-2,52 (1,70)	-1,84 (1,62)	0,36 (0,38)
<i>p</i> reikšmė		0,183	0,424	0,426	0,424	0,183
DŽ						
<i>Ne</i>	40	0,37 (0,49)	-0,23 (0,44)	-2,68 (2,28)	-2,10 (1,77)	0,37 (2,09)
<i>Taip</i>	24	0,53 (0,64)	-0,10 (0,29)	-2,35 (0,99)	-1,79 (0,81)	0,58 (0,48)
<i>p</i> reikšmė		0,127	0,084	0,258	0,043*	0,107
Plitimas už skyd liaukės kapsulės						
<i>Ne</i>	40	0,40 (0,38)	-0,10 (0,41)	-2,35 (2,16)	-1,79 (1,15)	0,39 (0,40)
<i>Taip</i>	24	0,53 (0,64)	-0,24 (0,48)	-2,35 (1,22)	-1,93 (1,63)	0,47 (0,46)
<i>p</i> reikšmė		<0,001*	<0,001*	0,164	0,027*	<0,001*
Amžius						
≤55 m.	46	0,40 (0,37)	-0,18 (0,41)	-2,35 (1,72)	-1,94 (1,37)	0,37 (0,35)
>55 m.	18	0,53 (0,86)	-0,10 (0,65)	-2,35 (1,70)	-1,79 (1,11)	0,57 (0,56)
<i>p</i> reikšmė		0,931	0,996	0,867	0,268	0,278
HT						
<i>Ne</i>	42	0,40 (0,47)	-0,14 (0,41)	-2,35 (1,89)	-1,79 (0,99)	0,40 (0,39)
<i>Taip</i>	22	0,47 (0,40)	-0,18 (0,52)	-2,35 (1,78)	-1,90 (1,87)	0,48 (0,51)
<i>p</i> reikšmė		0,849	0,874	0,496	0,985	0,409
Lytis						
<i>Vyrai</i>	12	0,41 (0,36)	-0,21 (0,31)	-2,68 (0,93)	-1,81 (1,34)	0,35 (0,56)
<i>Moterys</i>	52	0,44 (0,46)	-0,10 (0,42)	-2,35 (1,92)	-1,82 (0,72)	0,46 (0,44)
<i>p</i> reikšmė		0,705	0,509	0,286	0,874	0,161

Mano-Vitnio U testas, santykinė raiška ($\log_2 2^{-\Delta Ct}$), mediana ir kvartilų skirtumas; * $p < 0.05$. DŽ – daugiažidiniškumas; HT – Hashimoto tiroiditas.

Visų penkių miRNR raiškos lygis buvo panašus tiriamųjų, turinčių mikrokarcinomą (naviko dydis ≤ 10 mm) ir tiriamųjų, kuriems nustatyto naviko dydis buvo >10 mm, grupėse.

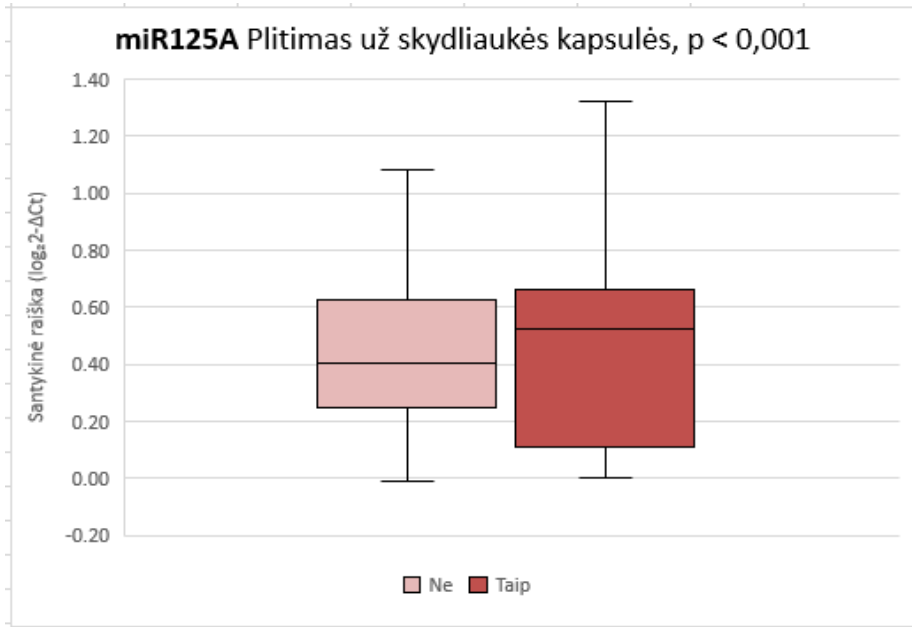
Reikšmingai didesnė miR221 santykinė raiška ($p = 0,043$) nustatyta tarp tiriamųjų, kuriems buvo nustatyta daugiažidininė karcinoma, lyginant su tais, kuriems diagnozuota solitarinė karcinoma (7 paveikslas). Kitų miRNR raiškos skirtumų tarp daugiažidininės ir solitarinės karcinomos grupių nebuvo nustatyta.



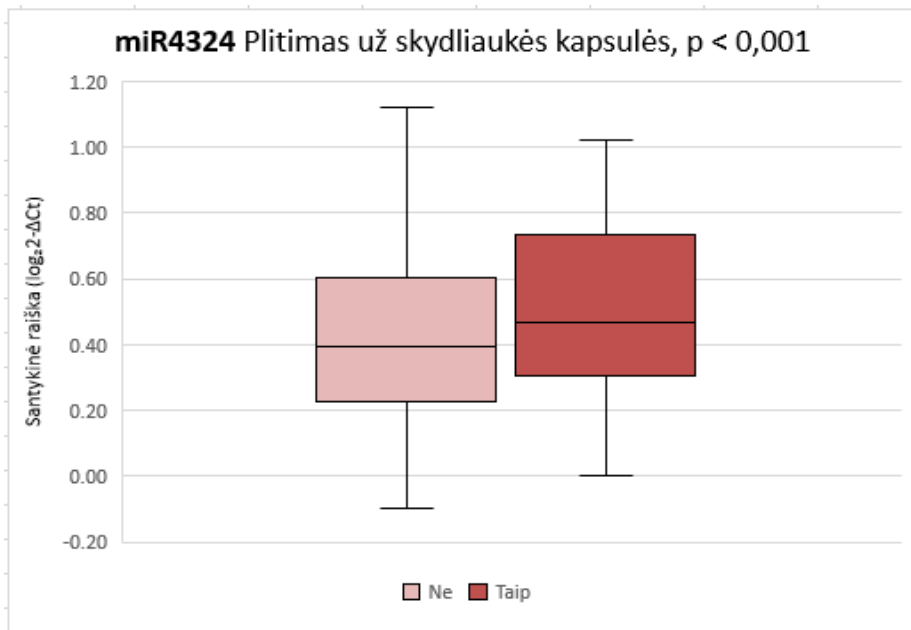
7 pav. miR221 santykinės raiškos palyginimas tarp solitarinės ir daugiažidininės PSK.

Reikšmingai didesnė santykinė raiška miR125A ($p < 0,001$) ir miR4324 ($p < 0,001$) stebėta tarp tiriamųjų, kuriems buvo nustatytas naviko plitimas už skydliaukės kapsulės, lyginant su tiriamaisiais, kurių PSK neplito už skydliaukės kapsulės (8A, 8B paveikslai). Tuo tarpu, reikšmingai didesnė santykinė raiška miR146B ($p < 0,001$) ir miR221 ($p = 0,027$) buvo tiriamųjų, kurių PSK neplito už skydliaukės kapsulės (8C, 8D paveikslai). miR200B raiškos skirtumo tarp plintančios už ir neplintančios už skydliaukės kapsulės ribų karcinomos tiriamųjų grupių nebuvo nustatyta.

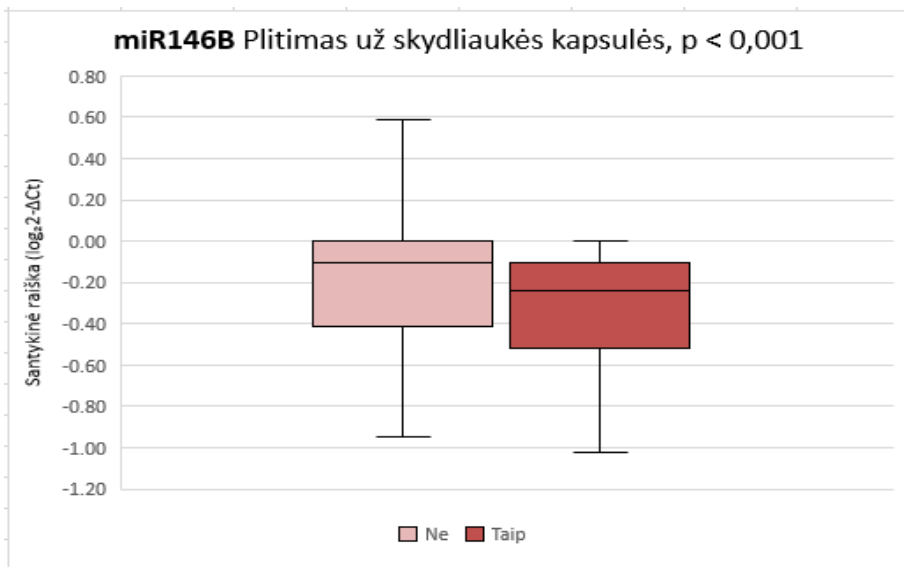
Reikšmingų miRNR raiškos skirtumų tarp kitų klinikinių požymių, tokių kaip pacientų lytis, amžiaus grupė, naviko dydis, lydintis *Hashimoto* tiroiditas, nebuvo nustatyta.



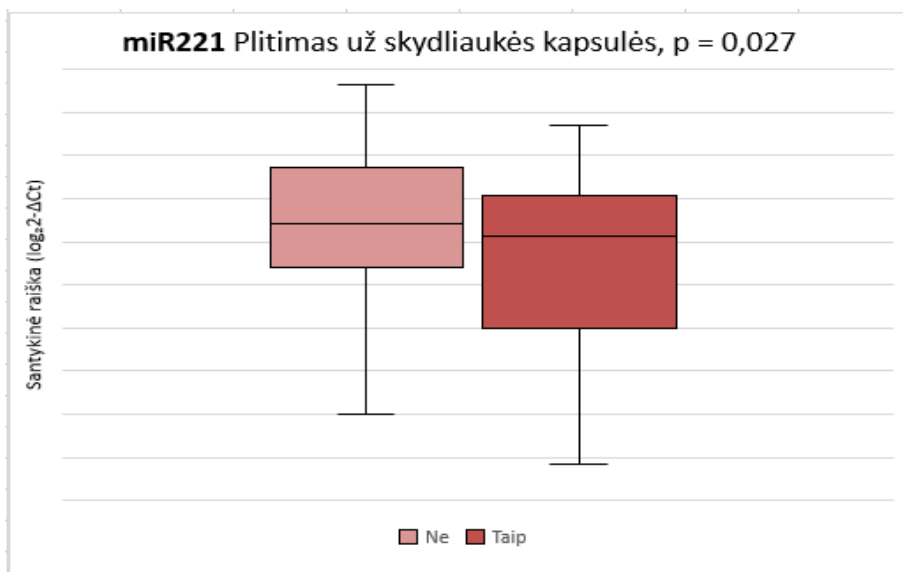
8A pav. miR125A santykinės raiškos palyginimas tarp PSK plintančios ir neplintančios už skyd liaukės kapsulės.



8B pav. miR4324 santykinės raiškos palyginimas tarp PSK plintančios ir neplintančios už skydliaukės kapsulės.



8C pav. miR146B santykinės raiškos palyginimas tarp PSK plintančios ir neplintančios už skydliaukės kapsulės.



8D pav. miR221 santykinės raiškos palyginimas tarp PSK plintančios ir neplintančios už skydliaukės kapsulės.

Pasirinktų miRNR santykinės raiškos palyginimas tarp tiriamųjų grupių.

Pirmiausia pasirinktų miRNR (miR125A, miR200B, miR146B, miR221, miR4324) raiškos lygiai buvo analizuojami tarp PSK be MTS (n = 34), PSK su MTS (n = 30) ir NSM (n = 36) grupių. Nesant duomenų pasiskirstymui pagal normalųjį dėsnį, lyginant daugiau nei 2 grupes, taikytas Kruskalo-Voliso kriterijus. Keturių miRNR (miR125A, miR146B, miR221 ir miR4324) raiškos lygiai tarp grupių reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$). miR200B raiškos skirtumas nebuvo reikšmingas ($p = 0,129$). Visų miRNR santykinės raiškos medianos ir kvartilų skirtumai pateikti 12 lentelėje.

12 lentelė. miRNR santykinės raiškos palyginimas tarp NSM, PSK be MTS ir PSK su MTS grupių.

	NSM	PSK be MTS	PSK su MTS	P reikšmė
miR125A	0,02 (0,38)	0,53 (0,46)	0,37 (0,43)	0,001
miR146B	-1,49 (1,15)	-0,10 (0,20)	-0,41 (0,53)	<0,001
miR200B	-2,74 (1,55)	-2,35 (1,51)	-2,68 (1,71)	0,129
miR221	-2,34 (1,02)	-1,79 (1,20)	-2,30 (1,68)	0,024
miR4324	-0,12 (0,20)	0,58 (0,43)	0,35 (0,31)	<0,001

Kruskalo-Voliso testo rezultatai. Pateiktos santykinės raiškos ($\log_2-\Delta Ct$) medianos ir kvartilų skirtumas.

Kadangi visų miRNR santykinės raiškos lygiai skirtingi, tai atskiros miRNR raiška vėliau pateiktuose grafikuose pavaizduota skirtingose skalėse.

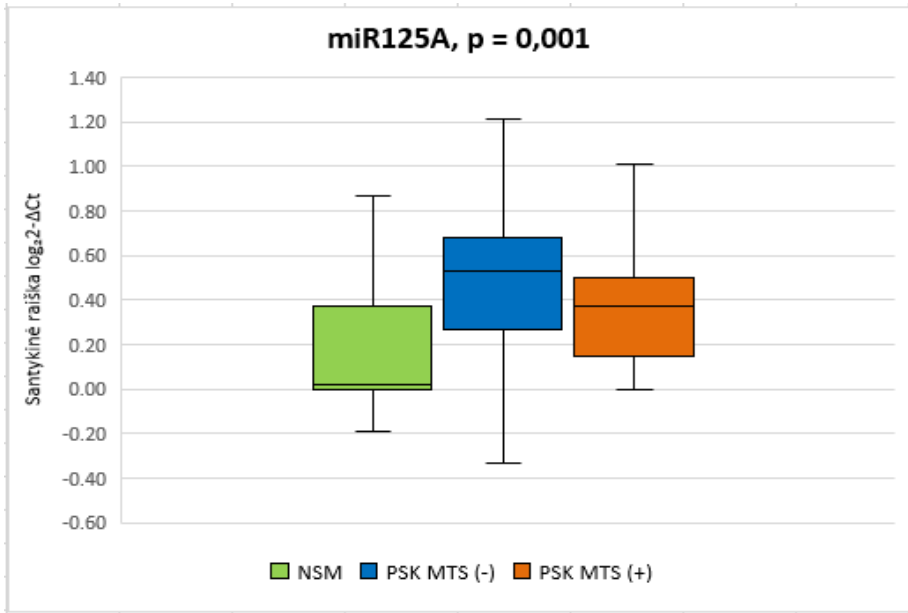
miR125A santykinė raiška reikšmingai skyrėsi tarp trijų tiriamųjų grupių ($p = 0,001$). miR125A santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 9A paveiksle.

miR146B santykinė raiška reikšmingai skyrėsi tarp trijų tiriamųjų grupių ($p < 0,001$). miR146B santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 9B paveiksle.

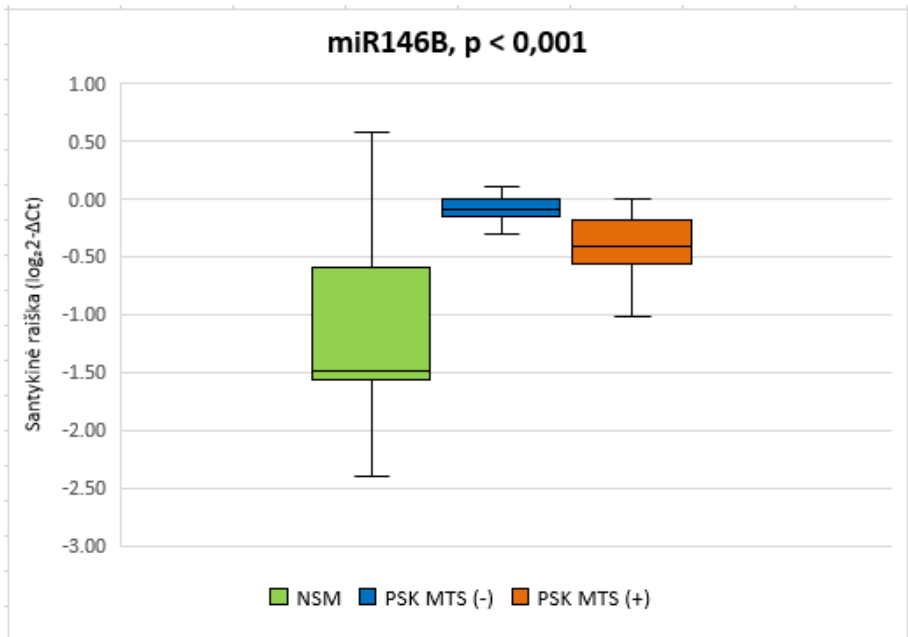
miR221 santykinė raiška reikšmingai skyrėsi tarp trijų tiriamųjų grupių ($p = 0,024$). miR221 santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 9D paveiksle.

miR4324 santykinė raiška reikšmingai skyrėsi tarp trijų tiriamųjų grupių ($p < 0,001$). miR4324 santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 9D paveiksle.

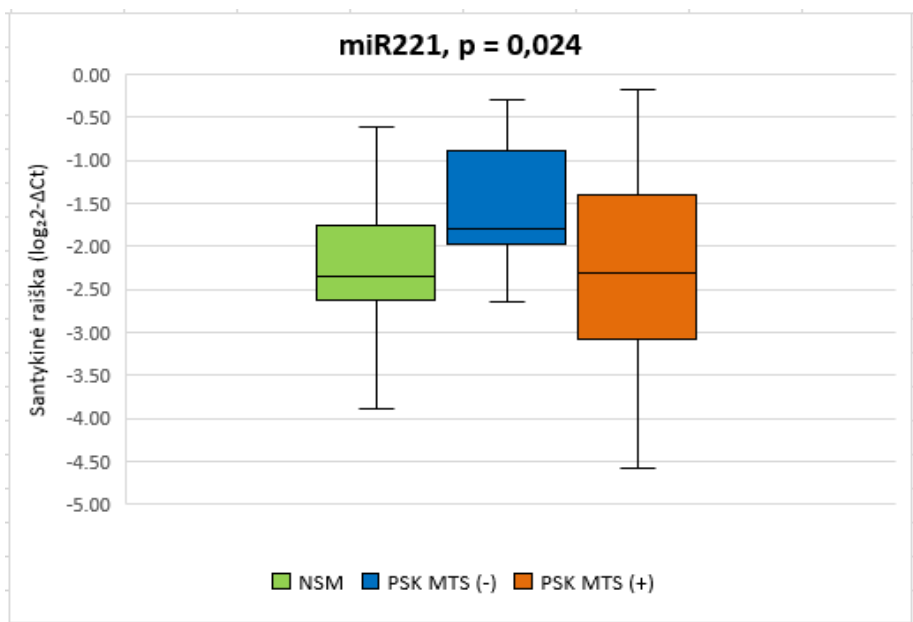
miR200B santykinė raiška reikšmingai nesiskyrė tarp trijų tiriamųjų grupių ($p = 0,129$). miR200B santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 9E paveiksle.



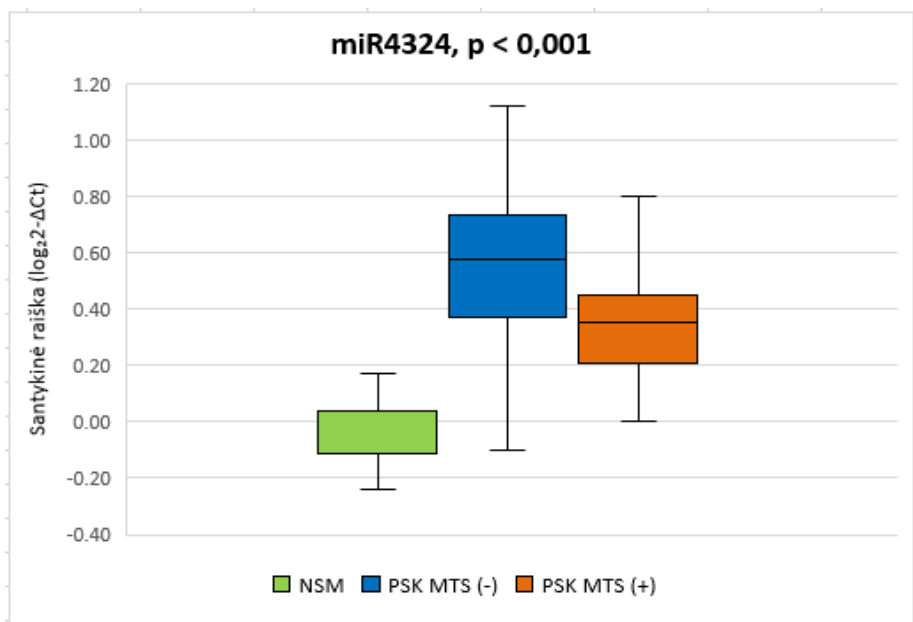
9A pav. miR125A santykinės raiškos palyginimas tarp NSM, PSK be MTS ir PSK su MTS grupių. Kruskalo-Voliso testas.



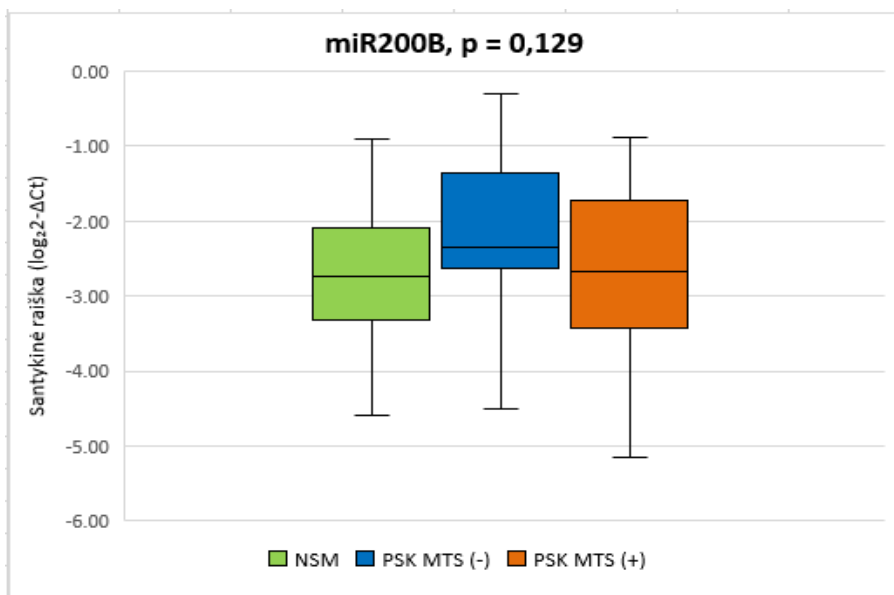
9B pav. miR146B santykinės raiškos palyginimas tarp NSM, PSK be MTS ir PSK su MTS grupių. Kruskalo-Voliso testas.



9C pav. miR221 santykinės raiškos palyginimas tarp NSM, PSK be MTS ir PSK su MTS grupių. Kruskalo-Voliso testas.



9D pav. miR4324 santykinės raiškos palyginimas tarp NSM, PSK be MTS ir PSK su MTS grupių. Kruskalo-Voliso testas.



9E pav. miR200A santykinės raiškos palyginimas tarp NSM, PSK be MTS ir PSK su MTS grupių. Kruskalo-Voliso testas.

Pagal miRNR prognozuojant tiriamojo priskyrimą konkrečiai histologinei kategorijai – nepiktybinių skydliaukės mazgų, papilinės skydliaukės karcinomos be MTS ar papilinės skydliaukės karcinomos su MTS, pritaikyta daugianarė logistinė regresija. Kadangi logistinėje regresijoje skaičiuojamas sėkmės ir nesėkmės santykis, tai analizės rezultatai pateikiami šansų santykių pavidalu. Į modelį buvo įtraukti 2 regresoriai – miR146b ir miR4234. Kontrolinė kategorija pasirinkta nepiktybinių skydliaukės mazgų grupė. Modelis gerai tiko duomenims. Teisingai klasifikuota: PSK be metastazių 70,6 %, PSK su MTS 56,7 %, NSM 72,2 %, bendrai teisingai klasifikuoja 67 %. Nagelkerkės determinacijos pseudokoefficientas $R^2 = 0,552$. Modelio tikėtinumų santykio kriterijaus statistika $\chi^2 = 67,406$, $p < 0,01$. Sprendžiant iš tikėtinumų santykių kriterijų, regresoriai yra statistiškai reikšmingi.

miR146B reikšmės padidėjimas vienetu 16,0 kartų padidina galimybę (šansų santykis), kad susirgimas bus piktybinis be metastazių negu nepiktybinis (95% PI [4,188; 61,148]).

miR146B reikšmės padidėjimas vienetu 4,2 karto padidina galimybę (šansų santykis), kad susirgimas bus piktybinis su metastazėmis negu nepiktybinis (95% PI [1,692; 10,366]).

miR4324 reikšmės padidėjimas vienetu 31,9 karto padidina galimybę (šansų santykis), kad susirgimas bus piktybinis be metastazių negu nepiktybinis (95% PI [5,966; 170,765]).

miR4324 reikšmės padidėjimas vienetu 8,3 karto padidina galimybę (šansų santykis), kad susirgimas bus piktybinis su metastazėmis negu nepiktybinis (95% PI [2,155; 31,977]).

Toliau atliktas miRNR santykinių raiškų palyginimas tarp tiriamųjų (n = 36), sergančių nepiktybiniais skyd liaukės mazgais ir tiriamųjų (n = 64), kuriems diagnozuota PSK, grupių. PSK grupė suformuota apjungus abi PSK grupes PSK su MTS ir PSK be MTS. Nesant duomenų pasiskirstymui pagal normalųjį dėsnį, dviejų grupių duomenys lyginti naudojant Mano-Vitnio kriterijų. Visų miRNR santykinės raiškos medianos ir kvartilų skirtumai pateikti 13 lentelėje.

13 lentelė. miRNR santykinės raiškos palyginimas tarp NSM ir PSK grupių.

	NSM	PSK	P reikšmė
miR125A	0,02 (0,38)	0,44 (0,43)	<0,001
miR146B	-1,49 (1,15)	-0,14 (0,42)	<0,001
miR200B	-2,74 (1,55)	-2,35 (1,79)	0,135
miR221	-2,34 (1,02)	-1,81 (1,10)	0,032
miR4324	-0,12 (0,2)	0,42 (0,40)	<0,001

Mano-Vitnio testo rezultatai. Pateiktos santykinės raiškos ($\log_2\Delta Ct$) medianos ir kvartilų skirtumas.

Kadangi visų miRNR santykinės raiškos lygiai skirtingi, tai atskiros reikšmingai besiskiriančios miRNR raiškos vėliau pateiktuose grafikuose pavaizduotos skirtingose skalėse.

miR125A santykinė raiška reikšmingai didesnė sergančiųjų PSK grupėje lyginant su nepiktybinių skyd liaukės mazgų grupe, ($p < 0,001$). miR125A santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 10A paveiksle.

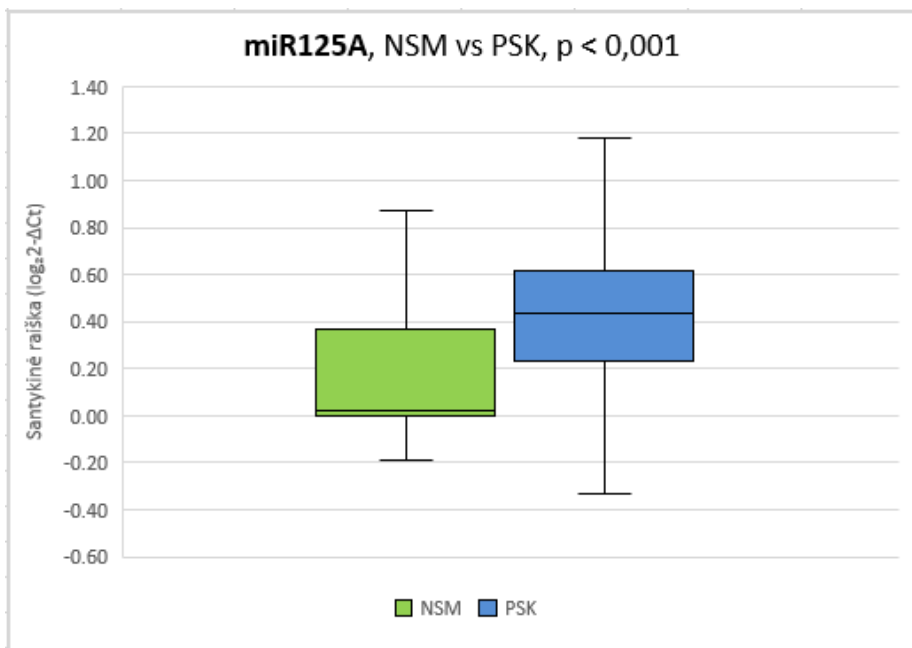
miR146B santykinė raiška reikšmingai didesnė sergančiųjų PSK grupėje lyginant su nepiktybinių skyd liaukės mazgų grupe, ($p < 0,001$). miR146B santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 10B paveiksle.

miR221 santykinė raiška reikšmingai didesnė sergančiųjų PSK grupėje lyginant su NSM grupe, ($p = 0,032$). miR221 santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 10C paveiksle.

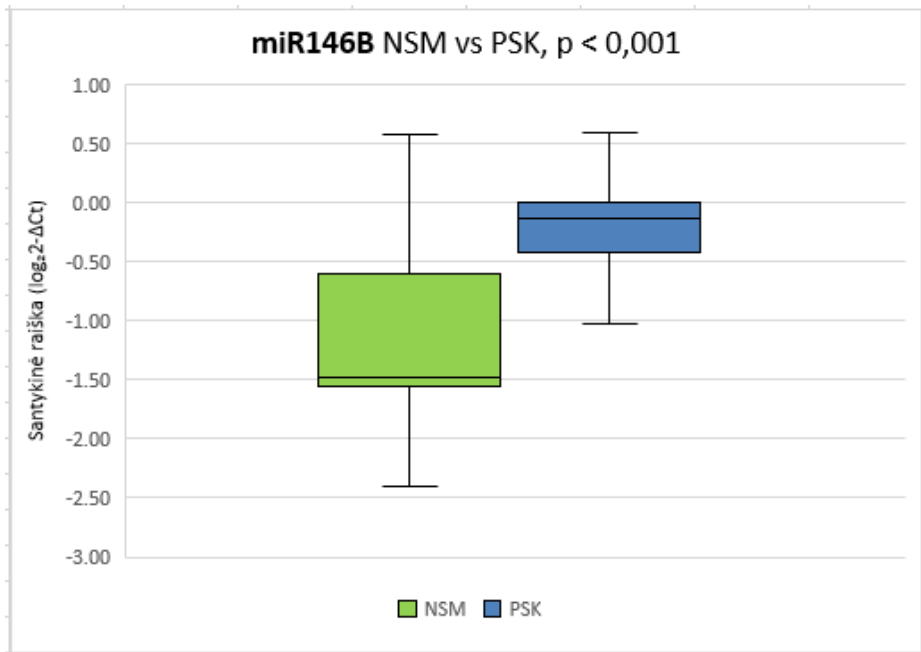
miR4324 santykinė raiška reikšmingai didesnė sergančiųjų PSK grupėje lyginant su NSM grupe, ($p < 0,001$). miR4324 santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 10D paveiksle.

miR200B santykinė raiška tarp PSK ir NSM grupių reikšmingai nesiskyrė, ($p = 0,135$).

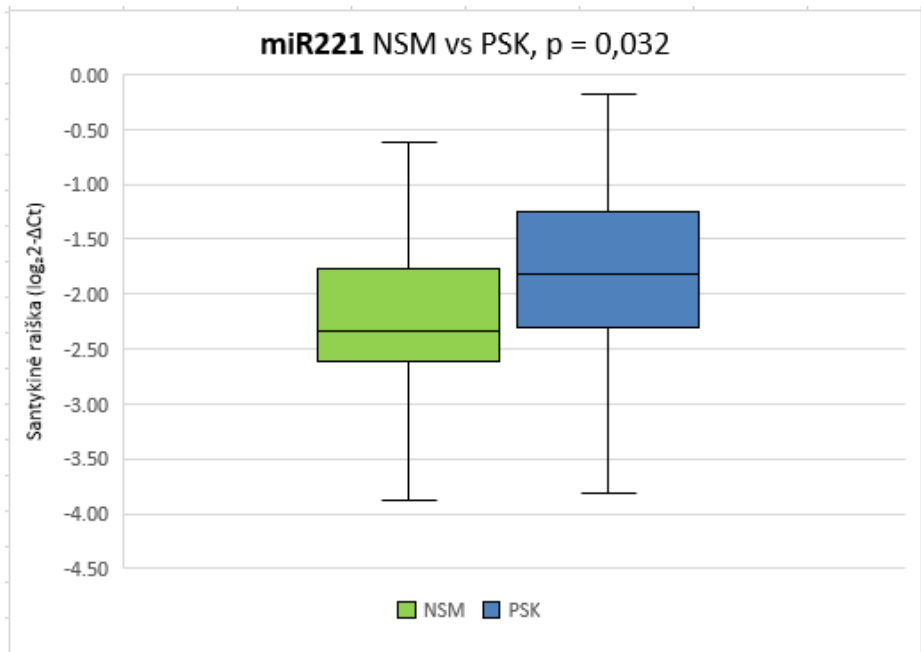
RL-PGR miR125A, miR146B, miR221 ir miR4324 santykinės raiškos rezultatai patvirtino naujos kartos sekoskaitos rezultatus, kad minėtų miRNR santykinė raiška yra didesnė PSK nei NSM grupėje. miR200B raiškos skirtumas tarp NSM ir PSK grupių, nustatyto naujos kartos sekoskaitos būdu, RL-PGR metodu nepasitvirtino.



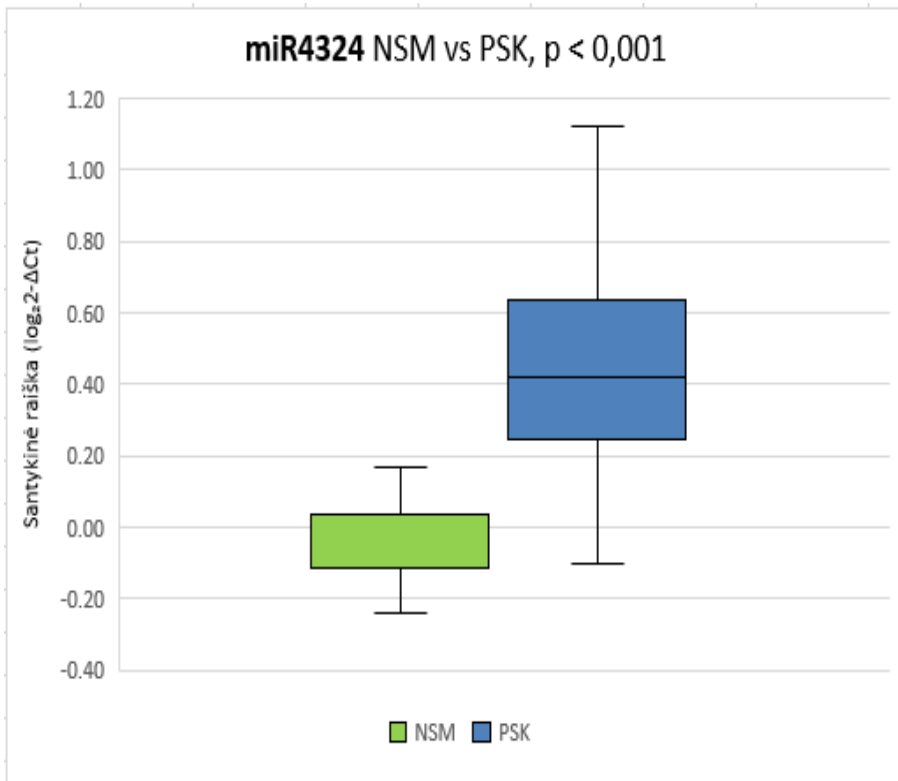
10A pav. miR125A santykinės raiškos palyginimas tarp NSM ir PSK grupių. Mano-Vitnio testas.



10B pav. miR146B santykinės raiškos palyginimas tarp NSM ir PSK grupių. Mano-Vitnio testas.



10C pav. miR221 santykinės raiškos palyginimas tarp NSM ir PSK grupių. Mano-Vitnio testas.



10D pav. miR4324 santykinės raiškos palyginimas tarp NSM ir PSK grupių. Mano-Vitnio testas.

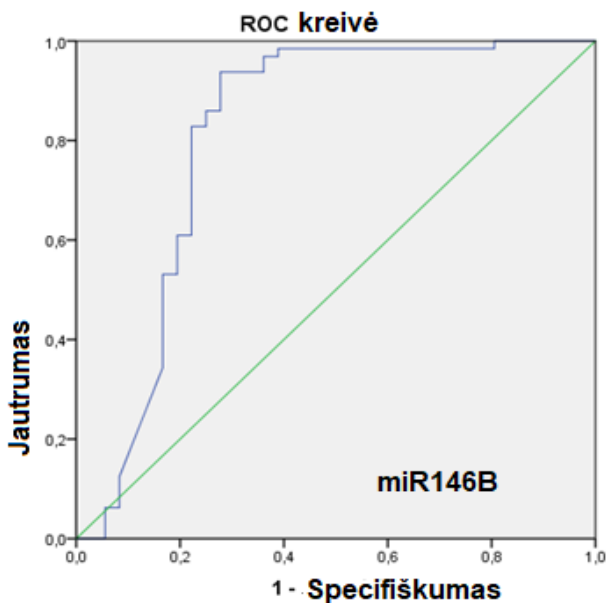
Siekiant įvertinti reikšmingai tarp grupių besiskiriančių miR125A, miR146B, miR221 ir miR4324 diagnostinį tikslumą diferencijuojant PSK tiriamuosius nuo NSM tiriamųjų buvo atlikta ROC kreivių analizė. Galima teigti, kad miR146B (AUC = 0,809; $p < 0,001$) ir miR4324 (AUC = 0,827; $p < 0,001$) leido labai gerai identifikuoti sergančiuosius PSK, o miR125A (AUC = 0,716; $p < 0,001$) – gerai, kai riba tarp geros ir labai geros modelio kokybės yra 0,8. Šių trijų miRNR jautrumas ir specifiškumas pateikti 14 lentelėje. Vertinti miR221 negalime, nes modelis blogai prognozuoja nepiktybinius skyd liaukės mazgus, t.y. tik 5,6 proc.

14 lentelė. miRNR prognostinė reikšmė diferencijuojant PSK pacientus nuo NSM pacientų.

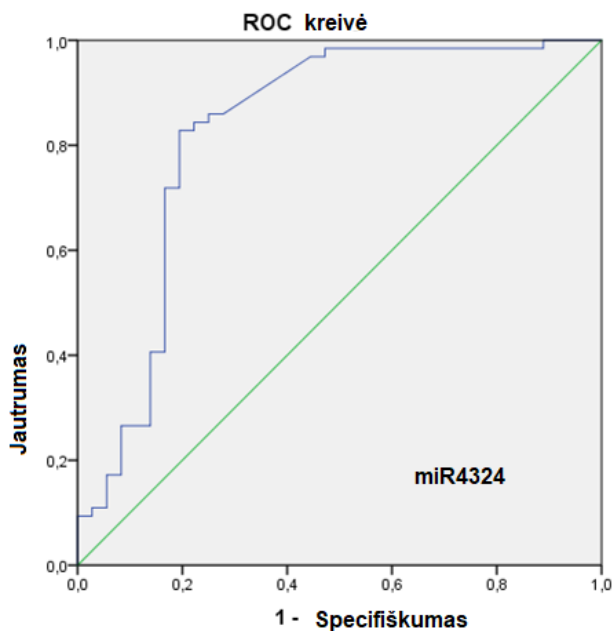
	AUC	p vertė	PI 95 proc.	Jautrumas	Specifiškumas
miR125A	0,716	<0,001	0,600-0,832	0,667	0,600
miR146B	0,809	<0,001	0,700-0,919	0,824	0,885
miR4324	0,827	<0,001	0,790-0,926	0,859	0,750

AUC – plotas po kreive (angl. *area under curve*); PI – pasikliautinis intervalas.

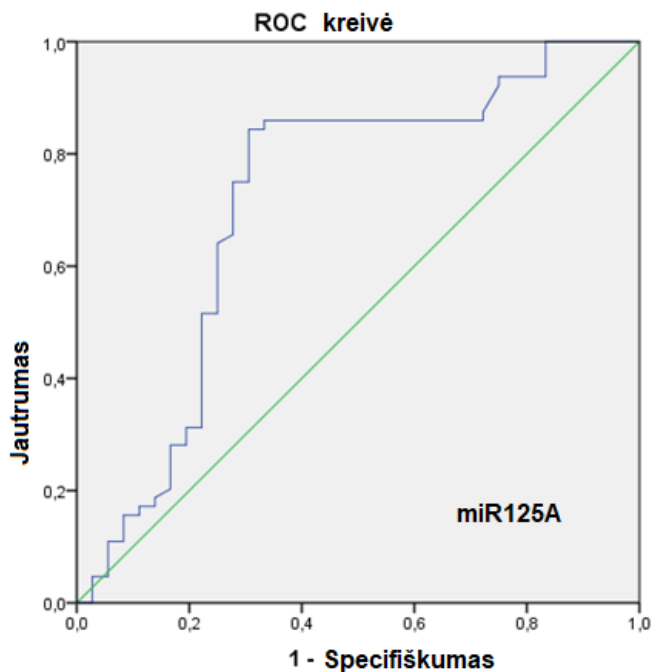
miR146b, miR4324 ir miR125A ROC kreivės pavaizduotos 11A, 11B ir 11C paveiksluose.



11A pav. miR146B prognostinė reikšmė diferencijuojant piktybinius skydliaukės mazgus nuo nepiktybinių.



11B pav. miR4324 prognostinė reikšmė diferencijuojant piktybinius skydliaukės mazgus nuo nepiktybinių.



11C pav. miR125A prognostinė reikšmė diferencijuojant piktybinius skydliaukės mazgus nuo nepiktybinių.

Toliau atliktas miRNR santykiųjų raiškų palyginimas tarp tiriamųjų (n = 34), sergančių PSK be MTS ir tiriamųjų (n = 30), kuriems diagnozuota PSK su MTS, grupių. Nesant duomenų pasiskirstymui pagal normalųjį dėsnį, dviejų grupių duomenys lyginti naudojant Mano-Vitnio kriterijų. Visų miRNR santykinės raiškos medianos ir kvartilų skirtumai pateikti 15 lentelėje.

15 lentelė. miRNR santykinės raiškos palyginimas PSK su MTS ir PSK be MTS tiriamųjų grupėse.

	PSK be MTS	PSK su MTS	P reikšmė
miR125A	0,53 (0,46)	0,37 (0,43)	0,080
miR146B	-0,10 (0,20)	-0,41 (0,53)	<0,001
miR200B	-2,35 (1,51)	-2,68 (1,71)	0,128
miR221	-1,79 (1,2)	-2,30 (1,68)	0,058
miR4324	0,58 (0,43)	0,35 (0,31)	0,016

Mano-Vitnio testo rezultatai. Pateiktos santykinės raiškos ($\log_2\text{-}\Delta\text{Ct}$) medianos ir kvartilų skirtumas.

Kadangi visų miRNR santykinės raiškos lygiai skirtingi, tai atskiros reikšmingai besiskiriančios miRNR raiška vėliau pateiktuose grafikuose pavaizduota skirtingose skalėse.

miR146B santykinė raiška reikšmingai didesnė sergančiųjų PSK be MTS grupėje lyginant su PSK su MTS grupe, ($p < 0,001$). miR146B santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 12A paveiksle.

miR4324 santykinė raiška reikšmingai didesnė sergančiųjų PSK be MTS grupėje lyginant su PSK su MTS grupe, ($p = 0,016$). miR4324 santykinės raiškos lygis tiriamosiose grupėse pavaizduotas 12B paveiksle.

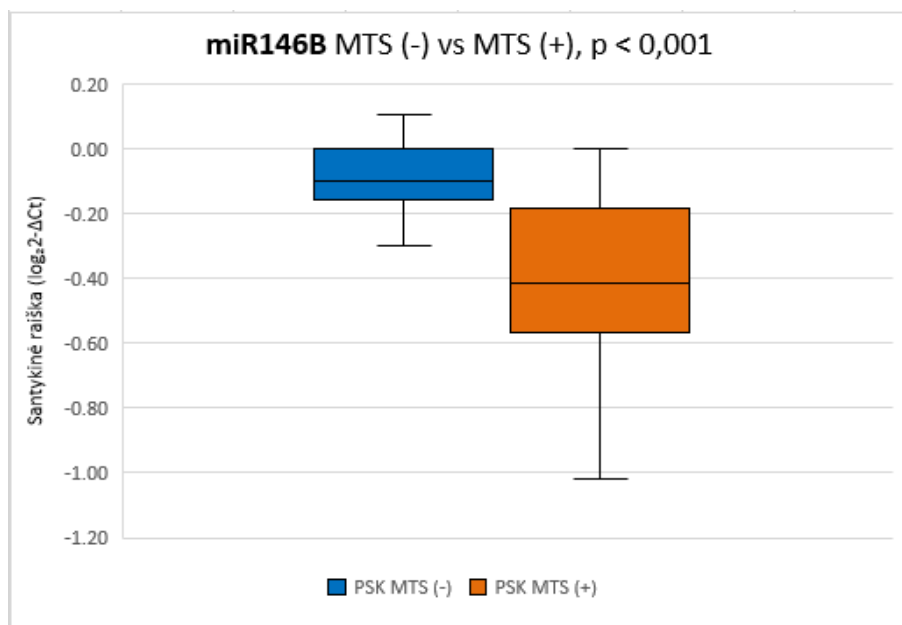
miR125A santykinė raiška lyginant sergančiųjų PSK be MTS grupę su PSK su MTS grupe reikšmingai nesiskyrė, ($p = 0,08$).

miR221 santykinė raiška tarp PSK be MTS ir PSK su MTS grupių reikšmingai nesiskyrė, ($p = 0,058$).

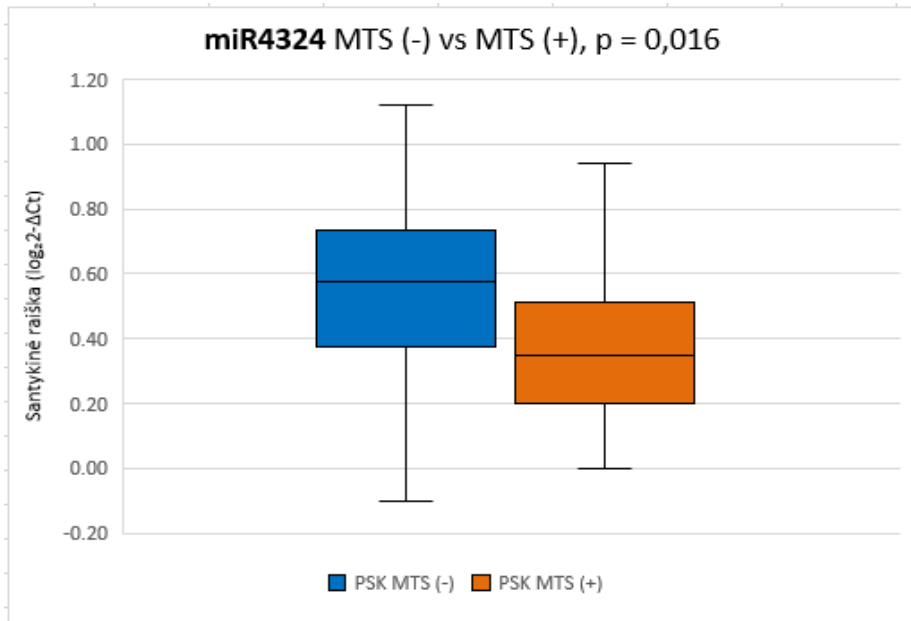
miR200B santykinė raiška tarp PSK be MTS ir PSK su MTS grupių reikšmingai nesiskyrė, ($p = 0,128$).

Ištyrus atrinktų miRNR: miR125A, miR200B ir miR4324 raišką tarp PSK su MTS ir PSK be MTS RL-PGR metodu, naujos kartos sekoskaitos metodu gautas raiškos skirtumas tarp grupių nepasitvirtino.

Nepasitvirtino ir pagal literatūros duomenis atrinktų miRNR (miR221 ir miR146B) raiškos tarp PSK su MTS ir PSK be MTS skirtumas. Reikšmingai didesnė miR146B ir miR4324 raiška stebėta tiriamųjų, sergančių PSK be metastazių lyginant su tiriamaisiais, sergančiais PSK su metastazėmis kaklo limfmazgiuose, priešingai, nei nustatyta miRNR raiška šiose grupėse tiriant naujos kartos sekoskaitos metodu.



12A pav. miR146B santykinės raiškos palyginimas tarp PSK be MTS ir PSK su MTS grupių. Mano-Vitnio testas.



12B pav. miR4324 santykinės raiškos palyginimas tarp PSK be MTS ir PSK su MTS grupių. Mano-Vitnio testas.

REZULTATŲ APTARIMAS

Ultragarsinis tyrimas ir plonos adatos aspiracinė punkcija su citologiniu ištyrimu yra „auksinis standartas“ diferencijuojant piktybinius skydliaukės mazgus nuo nepiktybinių.

Plonos adatos aspiracinės punkcijos (ASP) rezultatai pateikiami pagal *Bethesda* skydliaukės citopatologinių tyrimų sistemą, kuri pasižymi dideliu diagnostiniu specifiškumu [11]. Nepaisant to, 10-20 % skydliaukės mazgų po atliktos ASP lieka neapibrėžti [12]. *Bethesda* III-V citologinės kategorijos mazgai yra priskiriami neapibrėžtiems, kurių piktybiškumo rizika svyruoja nuo 10 iki 75%. *Bethesda* V kategorijos piktybiškumo rizika yra 60-75 %, IV kategorijos – 25-40 %, o III kategorijos – 10-30 % [11]. Būtent šios *Bethesda* kategorijos sukelia daugiausia diagnostinių, gydymo taktikos ir operacijos apimties pasirinkimo problemų. *Bethesda* VI kategorijos mazgų piktybiškumo rizika yra 97-99 %, todėl šios kategorijos mazgų gydymo taktikos parinkimas sukelia mažiau diskusijų.

Iš dalyvavusių tiriamųjų, 37 (23,1 %) buvo nustatyta III *Bethesda* kategorija, 24 (15,0 %) IV kategorija, 29 (18,1 %) – V kategorija ir 70 (43,8 %) – VI kategorija. 20-čiai (54,1%) *Bethesda* III, 3 (12,5 %) – *Bethesda* IV, 23 (79,3 %) – *Bethesda* V ir 66 (94,3 %) – *Bethesda* VI kategorijų tiriamiesiems buvo diagnozuota skydliaukės karcinoma. Lyginat su literatūros duomenimis, tarp III *Bethesda* kategorijos mazgų šiame tyrime dalyvavusiems asmenims dažniau aptinkama skydliaukės karcinoma, o tarp IV kategorijos rečiau. V ir VI *Bethesda* kategorijų mazgų piktybiškumo rizika atitinka literatūroje aprašytą piktybiškumo riziką [11][71].

miRNR raiškos skirtumai tarp nepiktybinius ir piktybinius skydliaukės mazgus turinčių pacientų grupių.

Iš 160 tyrime dalyvavusių tiriamųjų, 112 (70 %) histologiškai patvirtinta papilinė skydliaukės karcinoma ir net 48 (30%) histologiškai skydliaukės karcinoma nepasitvirtino, jiems buvo diagnozuoti nepiktybiniai skydliaukės mazgai. Vadinas, net 30 % tiriamųjų operacinio gydymo galėjo išvengti. Šie duomenys leidžia daryti išvadą, kad vien ultragarsinis skydliaukės mazgų ištyrimas ir *Bethesda* citologinė sistema neleidžia pakankamai tiksliai diferencijuoti nepiktybinius mazgus nuo piktybinių.

Tyrime dalyvavusiems pirmiesiems 60-čiai tiriamųjų (12-ai su nepiktybiniais skydliaukės mazgais, 33 su PSK be metastazių KLM ir 15-ai su PSK su metastazėmis KLM) pirmiausia buvo ištirta plonos adatos biopsijos mėginių

miRNR raiška naujos kartos sekoskaitos būdu. Atlikus sekoskaitos rezultatų analizę, atrinktos trys miRNR (miR125A, miR200B, miR4324), labiausiai besiskiriančios tiek tarp piktybinių ir nepiktybinių susirgimų, tiek tarp PSK be MTS ir PSK su MTS grupių, kurios vėliau buvo tiriamos likusiems tiriamiesiems RL-PGR būdu. Dar dvi miRNR (miR146B, miR221) tolimesniam tyrimui parinktos pagal literatūros duomenis, įtrauktos dažniausiai siejamos su skyd liaukės papiline karcinoma ir jos agresyvesne eiga miRNR. Tyrime palygintas pasirinktų miRNR raiškos skirtumas tarp tiriamųjų sergančių nepiktybiniais skyd liaukės mazgais su papiline skyd liaukės karcinoma sergančiais. Keturių miRNR (miR125A, miR146B, miR221 ir miR4324) raiška tarp šių grupių reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$). Visų šių keturių miRNR santykinė raiška reikšmingai didesnė stebėta PSK grupėje. RL-PGR miR125A ir miR4324 santykinės raiškos rezultatai patvirtino naujos kartos sekoskaitos rezultatus, kad minėtų miRNR santykinė raiška yra reikšmingai didesnė PSK nei nepiktybinių mazgų grupėje.

miR200B raiškos skirtumas tarp NSM ir PSK grupių, nustatyto naujos kartos sekoskaitos būdu, RL-PGR metodu nepasitvirtino. Literatūroje iki šiol nėra aprašyta miR125A ir miR4324 reikšmė diferencijuojant piktybinius skyd liaukės mazgus nuo nepiktybinių.

Patvirtintas ir pagal literatūros duomenis atrinktų miRNR: miR146B ir miR221 raiškos skirtumas tarp NSM ir PSK grupių [136][137][138][30][139][29][122]. Šių dviejų miRNR raiška buvo reikšmingai didesnė PSK tiriamųjų grupėje.

miRNR raiškos tyrimų, klasifikuojant piktybinius ir nepiktybinius skyd liaukės mazgus, tikslumui nustatyti buvo naudotos ROC kreivės, įvertinant plotą po kreive. miR146B ($AUC = 0,809$; $p < 0,001$) ir miR4324 ($AUC = 0,827$; $p < 0,001$) leido labai gerai identifikuoti sergančiuosius PSK, o miR125A ($AUC = 0,716$; $p < 0,001$) – gerai.

Tyrimo rezultatai parodė, kad miR125A, miR146B ir miR4324 raiškos tyrimas gali pagerinti plonos adatos skyd liaukės mazgų biopsijos tikslumą, kas sumažintų neapibrėžtų citologinių mėginių skaičių, leistų geriau diferencijuoti piktybinius skyd liaukės mazgus nuo nepiktybinių.

miRNR raiškos skirtumai pagal papilinės skyd liaukės karcinomos klinikinius – patologinius rizikos veiksnius.

Tyrimo buvo vertinta miRNR sąsaja su PSK agresyvumo rizikos veiksniais.

Daugiažidiniškumas, naviko dydis, plitimas už skydliaukės kapsulės ribų yra svarbūs PSK agresyvumo rizikos veiksniai [21][24][67]. RL-PGR tyrimo rezultatai parodė, kad visų tirtų penkių miRNR raiškos lygis buvo panašus tarp tiriamųjų, turinčių mikrokarcinomą (naviko dydis ≤ 10 mm) ir tiriamųjų, kuriems nustatyto naviko dydis buvo >10 mm ($p > 0,05$).

PSK gali metastazuoti ne tik už skydliaukės ribų, bet ir pačioje skydliaukėje. Daugiažidiniškumas taip pat svarbus PSK metastazavimo į sritinius kaklo limfmazgius rizikos veiksnys. A. Antonelli ir kt. atlikta metaanalizė parodė, kad daugiažidininės papilinės karcinomos atveju MTS į sritinius kaklo limfmazgius rizika yra ženkliai didesnė nei solitarinio naviko (OR = 2,05; 95% PI 1,45-2,89)[24]. Daugiažidiniškumo metastazavimo prognostinę reikšmę ypač padidina jei karcinomos dydis yra >1 cm [67].

Šio tyrimo rezultatai parodė, reikšmingai didesnę miR221 santykinę raišką ($p = 0,043$) tarp tiriamųjų, kuriems buvo nustatyta daugiažidininė karcinoma, lyginant su tais, kuriems diagnozuotas vienas PSK židinis. Tai patvirtina ir literatūroje aprašytus duomenis, kad miR221 raiška reikšmingai didesnė daugiažidininės PSK atveju (29)(120)(126)[30][118]. Kitų miRNR raiškos skirtumų tarp solitarinės ir daugiažidininės PSK grupių atliktame tyrime nebuvo nustatyta.

Literatūros duomenimis, svarbus PSK agresyvumo rizikos veiksnys yra skydliaukės kapsulės peraugimas. Tiriamiesiems, kuriems nustatomas PSK plitimas už skydliaukės kapsulės turi didesnę MTS kaklo limfmazgiuose riziką (OR = 2,03; 95% PI 1,78-2,31). Taip pat svarbu paminėti, kad pacientai, kuriems nustatomas didelis plitimas už skydliaukės kapsulės yra didesnėje recidyvavimo rizikoje, nei tie, kuriems plitimas nedidelis, randamas tik histologiškai [24].

Atliktame tyrime tiriamieji nebuvo diferencijuojami pagal plitimo už skydliaukės ribų laipsnį. Atlikus penkių miRNR raiškos tyrimą RL-PGR metodu, stebėta reikšmingai didesnė miR125A ($p < 0,001$) ir miR4324 ($p < 0,001$) santykinė raiška tarp tiriamųjų, kuriems buvo nustatytas naviko plitimas už skydliaukės kapsulės, lyginant su tiriamaisiais, kurių PSK neplito už skydliaukės kapsulės. Tuo tarpu, reikšmingai didesnė santykinė raiška miR146B ($p < 0,001$) ir miR221 ($p = 0,027$) buvo tiriamųjų, kurių PSK neplito už skydliaukės kapsulės. miR200B reikšmingo raiškos skirtumo tarp minėtų tiriamųjų grupių nebuvo nustatyta. Gauti tyrimo rezultatai nepatvirtino anksčiau literatūroje aprašytų duomenų, teigiančius, kad miR146B ir miR221 gali būti siejamos su PSK plitimu už skydliaukės kapsulės [120][122][29][30].

miR125A ir miR4324 raiškos sąsaja su PSK plitimu už skydliaukės ribų literatūroje nėra aprašyta.

miRNR raiškos skirtumai tarp papilinė skydliaukės karcinomos su ir be metastazių kaklo limfmazgiuose pacientų grupių.

Amerikos skydliaukės asociacijos tarptautinės gairės [21] pacientams, kuriems iki operacijos nustatomi pakitimai kaklo limfmazgiuose, rekomenduoja atlikti CKLM pašalinimą. Tačiau profilaktinės CKLM pašalinimo operacijos svarba dėl padidintos pooperacinių komplikacijų tikimybės yra kontraversiška. Esami vaizdinimo diagnostiniai tyrimai nepadedą tiksliai nustatyti navikinio proceso išplitimo iki operacijos [18]. Histologiškai diagnozuojama net iki 60 % metastazių kaklo limfmazgiuose, kurios iki operacijos nėra nustatomos vaizdinimo tyrimais [20].

Iš 160 tyrime dalyvavusių tiriamųjų, 138-iems (80,25 %) iki operacijos ultragarsu nebuvo nustatytos metastazės kaklo limfmazgiuose. 59-iems (42,75 %) tiriamiesiems kaklo limfmazgiai nešalinti, 79-iems (49,38 %) – atlikta profilaktinė KLM limfadenektomija, 22-iems (13,75 %) tiriamiesiems atlikta terapinė KLM limfadenektomija, iš jų 18-ai (81,8 %) atlikta CKLM limfadenektomija, o 4-iems (18,2 %) tiriamiesiems – ir CKLM, ir LKLM limfadenektomija.

Iš 22 terapinių limfadenektomijų, 19-ai (86,4 %) metastazės kaklo limfmazgiuose histologiškai pasitvirtino ir 3 (13,6 %) – nepasitvirtino. Iš 79 tiriamųjų, kuriems buvo atlikta profilaktinė limfadenektomija, 26 (32,9 %) metastazės buvo aptiktos ir 53 (67,1 %) metastazių kaklo limfmazgiuose nebuvo rasta. Šie duomenys leidžia daryti išvadą, kad ultragarsinis kaklo limfmazgių tyrimas nėra pakankamai jautrus diagnozuojant metastazes kaklo limfmazgiuose. Net 53 tiriamiesiems, kas sudaro 33,13 % nuo bendro tiriamųjų skaičiaus ir 67,1 % nuo tiriamųjų, kuriems iki operacijos ultragarsu nebuvo nustatytos metastazės kaklo limfmazgiuose, galima buvo sumažinti operacijos apimtį, t.y. neatlikti kaklo limfadenektomijos.

Kadangi šiuo metu turimais tiek vaizdinimo, tiek citologiniais tyrimais tiksliai diagnozuoti skydliaukės karcinomos, jos išplitimo į kaklo limfmazgius, nepavyksta, svarbi naujų biožymenų, galinčių tiksliau nustatyti diagnozę ir įvertinti ligos išplitimą, paieška.

Pastarąjį dešimtmetį daug tyrimų buvo atlikta siekiant nustatyti miRNR, kaip diagnostinį PSK biožymenį. Kelios miRNR yra siejamos ir su PSK metastazėmis [112][113].

Funkcinė miR146 analizė parodė, kad ji susijusi su įvairiomis ląstelių funkcijomis, įskaitant proliferaciją, migraciją ir invaziją [114][115]. *CK. Chou* su bendraautorais įrodė, kad miR146B raiška yra nepriklausomas PSK blogos prognozės rizikos veiksnys [116]. Vienuolikoje straipsnių, įtrauktų į analizę, buvo tiriamas ryšys tarp miR146 padidintos raiškos ir MKLM PSK atveju. Kelios nepriklausomos tyrėjų grupės, tyrusios miRNR histologiniuose mėginiuose, nustatė, kad miR146B raiškos lygis yra reikšmingai padidėjęs pacientams su MKLM [120][121][29]. Tačiau likusiuose tyrimuose reikšmingo padidėjimo nepastebėta [119][28][125][118]. *F. Yang* ir bendra autoriai tyrinėję miR146B raišką ASP mėginiuose nustatė, kad šios miRNR raiška buvo reikšmingai didesnė PSK pacientų tiek su MKLM, tiek su labiau pažengusia karcinomos stadija [122].

Su miR221/222 yra atlikta daugiausia tyrimų, įrodančių jų raiškos pokyčio sąsają su tokiais klinikiniais patologiniais PSK požymiais, kaip MKLM. Eilė tyrimų nustatė, kad PSK su MKLM turi didesnę miR221/222 raišką audiniuose, palyginti su PSK be MKLM [126][117][120][121][127][29]. *K. Jiang* su kolegomis nustatė, kad reikšmingai didesnė miR222 ir miR221 raiška serume randama PSK pacientams, kuriems yra diagnozuotos MKLM[124].

Šiame atliktame tyrime, lyginant pasirinktų miRNR analizės duomenis tarp PSK su metastazėmis ir be metastazių kaklo limfmazgiuose tiriamųjų grupių gauti kontraversiški tirtų asmenų grupių duomenys. miR125A, miR200B ir miR4324 raiška nustatyta NKS metodu PSK su MTS kaklo limfmazgiuose buvo reikšmingai didesnė (atitinkamai, $p = 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,001$) lyginant su PSK be MTS kaklo limfmazgiuose. Tuo tarpu RL-PGR būdu nustatyta miR4324 raiška reikšmingai didesnė ($p = 0,016$) stebėta tiriamųjų, sergančių PSK be metastazių, nei tiriamųjų, sergančių PSK su metastazėmis kaklo limfmazgiuose, o miR200B ir miR125A raiška tarp tiriamųjų grupių skyrėsi nereikšmingai ($p > 0,05$). Daugianarės logistinė regresijos rezultatai parodė, kad miR146B reikšmės padidėjimas vienetu 16,0 karto padidina galimybę, kad mazgas bus piktybinis be metastazių negu nepiktybinis ir 4,2 karto, kad mazgas bus piktybinis su metastazėmis negu nepiktybinis. O miR4324 padidėjimas vienetu didina net 31,9 karto galimybę sirgti PSK be metastazių ir 8,3 karto PSK su metastazėmis negu nepiktybiniu susirgimu.

Tyrimo rezultatai nepatvirtino ir pagal literatūros duomenis [120][126][117][121][124][29][30][122] atrinktų, kaip dažniausiai su PSK metastazavimu siejamų miRNR (miR221 ir miR146B) raiškos skirtumo tarp tiriamųjų grupių. miR221 raiškos skirtumas tarp grupių buvo nereikšmingas

($p = 0,058$), o miR146B raiška reikšmingai didesnė ($p < 0,001$) metastazes kaklo limfmazgiuose neturinčių tiriamųjų grupėje.

Atliktame tyrime buvo keletas trūkumų. Šis mokslinis darbas atliktas vienoje įstaigoje. Nagrinėta santykinai nedidelė tiriamųjų grupė.

Kokie galėtų būti tyrimo trūkumai ir priežastys, kodėl gauti tokie kontraversiški rezultatai tarp tiriamųjų sergančių PSK su metastazėmis ir PSK be metastazių grupių. Pirma, mes nežinome laiko, kiek praėjo nuo naviko atsiradimo iki diagnozės nustatymo kiekvienoje grupėje. Kadangi PSK be MTS grupėje net 16-ai (47,1%) tiriamųjų buvo nustatyta mikrokarcinoma, galime daryti prielaidą, kad metastazėms atsirasti dar pritrūko laiko. Antra, į tyrimą buvo įtraukti tiriamieji, kuriems buvo atlikta ir profilaktinė, ir terapinė limfadenektomija. Tokia nevienalytė tiriamųjų grupė irgi galėjo turėti įtakos rezultatams. Trečia, į tyrimą įtraukti tiriamieji su įvairiais PSK potipiais, t. y. klasikinis, folikulinis variantas, onkocinis, solidinis-trabekulinis, aukštų ląstelių, kurie turi skirtingus agresyvumo laipsnius. Didžioji dauguma į tyrimą įtrauktų tiriamųjų sirgo klasikine PSK, todėl dėl mažo tiriamųjų, sergančių kitais PSK potipiais, skaičiaus nebuvo galima atlikti tinkamai pagrįstos kiekvieno ligos potipio analizės.

IŠVADOS

1. miRNR raiškos tyrimas plonos adatos skydliaukės mazgų aspiratuose padeda diferencijuoti piktybinius skydliaukės mazgus su nepiktybinių. Tyrimo metu nustatyta reikšmingai didesnė keturių miRNR (miR125A, miR146B, miR221 ir miR4324) santykinė raiška piktybiniuose skydliaukės mazguose ($p < 0,05$) lyginant su nepiktybiniais skydliaukės mazgais.

2. Skirtingų pataloginių požymių PSK pasižymi skirtinga miRNR raiška plonos adatos skydliaukės mazgų aspiratuose:

- miR125A ir miR4324 santykinė raiška yra reikšmingai didesnė PSK plintančios už skydliaukės kapsulės ribų atveju lyginant su PSK neplintančia už skydliaukės kapsulės ($p < 0,001$);
- daugiažidininės PSK atveju miR221 santykinė raiška reikšmingai didesnė ($p = 0,043$) nei solitarinės PSK atveju.

3. Nustatyta reikšmingai didesnė miR4324 ir miR146B santykinė raiška PSK be metastazių lyginant su PSK su metastazėmis tiriamųjų grupėse ($p = 0,016$ ir $p < 0,001$).

REKOMENDACIJOS

miRNR raiškos lygio nustatymas ASP mėginiuose gali pagerinti skydliaukės mazgų plonos adatos aspiracinės biopsijos tikslumą, o tai leistų geriau iki operacinio gydymo atskirti piktybinius skydliaukės mazgus nuo nepiktybinių, prognozuoti agresyvesnę ligos eigą.

Norint šiuos duomenis pritaikyti klinikinėje praktikoje, reikia atlikti didesnės apimties kohortinius tyrimus. Patobulinus miRNR tyrimo metodų standartizavimą, būtų galima plačiau taikyti šį metodą nustatant individualias skydliaukės karcinoma sergančių pacientų gydymo strategijas.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. *J Cancer Epidemiol* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/965212>.
- [2] Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501–11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12488-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12488-9).
- [3] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>.
- [4] Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, Wild CP, Plummer M, Dal Maso L. Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis at NEJM.org 2016. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1607866>.
- [5] Dean DS, Gharib H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:901–11. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.09.019>.
- [6] Hoang JK, Nguyen X V., Davies L. Overdiagnosis of Thyroid Cancer. Answers to Five Key Questions. *Acad Radiol* 2015;22:1024–9. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2015.01.019>.
- [7] Russ G, Bonnema SJ, Faik Erdogan M, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS *Eur Thyroid J* 2017;6:225–37. <https://doi.org/10.1159/000478927>.
- [8] Haugen BR. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: What is new and what has changed? *Cancer* 2017;123:372–81. <https://doi.org/10.1002/cncr.30360>.
- [9] Tessler FN, Middleton WD, Grant EG, et al. ACR Thyroid Imaging, Reporting and Data System (TI-RADS): White Paper of the ACR TI-RADS Committee. *J Am Coll Radiol* 2017;14:587–95. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2017.01.046>.

- [10] Staibano P, Forner D, Noel CW, et al. Ultrasonography and Fine-Needle Aspiration in Indeterminate Thyroid Nodules: A Systematic Review of Diagnostic Test Accuracy. *Laryngoscope* 2021;132. <https://doi.org/10.1002/lary.29778>.
- [11] Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2017;27:1341–6. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0500>.
- [12] Manning AM, Yang H, Falciglia M, Mark JR, Steward DL. Thyroid Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Cytology Results: Observed Increase in Indeterminate Rate over the Past Decade. *Otolaryngol Neck Surg* 2017;156:611–5. <https://doi.org/10.1177/0194599816688190>.
- [13] Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet* 2016;388:2783–95. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30172-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30172-6).
- [14] Cho SW, Choi HS, Yeom GJ, et al. Long-term prognosis of differentiated thyroid cancer with lung metastasis in Korea and its prognostic factors. *Thyroid* 2014;24:277–86. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0654>.
- [15] Guo K, Wang Z. Risk factors influencing the recurrence of papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. vol. 7. 2014.
- [16] Chéreau N, Buffet C, Trésallet C, Tissier F, Leenhardt L, Menegaux F. Recurrence of papillary thyroid carcinoma with lateral cervical node metastases: Predictive factors and operative management. *Surg (United States)* 2016;159:755–62. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.08.033>.
- [17] Lan X, Sun W, Zhang H, Dong W, Wang Z, Zhang T. A Meta-analysis of Central Lymph Node Metastasis for Predicting Lateral Involvement in Papillary Thyroid Carcinoma. *Otolaryngol Neck Surg* 2015;153:731–8. <https://doi.org/10.1177/0194599815601412>.
- [18] Tao Y, Wang C, Li L, et al. Clinicopathological features for predicting central and lateral lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma: Analysis of 66 cases that underwent central and lateral lymph node dissection. *Mol Clin Oncol* 2017;6:49–55. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.1085>.

- [19] Zhao H, Li H. Meta-analysis of ultrasound for cervical lymph nodes in papillary thyroid cancer: Diagnosis of central and lateral compartment nodal metastases. *Eur J Radiol* 2019;112:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2019.01.006>.
- [20] Wada N, Duh Q-Y, Sugino K, et al. Lymph Node Metastasis From 259 Papillary Thyroid Microcarcinomas. *Ann Surg* 2003;237:399–407. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000055273.58908.19>.
- [21] Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26:1–133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.
- [22] Chen L, Wu YH, Lee CH, Chen HA, Loh EW, Tam KW. Prophylactic Central Neck Dissection for Papillary Thyroid Carcinoma with Clinically Uninvolved Central Neck Lymph Nodes: A Systematic Review and Meta-analysis. *World J Surg* 2018;42:2846–57. <https://doi.org/10.1007/s00268-018-4547-4>.
- [23] Qu N, Zhang L, Ji Q-H, Chen J-Y, Yong-Xue Zhu •, Cao Y-M, Shen Q. Risk Factors for Central Compartment Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinoma: A Meta-Analysis. *World J Surg* 2015;39:2459–70. <https://doi.org/10.1007/s00268-015-3108-3>.
- [24] Antonelli A, Knauf J, Wang G, Mao J, Zhang Q, Zhang H, Zheng K, Wang R. Article 265 (2020) Risk Factors for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta. *Anal Front Endocrinol* 2020;11:265. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00265>.
- [25] Yan L-X, Huang X-F, Shao Q, Huang M-Y, Deng L, Wu Q-L, Zeng Y-X, Shao J-Y. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis n.d. <https://doi.org/10.1261/rna.1034808>.
- [26] Zhang W-W, Ming X-L, Rong Y, Huang C-Q, Weng H, Chen H, Bian J-M, Wang F-B. Diagnostic Value Investigation and Bioinformatics Analysis of miR-31 in Patients with Lymph Node Metastasis of

Colorectal Cancer 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9740475>.

- [27] Huang K-H, Lan Y-T, Fang W-L, et al. The Correlation between miRNA and Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/543163>.
- [28] Chou CK, Chen RF, Chou FF, et al. MiR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF v600e mutation. *Thyroid* 2010;20:489–94. <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0027>.
- [29] Pamedytyte D, Simanaviciene V, Dauksiene D, et al. Association of microRNA expression and BRAFV600E mutation with recurrence of thyroid cancer. *Biomolecules* 2020;10:1–16. <https://doi.org/10.3390/biom10040625>.
- [30] Kondrotienė AE, Daukša A, Pamedytytė D, et al. diagnostics Article Papillary Thyroid Carcinoma Tissue miR-146b,-21,-221. *Diagnostics* 2021;222. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030418>.
- [31] Kondrotienė AE, Daukša A, Pamedytytė D, et al. Plasma-Derived miRNA-222 as a Candidate Marker for Papillary Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21176445>.
- [32] Hoang JK, Langer JE, Middleton WD, et al. Managing incidental thyroid nodules detected on imaging: White paper of the ACR incidental thyroid findings committee. *J Am Coll Radiol* 2015;12:143–50. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2014.09.038>.
- [33] Wong R, Farrell SG, Grossmann M. Thyroid nodules: diagnosis and management. Wong, R, Farrell, SG Grossmann, M (2018), *Thyroid Nodules Diagnosis Manag Med J Aust* 209 92-98 <https://doi.org/10.5694/mja1701204> n.d. <https://doi.org/10.5694/mja17.01204>.
- [34] Gharib H, Papini E, Garber JR, et al. American association of Clinical Endocrinologists, American college of endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules - 2016 update. *Endocr Pract* 2016;22:1–60. <https://doi.org/10.4158/EP161208.GL>.
- [35] American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione

- Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules: Executive Summary of recommendations 2010. <https://doi.org/10.3275/7048>.
- [36] Miseikyte E, Ulys A, Trakymas M. Piktybinės ligos dažnumas įtariamo vėžio (suspitio) citologinėje grupėje (nepalpuojamų skydliaukės mazgų ultragarsu kontroliuojama aspiracine biopsija plona adata). *Medicina (B Aires)* 2008;44:189–94.
- [37] Wang CCC, Friedman L, Kennedy GC, et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid* 2011;21:243–51. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.0243>.
- [38] Nayar R, Ivanovic M. The Indeterminate Thyroid Fine-Needle Aspiration Experience From an Academic Center Using Terminology Similar to That Proposed in the 2007 National Cancer Institute Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference n.d. <https://doi.org/10.1002/cncy.20029>.
- [39] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods 2018. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
- [40] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures Special Section: Cancer in Adolescents and Young Adults 2020;2020:29–43.
- [41] Bai Y, Kakudo K, Kwon Jung C. Updates in the Pathologic Classification of Thyroid Neoplasms: A Review of the World Health Organization Classification. *Endocrinol Metab* 2020;35:696–715. <https://doi.org/10.3803/EnM.2020.807>.
- [42] Welfare AI of H. Cancer in Australia: Actual incidence data from 1982 to 2013 and mortality data from 1982 to 2014 with projections to 2017. *Asia Pac J Clin Oncol* 2018;14:5–15. <https://doi.org/10.1111/AJCO.12761>.
- [43] Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Apr 16;95(8):625-7. doi: 10.1093/jnci/95.8.625.

- [44] Mingzhao Xing. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:184–99. <https://doi.org/10.1038/nrc3431>.Molecular.
- [45] D’cruz AK, Vaish R, Abhishek Vaidya , et al. Molecular markers in well-differentiated thyroid cancer. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2018;275:1375–84. <https://doi.org/10.1007/s00405-018-4944-1>.
- [46] Acquaviva G, Visani M, Repaci A, Rhoden KJ, De Biase D, Pession A, Giovanni T. Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology* 2017;72:6–31. <https://doi.org/10.1111/his.13380>.
- [47] Vikas Mehta, MD,1Yuri E. Nikiforov, MD, PhD,2Robert L. Ferris, MD P. Use of molecular biomarkers in FNA specimens to personalize treatment for thyroid surgery. *Head and Neck*. 2012:1499–506. <https://doi.org/10.1002/hed.23140>.
- [48] Thomas G, Brunnell H, Cook H, et al. High Prevalence of RET / PTC Rearrangements in Ukrainian and Belarussian Post-Chernobyl Thyroid Papillary Carcinomas: A Strong Correlation between. *J Clin Endocrinol* 2014;84:4232–8.
- [49] Placzkowski KA, Reddi H V, Grebe SKG, Eberhardt NL, Mciver B. The Role of the PAX8/PPAR γ Fusion Oncogene in Thyroid Cancer. *PPAR Res* 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/672829>.
- [50] Castro P, Rebocho AP SR et al. PAX8-PPAR Rearrangement Is Frequently Detected in the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma 2006:4200–465. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1336>.
- [51] Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 May;135(5):569-77. doi: 10.5858/2010-0664-RAIR.1.
- [52] Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 2013;20:603–10. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0210>.
- [53] Li X, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Kandil E. MicroRNA expression profiles in differentiated thyroid cancer, a review. *Int J Clin Exp Med* 2013;6:74–80.
- [54] Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, Jayapalan JJ, Karikalan B, Hashim

- OH. Papillary thyroid cancer: Genetic alterations and molecular biomarker investigations. *Int J Med Sci* 2019;16:450–60. <https://doi.org/10.7150/ijms.29935>.
- [55] Livolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: An update. *Mod Pathol* 2011;24:S1–9. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.129>.
- [56] Iglesias ML. Radiation exposure and thyroid cancer: a review. *Arch Endocrinol Metab* 2017;61(2):180–7. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000257>.
- [57] Kyoung So Y, Kim M-J, Kim S, Son Y-IJE (2008) 159:659–73. doi: 10. 1530/EJ.-07-0896. Lateral lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis for prevalence, risk factors, and location 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2017.12.029>.
- [58] Bates MF, Lamas MR, Randle RW, Long KL, Pitt SC, Schneider DF, Sippel RS. Back so soon? Is early recurrence of papillary thyroid cancer really just persistent disease? *Surg (United States)* 2018;163:118–23. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2017.05.028>.
- [59] Lubitz CC, Economopoulos KP, Pawlak AC, Lynch K, Dias-Santagata D, Faquin WC, Sadow PM. Hobnail variant of papillary thyroid carcinoma: An institutional case series and molecular profile. *Thyroid* 2014;24:958–65. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0573>.
- [60] Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/ Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid* 2017;27 (6):751–6. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0102>.
- [61] Li J, Zhang B, Bai Y, Liu Y, Zhang B, Jin J. Health-related quality of life analysis in differentiated thyroid carcinoma patients after thyroidectomy. *Nat Res* 2020;10:5765:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62731-3>.
- [62] Coca-Pelaz A, Shah JP, Hernandez-Prera JC, et al. Papillary Thyroid Cancer—Aggressive Variants and Impact on Management: A Narrative Review. *Adv Ther* 2020;37:3112–28. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01391-1>.

- [63] Silver CE, Owen RP, Rodrigo JP, Rinaldo A. AGGRESSIVE VARIANTS OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA 2010;33:1052–9. <https://doi.org/10.1002/hed.21494>.
- [64] Liu L-S, Liang J, Li J-H, et al. The incidence and risk factors for central lymph node metastasis in cN0 papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2017;274:1327–38. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4302-0>.
- [65] Tuttle RM, Haddad RI, Ball DW, Byrd D, Dickson P, Duh QY et al. *EJE* (2008) 159:659–73. doi: 10. 1530/EJ.-07-0896. *Thyroid Carcinoma, Version 2.2014* 2014;12:1671-1680.
- [66] Bernet V. Approach to the Patient with Incidental Papillary Microcarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95 (8):3586–92. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0698>.
- [67] Kim K-J, Kim S-M, Lee YS, Chung Y, Chang H-S, Park CS. Prognostic Significance of Tumor Multifocality in Papillary Thyroid Carcinoma and its Relationship with Primary Tumor Size: A Retrospective Study of 2,309 Consecutive Patients. *Ann Surg Oncol* 2015;22:125–31. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3899-8>.
- [68] Chai YJ, Kim S-J, Choi JY, Do •, Koo H, Kyu •, Lee E, Youn Y-K. Papillary Thyroid Carcinoma Located in the Isthmus or Upper Third is Associated with Delphian Lymph Node Metastasis. *World J Surg* 2014;38:1306–11. <https://doi.org/10.1007/s00268-013-2406-x>.
- [69] Zhang LY, Liu ZW, Liu YW, Gao WS, Zheng CJ. Risk factors for nodal metastasis in cN0 papillary thyroid microcarcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2015;16:3361–3. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.8.3361>.
- [70] Xiang D, Xie L, Xu Y, Li Z, Hong Y, Wang P. Papillary thyroid microcarcinomas located at the middle part of the middle third of the thyroid gland correlates with the presence of neck metastasis. *Surg (United States)* 2015;157:526–33. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.10.020>.
- [71] Cibas ES, Ali SZ, Mandel SJ, as moderators Zubair Baloch served W. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132:658–65. <https://doi.org/10.1309/AJCPHLMWI3JV4LA>.

- [72] Linwah Yip, MDa and Robert L. Ferris, MD P. Clinical Application of Molecular Testing of Fine-needle Aspiration Specimens in Thyroid Nodules. *Otolaryngol Clin North Am* 2014;47:557–71. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2014.04.003>.Clinical.
- [73] Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, Sidransky D, Westra WH. Mutational Analysis of BRAF in Fine Needle Aspiration Biopsies of the Thyroid: A Potential Application for the Preoperative Assessment of Thyroid Nodules. *Clinical Cancer Research*. 2004.
- [74] Wook Kim S, In Lee J, Kim J-W, et al. BRAF V600E Mutation Analysis in Fine-Needle Aspiration Cytology Specimens for Evaluation of Thyroid Nodule: A Large Series in a BRAF V600E-Prevalent Population 2010. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2795>.
- [75] Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post- Chernobyl papillary thyroid carcinomas: Biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000;6:1093–103.
- [76] Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The ret/PTC Mutations Are Common in Sporadic Papillary Thyroid Carcinoma of Children and Young Adults.*J Clin Endocrinol Metab* 85(3):1170–1175. 2000.
- [77] Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, Bedard YC, Asa SL. Analysis of ret/PTC Gene Rearrangements Refines the Fine Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Cancer. vol. 86. 2001.
- [78] Rossi ED, Vielh P. Thyroid and Molecular Testing. *Advances in Thyroid Molecular Cytopathology. J Mol Pathol* 2021;2:77–92. <https://doi.org/10.3390/jmp2020008>.
- [79] Mingzhao Xing WHW. Department of Medicine, and Departments of Pathology. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(12):6373–6379. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0987>.
- [80] Lupi C, Giannini R, Ugolini C, et al. EXTENSIVE CLINICAL EXPERIENCE Association of BRAF V600E Mutation with Poor Clinicopathological Outcomes in 500 Consecutive Cases of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(11):4085–

4090. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1179>.

- [81] Kim TH, Young ;, Park J, et al. The Association of the BRAF V600E Mutation With Prognostic Factors and Poor Clinical Outcome in Papillary Thyroid Cancer A Meta-Analysis. *Cancer* 2012;118(7):176. <https://doi.org/10.1002/cncr.26500>.
- [82] Li F, Chen G, Sheng C, et al. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. *Endocr Relat Cancer* 2015;22(2):159–168. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0531>.
- [83] Rossella Elisei, David Viola, Liborio Torregrossa, Riccardo Giannini, Cristina Romei, Clara Ugolini, Eleonora Molinaro, Laura Agate, Agnese Biagini, Cristiana Lupi, Laura Valerio, Gabriele Materazzi, Paolo Miccoli, Paolo Piaggi, Aldo Pinchera, Paolo Vitti and FB. The BRAF V600E Mutation Is an Independent, Poor Prognostic Factor for the Outcome of Patients with Low-Risk Intrathyroid Papillary Thyroid Carcinoma: Single-Institution Results from a Large Cohort Study Collaborating Center for the Study and Treatment of. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(12):4390–4398. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1775>.
- [84] Gia Vuong H, P Duong UN, A Altibi AM, T Ngo HT, Quang Pham T, Minh Tran H, Gandolfi G, Hassell L. A meta-analysis of prognostic roles of molecular markers in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Connect* 2017;6:R8-17. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0010>.
- [85] Durante C, Montesano T, Torlontano M, et al. Papillary thyroid cancer: Time course of recurrences during postsurgery surveillance. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:636–42. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3401>.
- [86] Bofill-De Ros X, Yang A, Gu S. IsomiRs: Expanding the miRNA Repression Toolbox Beyond the Seed. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2020;1863(4):19.
- [87] Lawrie, C.H.; Gal, S.; Dunlop, H.M.; Pushkaran, B.; Liggins, A.P.; Pulford, K.; Banham, A.H.; Pezzella, F.; Boulwood, J.; Wainscoat JS. et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J OfHaematology* 2008;141:672–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x>.
- [88] Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY. microRNA strand selection:

- Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2021;12:1–22. <https://doi.org/10.1002/wrna.1627>.
- [89] Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, Suciú N, Cretoiu SM, Voinea SC. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*. 2020 Jan 23;9(2):276. doi: 10.3390/cells9020276.
- [90] Karlsen TA, Aae TF, Brinchmann JE. Robust profiling of microRNAs and isomiRs in human plasma exosomes across 46 individuals. *Sci Rep* 2019;9:19999. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56593-7>.
- [91] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- [92] Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 2013;153:654–65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.043>.
- [93] Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB, Ochs M, Bhattacharjee M. Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet* 2014;5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00023>.
- [94] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem* 2010;56:111733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>.
- [95] O'Driscoll L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. *N Engl J Med*. 2015 Jun 11;372(24):2359-62. doi: 10.1056/NEJMcibr1503100.
- [96] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>.
- [97] Ludvíková M, Kalfeřt D, Kholová I. Pathobiology of MicroRNAs and Their Emerging Role in Thyroid Fine-Needle Aspiration. *Acta Cytol* 2015;59:435–44. <https://doi.org/10.1159/000442145>.

- [98] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1600-8. doi: 10.1210/jc.2007-2696.
- [99] Marini F, Luzi E, Brandi ML. MicroRNA role in thyroid cancer development. *J Thyroid Res* 2011;2011. <https://doi.org/10.4061/2011/407123>.
- [100] Celano M, Rosignolo F, Maggisano V, Pecce V, Iannone M, Russo D, Bulotta S. MicroRNAs as Biomarkers in Thyroid Carcinoma. *Int J Genomics* 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6496570>.
- [101] Mohammad-Reza Mahmoudian-sani, Ameneh Mehri-Ghahfarrokhi, Majid Asadi-Samani GRM. Serum miRNAs as Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Thyroid Cancer: A Comprehensive Review of the Literature. *Eur Thyroid J* 2017;6:171–7.
- [102] Zhang R, Hardin H, Chen J, Guo Z, Lloyd R V. Non-Coding RNAs in Thyroid Cancer. *Endocr Pathol* 2016;27:12–20. <https://doi.org/10.1007/s12022-016-9417-8>.
- [103] Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Worm K, Broecker-Preuss M, Schmid KW. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumours. *Br J Cancer* 2010;102:376–82. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605493>.
- [104] Liu Y, Geng H, Liu X, Cao M, Zhang X. A meta-analysis of circulating microRNAs in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *PLoS One* 2021;16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251676>.
- [105] Santiago K, Chen Wongworawat Y, Khan S. Differential MicroRNA-Signatures in Thyroid Cancer Subtypes. *J Oncol* 2020;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2052396>.
- [106] Czajka AA, Wójcicka A, Kubiak A, Kotlarek M, Bakula-Zalewska E, Koperski Ł, Wiechno W, Jazdzewski K. Family of microRNA-146 regulates RAR β in papillary thyroid carcinoma. *PLoS One* 2016;11:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151968>.
- [107] Wang XZ, Hang YK, Liu JB, Hou YQ, Wang N, Wang MJ. Over-expression of microRNA-375 inhibits papillary thyroid carcinoma cell

proliferation and induces cell apoptosis by targeting ERBB2. *J Pharmacol Sci* 2016;130:78–84. <https://doi.org/10.1016/J.JPHS.2015.12.001>.

- [108] Rossi ED, Bizzarro T, Martini M, et al. The evaluation of miRNAs on thyroid FNAC: the promising role of miR-375 in follicular neoplasms. *Endocrine* 2016;54:723–32. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0866-0>.
- [109] Silvia Cantara, Tania Pilli, Guido Sebastiani, Gabriele Cevenini, Giulia Busonero, Sandro Cardinale, Francesco Dotta and FP. Circulating miRNA95 and miRNA190 Are Sensitive Markers for the Differential Diagnosis of Thyroid Nodules in a Caucasian Population.pdf. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:4190–4198. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1923>.
- [110] Toraih EA, Elshazli RM, Trinh LN, et al. Diagnostic and prognostic performance of liquid biopsy-derived exosomal microRNAs in thyroid cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel)* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/cancers13174295>.
- [111] Xu S, Tian Y, Zhou Y, Liu L. Diagnostic value of circulating microRNAs in thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2020;93:489–98. <https://doi.org/10.1111/cen.14217>.
- [112] Mutalib N-SA, Othman N, Yusof AM, Niza S, Suhaimi A, Muhammad R, Jamal R. Integrated microRNA, gene expression and transcription factors signature in papillary thyroid cancer with lymph node metastasis. *PeerJ* 2016;4. <https://doi.org/10.7717/peerj.2119>.
- [113] Laukiene R, Jakubkevicius V, Ambrozaityte L, Cimbaliene L, Utkus A. Dysregulation of microRNAs as the risk factor of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: Systematic review. *Endokrynol Pol* 2021;72:145–52. <https://doi.org/10.5603/EP.A2021.0010>.
- [114] Qiu Z, Li H, Wang J, Sun C. MiR-146a and miR-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep* 2017;38:2735–40. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5994>.
- [115] Lima CR, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kimura ET, Santos MF. MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different

Papillary Thyroid Carcinoma cells. *BMC Cancer* 2016;16:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2146-z>.

- [116] Chou CK, Yang KD, Chou FF, Huang CC, Lana YW, Lee YF, Kang HY, Liu RT. Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:196–205. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2666>.
- [117] Sun Y, Yu S, Liu YYY, Wang F, Liu YYY, Xiao H. Expression of miRNAs in papillary thyroid carcinomas is associated with BRAF mutation and clinicopathological features in Chinese patients. *Int J Endocrinol* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/128735>.
- [118] Wang Z, Zhang H, He L, Dong W, Li J, Shan Z, Teng W. Association between the expression of four upregulated miRNAs and extrathyroidal invasion in papillary thyroid carcinoma. *Onco Targets Ther* 2013;6:281–7. <https://doi.org/10.2147/OTT.S43014>.
- [119] Peng Y, Li C, Luo DC, Ding JW, Zhang W, Pan G. Expression profile and clinical significance of MicroRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules* 2014;19:11586–99. <https://doi.org/10.3390/molecules190811586>.
- [120] Acibucu F, Dökmetaş HS, Tutar Y, Elagoz Ş, Kilicli F. Correlations between the expression levels of micro-RNA146b, 221, 222 and p27Kip1 protein mRNA and the clinicopathologic parameters in papillary thyroid cancers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;122:137–43. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1367025>.
- [121] Han PA, Kim HS, Cho S, et al. Association of BRAFV600E Mutation and MicroRNA Expression with Central Lymph Node Metastases in Papillary Thyroid Cancer: A Prospective Study from Four Endocrine Surgery Centers. *Thyroid* 2016;26:532–42. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0378>.
- [122] Yang F, Zhang H, Leng X, Hao F, Wang L. miR-146b measurement in FNA to distinguish papillary thyroid cancer from benign thyroid masses. *Br J Biomed Sci* 2018;75:43–5. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1347336>.
- [123] Lee YS, Lim YS, Lee JC, Wang SG, Park HY, Kim SY, Lee BJ. Differential expression levels of plasma-derived miR-146b and miR-155 in papillary thyroid cancer. *Oral Oncol* 2015;51:77–83.

<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.10.006>.

- [124] Jiang K, Li G, Chen W, et al. Plasma exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are potential biomarkers for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinomas. *Onco Targets Ther* 2020;13:1311–9. <https://doi.org/10.2147/OTT.S231361>.
- [125] Sun M, Fang S, Li W, Li C, Wang L, Wang F, Wang Y. Associations of miR-146a and miR-146b expression and clinical characteristics in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biomarkers* 2015;15:33–40. <https://doi.org/10.3233/CBM-140431>.
- [126] Zhou Y-LL, Liu C, Dai XX, Zhang X-HH, Wang O-CC. Overexpression of miR-221 is associated with aggressive clinicopathologic characteristics and the BRAF mutation in papillary thyroid carcinomas. *Med Oncol* 2012;29:3360–6. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0315-8>.
- [127] Xiang D, Tian B, Yang T, Li Z. miR-222 expression is correlated with the ATA risk stratifications in papillary thyroid carcinomas. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e16050. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016050>.
- [128] Yu S, Liu Y, Wang J, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2084–92. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3059>.
- [129] Goto A, Tanaka M, Yoshida M, et al. The low expression of MIR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases. *PLoS One* 2017;12:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181270>.
- [130] Khordadmehr M, Jigari-Asl F, Ezzati H, Shahbazi R, Sadreddini S, Safaei S, Baradaran B. A comprehensive review on miR-451: A promising cancer biomarker with therapeutic potential. *J Cell Physiol* 2019;234. <https://doi.org/10.1002/jcp.28888>.
- [131] Liu X, Zhang A, Xiang J, Lv Y, Zhang X. miR-451 acts as a suppressor of angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting the IL-6R-STAT3 pathway. *Oncol Rep* 2016;36:1385–92. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4971>.
- [132] Zhang M, Wu W, Gao M, Fei Z. MicroRNA-451 as a prognostic

- marker for diagnosis and lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biomarkers* 2017;19:437–45. <https://doi.org/10.3233/CBM-170059>.
- [133] Wang Z, Zhang H, Zhang P, Li J, Shan Z, Teng W. Upregulation of miR-2861 and miR-451 expression in papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis. *Med Oncol* 2013;30:577. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0577-9>.
- [134] Liu C, Xing M, Wang L, Zhang K. miR-199a-3p downregulation in thyroid tissues is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Biomed Sci* 2017;74:90–4. <https://doi.org/10.1080/09674845.2016.1264705>.
- [135] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [136] Zhang Y, Pan J, Xu D, Yang Z, Sun J, Sun L, Wu Y, Qiao H. Combination of serum microRNAs and ultrasound profile as predictive biomarkers of diagnosis and prognosis for papillary thyroid microcarcinoma. *Oncol Rep* 2018;40:3611–24. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6776>.
- [137] Shen R, Liyanarachchi S, Li W, et al. MicroRNA Signature in Thyroid Fine Needle Aspiration Cytology Applied to “Atypia of Undetermined Significance” Cases. *Thyroid* 2012;22:9–16. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0081>.
- [138] Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA Expression Profiling of Thyroid Tumors: Biological Significance and Diagnostic Utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1600–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2696>.
- [139] Wei WJ, Shen CT, Song HJ, Qiu ZL, Luo QY. MicroRNAs as a potential tool in the differential diagnosis of thyroid cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016;84:127–33. <https://doi.org/10.1111/cen.12696>.

PRIEDAI

1 priedas. Vilniaus regioninio Biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimo atlikti biomedicininį tyrimą ir dokumentų pakeitimo pritarimo kopijos.



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS
Viejoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. info@er.vu.lt
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.
Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705,
el. p. mf@mf.vu.lt
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2017-03-07 Nr.158200-17-905-414

Tyrimo pavadinimas:

Skydliaukės karcinomų mikro RNR analizė ir prognostinė reikšmė

Protokolo Nr.: 1
Versija: VI.0
Data: 2016-12-29

Informuoto asmens sutikimo forma:

Pagrindinis tyrėjas **Loreta Cimbališienė**

Įstaigos pavadinimas: VUL Santariškių klinikos Medicinos genetikos centras
Adresas: Santariškių g. 2, 08661 Vilnius
Leidimas galioja iki: **2020-10-31**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2017/03, vykusio 2017 m. kovo 7 d. sprendimu.

Pirmininkas



Saulius Vosylius



VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
sūi generis darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

Biomedicininio tyrimo „Skydliaukės karcinomų mikro RNR analizė ir prognostinė reikšmė“ pagrindinei tyrėjai Loretai Cimbališienei 2020-11-28 Nr. 2020-LP-87

**PRITARIMAS
BIOMEDICININIO TYRIMO DOKUMENTŲ PAKEITIMAMS**

Leidimo Nr. 158200-17-905-414 pakeitimas Nr. 1

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas išnagrinėjęs prašymą atlikti su vykdomu biomedicininiu tyrimu „*Skydliaukės karcinomų mikro RNR analizė ir prognostinė reikšmė*“ (leidimas Nr. 158200-17-905-414, išduotas 2017 03 07 d.) susijusių dokumentų pakeitimus pritaria, kad pakeitimai **atitinka** LR biomedicininių tyrimų etikos įstatymo II skyriuje nustatytiems biomedicininių tyrimų etikos reikalavimams. Atsižvelgiant į tai **pritaria**, kad būtų:

- vadovaujamosi protokolu (Nr. 1, versijos Nr. 1.1, data 2020 09 18 d.);
- tyrimas pratęsiamas iki 2022 09 mėn.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylus

2 priedas. Valstybinė duomenų apsaugos inspekcijos leidimo atlikti asmens duomenų tvarkymą mokslinio tyrimo tikslu kopija.



VALSTYBINĖ DUOMENŲ APSAUGOS INSPEKCIJA

VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės
Santariškių klinikoms
(per E. pristatymo informacinę sistemą
ir el. paštą loreta.cimbalistiene@santa.lt)

SPRENDIMAS DĖL LEIDIMO VŠĮ VILNIAUS UNIVERSITETO LIGONINĖS SANTARIŠKIŲ KLINIKOMS ATLIKTI ASMENS DUOMENŲ TVARKYMO VEIKSMUS

2017 m. balandžio 11 d. Nr. 2R-1111(2.6-1.)
Vilnius

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija (toliau – Inspekcija), išnagrinėjusi VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų pateiktą Pranešimą dėl išankstinės patikros (Inspekcijoje gauta 2017-03-22, reg. Nr. 1R-2152) (toliau – Pranešimas) dėl asmens duomenų apie sveikatą tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo tikslu,

n u s t a t ė,

kad Pranešime nurodyti asmens duomenų tvarkymo veiksmai atitinka Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatyme nustatytus asmens duomenų tvarkymo ir duomenų subjektų teisių įgyvendinimo reikalavimus bei numatytos tinkamos organizacinės ir techninės duomenų saugumo priemonės.

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, vadovaudamasi Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 33 straipsniu, Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos direktoriaus 2016 m. birželio 22 d. įsakymu Nr. 1T-23 patvirtintų Išankstinės patikros atlikimo taisyklių 12 ir 19.2 punktais,

n u s p r e n d ė i a

VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikoms išduoti leidimą atlikti Pranešime nurodytų asmens duomenų apie sveikatą tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo „Skydliaukės karcinomų mikro RNR analizė ir prognostinė reikšmė“ (Protokolo Nr. 1) tikslu, veiksmus.

Šis sprendimas Administracinių bylų teisenos įstatymo nustatyta tvarka per vieną mėnesį nuo jo įteikimo dienos gali būti skundžiamas Vilniaus apygardos administraciniam teismui.

Direktorius pavaduotoja,
atliekanti direktoriaus funkcijas



Dijana Štinkūnienė

3 priedas. Informuoto asmens sutikimo forma ir sutikimas dalyvauti biomediciniame tyrime.

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Biomedicininio / klinikinio vaistinio preparato tyrimo pavadinimas:

Skyd liaukės karcinomų miRNR analizė ir prognostinė reikšmė

Protokolo Nr.: 1

Užsakovas: Vilniaus Universitetas Medicinos fakultetas

Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21, 03101 Vilnius

Tel.: (8 5) 239 8700

El. paštas:

mf@mf.vu.lt

Užsakovo atstovas: Vilniaus Universitetas Medicinos fakultetas

Atsakingas tyrėjas: Loreta Cimbališienė

Tyrimo centro pavadinimas: VUL Santariškių klinikos Medicinos genetikos centras

Adresas: Santariškių 2, 08661 Vilnius Tel.: +370 5 2365116

El. paštas: loreta.cimbališiene@santa.lt

1. Kokia šio dokumento paskirtis?

Jūs kviečiamas (-a) dalyvauti biomediciniame tyrime. Šioje sutikimo formoje pateikta

informacija, padėsianti Jums apsispręsti dėl dalyvavimo tyrime. Neskubėkite, atidžiai

perskaitykite šią formą ir užduokite gydytojui tyrėjui visus Jums iškilusius klausimus. Jūs neturėtumėte pasirašyti šios formos tol, kol nesusipažinote su visa šioje formoje

Jums pateikta informacija ir kol į visus Jūsų klausimus nebus atsakyta.

Biomedicininiai tyrimai - tai yra moksliniai tyrimai, kuriuos atliekant dalyvauja žmonės (taip vadinami tiriamieji). Pagrindinis tokių tyrimų tikslas yra didinti medicinos mokslo pažangą.

2. Kodėl atliekami biomedicininiai?

Svarbu suprasti, kad nors biomedicininio tyrimo metu Jums bus atliekami papildomi tyrimai, biomedicininis tyrimas iš esmės skiriasi nuo įprastos (kasdienės) klinikinės praktikos. Įprastos (kasdienės) klinikinės praktikos tikslas yra Jus (t. y. konkretų asmenį, pacientą) išgydyti ir/ar pagerinti Jūsų sveikatos būklę. Pagrindinis biomedicininio (mokslinio) tyrimo tikslas – gauti naujų medicinos mokslo žinių, kurios ateityje padėtų kitų šia liga sergančių pacientų sveikatai. Kitaip tariant, pagrindinis šio tyrimo tikslas nėra tiesioginė nauda Jūsų sveikatai.

3. Kodėl atliekamas šis tyrimas?

Papilinė karcinoma yra dažniausias skydliaukės vėžys. Dažniausiai pacientų, sergančių skydliaukės papiline karcinoma, prognozė yra gera – išgyvenamumas virš 10 metų siekia daugiau nei 90 proc. Nepaisant geros prognozės, gydant pacientus, sergančius skydliaukės vėžiu, dažnai susiduriama su vėžio atsinaujinimu kaklo limfmazgiuose. Todėl įtarus skydliaukės vėžį, dar iki operacijos, yra labai svarbu nustatyti jo išplitimą, ligos agresyvumą. Tai padėtų gydytojui parinkti tinkamą individualią gydymo ir tolimesnio stebėjimo taktiką. Šiuo metu prieinami diagnostiniai tyrimai neleidžia tiksliai nustatyti vėžio išplitimo. Todėl gydymo taktika paprastai būna agresyvi. Kuo didesnė operacijos apimtis, tuo daugiau pooperacinių komplikacijų. Tačiau ne visada reikalingas agresyvus chirurginis gydymas, kuris padidina ne tik pooperacinių komplikacijų skaičių bet ir pablogina pacientų gyvenimo kokybę.

Šio tyrimo tikslas – nustatyti naujus skydliaukės vėžio biožymenis (miRNR), kurie leistų dar iki operacijos prognozuoti skydliaukės vėžio agresyvumą, ligos progresavimą, leistų parinkti tinkamą operacijos apimtį ar net visai išvengti chirurginio gydymo. Tai sumažintų pooperacinių komplikacijų skaičių, pagerintų pacientų gyvenimo kokybę.

4. Kokie asmenys pasirenkami dalyvauti šiame tyrime?

Kviečiame Jus dalyvauti biomediciniame tyrime, nes Jums buvo nustatyti mazgai skydliaukėje. Visiems sutikusiems dalyvauti tiriamiesiems pacientams iš mėginių, kurie buvo paimti atliekant aspiracinę skydliaukės mazgų punkcija, bus atliekami papildomi molekuliniai genetiniai tyrimai (miRNR). Jokių papildomų intervencinių procedūrų Jums nebus atliekama, tik bus naudojama anksčiau paimta medžiaga. Todėl jokių papildomų nepatogumų, skausmo ar laiko sąnaudų jūs nepatirsite.

5. Kas atlieka / užsako šį biomedicininį / klinikinį vaistinio preparato tyrimą?

Šio biomedicininio tyrimo užsakovas Vilniaus Universitetas Medicinos fakultetas. Finansavimas skiriamas pagal Europos Sąjungos struktūrinių fondų projektą „Doktorantūros studijų plėtra“. Biomedicininio tyrimo tyrėja yra Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto doktorante gydytoja endokrinologė Romėna Laukienė.

6. Tikimybė patekti į skirtingas tiriamųjų grupes ir dalyvavimo šiose grupėse ypatybės.

Pacientai, pagal nustatytus pakitimus skydliaukėje bus suskirti į grupes. Į pirmą grupę pateks pacientai su nustatytu skydliaukės vėžiu, bet nerastomis metastazėmis limfmazgiuose, antroje grupėje pateks pacientai su patvirtintu išplitusiu į kaklo limfmazgius skydliaukės vėžiu. Kontrolinėje grupėje bus pacientai, kuriems yra diagnozuoti ir, atlikus skydliaukės mazgų aspiracinę punkciją, patvirtinti gerybiniai skydliaukės mazgai. Visiems pacientams, nepriklausomai nuo grupės, bus atliekami tokie patys molekuliniai genetiniai tyrimai (miRNR analizė).

7. Kiek truks Jūsų dalyvavimas šiame tyrime?

Bendra tyrimo trukmė – keturi metai. Tiek laiko bus įtraukiami pacientai į tyrimą. Jums bus skiriamas įprastinis skydliaukės mazgų ištyrimas ir gydymas. Papildomų vizitų (daugiau nei įprastai laikytumėtės pas gydytoją) nebus. Iš jūsų anksčiau paimto skydliaukės mazgo mėginio, Vilniaus Universiteto Santariškių klinikų molekulinės genetikos laboratorijoje bus atliekami papildomi genetiniai tyrimai – miRNR analizė.

Beto gydytoja, atliekanti tyrimą, iš jūsų ambulatorinės paciento kortelės ir elektroninės duomenų bazės surinks sekančius duomenis: TTH tyrimą, tireoglobulino tyrimą, skydliaukės ultragarsinio tyrimo aprašymą, aspiracinės skydliaukės mazgo punkcijos aprašymą bei citologinį įvertinimą, operacijos aprašymą (jeigu bus atlikta) ir pooperacinės medžiagos ištyrimo aprašymą ir įvertinimą. Šie duomenys bus panaudoti analizuojant skirtumus tarp tiriamųjų grupių.

8. Kokiose šalyse bus vykdomas šis tyrimas?

Tyrimas bus atliekamas Lietuvoje, viename centre.

9. Kiek tiriamųjų dalyvaus numatyta šiame tyrime?

Į tyrimą planuojama įtraukti 100 pacientų, kuriems bus nustatytas ir patvirtintas skydliaukės vėžys, iš jų apie 50 pacientų su išplitusiu vėžiu ir apie 50 pacientų su neišplitusiu vėžiu. Kontrolinėje grupėje (su gerybiniais skydliaukės mazgais), irgi apie 50 pacientų. Minėtos pacientų grupės bus lyginamos tarpusavyje.

10. Ką Jums reikės daryti?

Prašysime Jūsų leisti paimitus skydliaukės mazgų aspiratus saugoti laboratorijoje iki tyrimo pabaigos. Iš jų bus atliekam miRNR analizė. Jokių kitų papildomų tyrimų ar gydymo procedūrų nebus atliekama.

11. Ar dalyvavimas biomedicininiam / klinikiniam vaistinio preparato tyrime Jums bus naudingas? / Kokios naudos galite tikėtis dalyvaudami šiame tyrime?

Tyrimo metu gauta informacija mokslininkams gali padėti nustatyti naujus skydliaukės vėžio žymenis, kurie leistų dar iki operacijos prognozuoti skydliaukės vėžio agresyvumą, ligos progresavimą, kas leistų tiksliau parinkti tinkamą gydymą. Tiesioginės naudos dalyvaudamas tyrime Jūs neturėsite.

12. Kokia su dalyvavimu šiame tyrime susijusi rizika ir nepatogumai?

Kadangi tyrimo metus jums nebus atliekamos jokios papildomos intervencinės procedūros, jums nereikės papildomai atvykti pas gydytoją, todėl jokios rizikos ar nepatogumų Jūs nepatirsite.

13. Jei atsitiktų kas nors negero? (Informacija apie draudimą)

Šio biomedicininio tyrimo metu bus taikomi tik neintervenciniai tyrimo metodai (molekulinis ištyrimas laboratorijoje iš anksčiau paimtos skydliaukės mazgo medžiagos, medicininių duomenų rinkimas iš ambulatorinės kortelės ir elektrolinės duomenų bazės), kurie nekelia rizikos Jūsų sveikatai, todėl biomedicininis tyrimas nėra apdraustas biomedicininio tyrimo užsakovų ir pagrindinių tyrėjų civilinės atsakomybės draudimu.

14. Ar galėsite nutraukti dalyvavimą tyrime?

Jūsų dalyvavimas šiame tyrime yra savanoriškas. Galite nuspręsti bet kuriuo metu pasitraukti iš tyrimo apie tai pranešęs gydytojui tyrėjui. Jums nebus skirta jokių nuobaudų ir neprarasite jokių savo, kaip paciento, teisių.

15. Jūsų dalyvavimo tyrime nutraukimo aplinkybės ir kriterijai

Tyrimo gydytojas ar užsakovas turi teisę bet kuriuo metu sustabdyti tyrimą ar Jūsų dalyvavimą jame.

16. Kokias pasirinkimo galimybes turėsite, jeigu nesutiksite dalyvauti šiame tyrime arba atšauksite sutikimą jame dalyvauti?

Tyrimo metu dalyvaujate savanoriškai, todėl turite teisę atsisakyti, o pradėjęs galite bet kada iš jo pasitraukti. Jūsų sprendimas atsisakyti dalyvauti ar nutraukti dalyvavimą tyrime nedarys jokios įtakos teikiamai įprastinei sveikatos priežiūrai.

17. Ar dalyvaudami šiame tyrime patirsite kokių nors išlaidų?

Už dalyvavimą biomedicininuose tyrimuose atlygis nėra mokamas. Dalyvaudami tyrime Jūs nepatirsite jokių išlaidų.

18. Ar Jūsų asmens duomenys bus konfidencialūs?

Jeigu nuspręsite dalyvauti šiame tyrime, gydytojas tyrėjas naudos tyrimui atlikti reikalingus Jūsų asmens duomenis, kaip išdėstyta šioje sutikimo formoje. Šie duomenys gali būti Jūsų vardas, pavardė, telefono numeris, medicininė istorija, gimimo data ir informacija, gauta tyrimo metu. Biomedicininį tyrimą atliekant gauta sveikatos informacija, leidžianti nustatyti asmens tapatybę, yra konfidenciali ir gali būti teikiama tik pacientų teisės ir asmens duomenų apsaugą reglamentuojančių įstatymų nustatyta tvarka.

Siekiant apsaugoti duomenų konfidencialumą, Jums bus suteiktas specialus kodas. Sąrašą, kuriame Jūsų vardas ir pavardė susiejami su kodu ir visus su tyrimu susijusius dokumentus saugos tyrėjas rakinamoje spintoje, į kurią prieigą turės tik šio tyrimo tyrėjai. Kompiuteris, kuriame bus saugomi elektroniniai tyrimo dokumentai ir duomenys, apsaugoti slaptažodžiu.

Jei sutiksite dalyvauti šiame tyrime, gydytojas tyrėjas naudos tyrimui atlikti reikalingus Jūsų asmeninius duomenis.

Jūs nebūsite identifikuotas pagal vardą, pavardę paskelbtose tyrimo ataskaitose, bet kokiose kitose mokslinėse publikacijose ar pristatymuose.

19. Kas ir koku tikslu galės susipažinti su Jūsų asmens duomenimis?

Pasirašydami šį dokumentą Jūs sutinkate leisti tyrimą atliekančiam gydytojui (tyrėjui) Jūsų asmens duomenis teikti: etikos komitetui, kuris vykdys šio tyrimo priežiūrą ir užsakovui. Etikos komitetui ir užsakovui dirbantys asmenys, atsakingi už tyrimo taisyklių laikymosi kontrolę, visus Jūsų surinktus asmens duomenis galės matyti tyrimo centre.

Jūsų leidimas naudotis ir teikti Jūsų sveikatos duomenis nėra apribotas laike. Raštu kreipęsi į gydytoją tyrėją galėsite bet kuriuo metu atšaukti leidimą naudotis ir teikti Jūsų sveikatos duomenimis. Nuo to momento nebebus renkami jokie Jus identifikuojantys sveikatos duomenys. Tačiau iki to laiko sukaupti Jūsų sveikatos duomenys bus ir toliau naudojami bei teikiami kitiems šioje formoje nurodyta tvarka. Tam kad užtikrinti tyrimo mokslinį vientisumą, gali būti jog negalėsite susipažinti su kai kuriais Jūsų su tyrimu susijusiais duomenimis iki tol kol tyrimas bus pabaigtas. Pasibaigus tyrimui, galėsite kreiptis raštu į gydytoją tyrėją prašydamas (-ama) teisės susipažinti su tyrimo metu apie Jus sukauptais sveikatos duomenimis ir pataisyti klaidas.

20. Kiek laiko bus saugomi tyrimo metu surinkti duomenys ir kas už tai bus atsakingas?

Vadovaujantis VUL Santariškių klinikų dokumentų saugojimo ir archyvavimo valdymo nustatyta tvarka, tyrimo dokumentai su Jūsų duomenimis bus saugomi tyrimo centre ne mažiau kaip 15 metų nuo tyrimo pabaigos, vėliau

sunaikinami. Dokumentai bus saugomi Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų, Santariškių 2, Vilnius, LT-08661 archyve. Už dokumentų saugojimą tyrimo centre bus atsakinga pagrindinė tyrėja ar jos įgaliotas asmuo.

21. Kas įvertino šį biomedicininį / klinikinį vaistinio preparato tyrimą? / Į ką kreiptis, jeigu iškiltų klausimų?

Dėl savo kaip tyrimo dalyvio teisių galite kreiptis į:

- Leidimą atlikti šį biomedicininį tyrimą išdavusį Vilniaus regioninį biomedicininių tyrimų etikos komitetą, M. K. Čiurlionio g. 21/27 (231 kab.), LT-03101, Vilnius, tel. (8-5) 2686998, el. paštas: rbtek@mf.vu.lt.
- Pagrindinę tyrėją prof. Loretą Cimbališienę, tel. +370 5 2365116, el. paštas: loreta.cimbališiene@santa.lt
- Tyrimą atliekančią gydytoją Romeną Laukiene, tel.2365135, el.paštas: romena.laukiene@santa.lt.
- Leidimą atlikti asmens duomenų tvarkymo veiksmus **išdavusę Valstybinę duomenų apsaugos inspekciją**, A. Juozapavičiaus g. 6, LT-09310 Vilnius, tel. (8-5) 2127535, el. paštas: ada@ada.lt

SUTIKIMAS DALYVAUTI BIOMEDICININIAME TYRIME

- Aš perskaičiau šią Informuoto asmens sutikimo formą ir supratau man pateiktą informaciją.
- Man buvo suteikta galimybė užduoti klausimus ir gavau mane tenkinančius atsakymus.
- Supratau, kad galiu bet kada pasitraukti iš tyrimo, nenurodydama(s) priežasčių.
- Supratau, kad norėdama(s) atšaukti sutikimą dalyvauti biomediciniame tyrime, raštu turiu apie tai informuoti tyrėją.
- Patvirtinu, kad turėjau užtektinai laiko apsvarstyti man suteiktą informaciją apie biomedicininį tyrimą.
- Supratau, kad dalyvavimas šiame tyrime yra savanoriškas.
- Patvirtinu, kad sutikimą dalyvauti šiame biomediciniame tyrime duodu laisva valia.
- Leidžiu naudoti asmens duomenis ta apimtimi ir būdu, kaip nurodyta Informuoto asmens sutikimo formoje.
- Patvirtinu, kad gavau Informuoto asmens sutikimo formos egzempliorių, pasirašytą tyrėjo.

Asmuo

_____ vardas	_____ pavardė	_____ atstovavimo pagrindas	_____ parašas	_____ pasirašymo data ir laikas
-----------------	------------------	-----------------------------------	------------------	--

Patvirtinu, kad suteikiau informaciją apie biomedicininį tyrimą aukščiau nurodytam asmeniui.

Patvirtinu, kad asmeniui (ar kitam sutikimą duoti turinčiam teisę asmeniui) buvo skirta pakankamai laiko apsispręsti dalyvauti biomediciniame tyrime, atsižvelgiant į biomedicininio tyrimo pobūdį, taip pat įvertinus kitas aplinkybes, galinčias daryti įtaką priimamam sprendimui.

Aš skatinau asmenį (ar kitą sutikimą turintį teisę duoti asmenį) užduoti klausimus ir į juos atsakiau.

Tyrėjas

_____ vardas	_____ pavardė	_____ pareigos tyrime	_____ parašas	_____ pasirašymo data ir laikas
-----------------	------------------	-----------------------------	------------------	---------------------------------------

4 priedas. Mokslinio tyrimo metu atlikti darbai ir disertacijos autorės indėlis.

Dokumentų Vilniaus regioninio bioetikos komiteto leidimui gauti paruošimas	100 %
Dokumentų valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimui gauti paruošimas	100 %
Tiriamųjų atranka	100 %
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo pasirašymo procedūra	100 %
Tiriamųjų asmenų klinikinis ištyrimas	100 %
Ultragarsinis skydliaukės ir kaklo limfmazgių įvertinimas	100 %
Aspiracinė skydliaukės mazgų punkcija	100 %
Citologinis skydliaukės mazgų aspiratų tyrimas	0 %
Operacinis skydliaukės mazgų gydymas	0 %
Histologinis operacinės medžiagos ištyrimas	0 %
miRNR raiškos nustatymas NKS metodu	20 %
miRNR ištyrimas RL-PGR metodu	30 %
Tiriamųjų duomenų rinkimas ir suvedimas Excel laikmenoje	100 %
Statistinė duomenų analizė	70 %

APIE AUTORE

Vardas, pavardė	Romena Laukienė
Telefonas	+370 698 09923
Darbovietės adresas	VšĮ VUL Santaros klinikos, Santariškių 2, Vilnius 08661, Lietuva
Ankstesnė ir dabartinė klinikinė praktika	Pacientų, sergančių skydliaukės, prieskydinių liaukų, antinksčių, hipofizės, cukriniu diabetu bei retomis endokrinologinėmis ligomis gydymas bei priežiūra.
Veiklos sritis	Gydytoja endokrinologė, licencijos Nr. MPL-09657
Išsilavinimas ir kvalifikacija	1996 m. – Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, medicinos studijų krypties, medicinos programa. Medicinos gydytoja 2002 m. – Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, endokrinologijos programa. Gydytoja endokrinologė 2003 m. – gydytojo echoskopuotojo kvalifikacija
Darbovietė	2002 m. iki dabar – VšĮ VUL SK, Endokrinologijos centras, gydytoja endokrinologė 2003 m. iki dabar – VšĮ VUL SK, Radiologijos ir branduolinės medicinos centras, gydytoja echoskopuotoja 2018 m. iki dabar – VU MF, Klinikinės medicinos institutas, Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinika, jaun. asistentė
Klinikinių tyrimų patirtis	2004-2007 – klinikinių tyrimų koordinatorė 2007-2010 – vyresnioji klinikinių tyrimų koordinatorė 2010-2014 – medicinos recenzentė 2010-2021 – tyrėja 2013-2019 – pagrindinė tyrėja
Narystė profesinėse organizacijose	Nuo 2002 m. – Lietuvos Endokrinologų draugija Nuo 2008 m. – Europos Endokrinologų asociacija Nuo 2016 m. – Amerikos Endokrinologų asociacija Nuo 2017 m. – Vilniaus Endokrinologų draugija Nuo 2018 m. – Lietuvos Radiologų asociacija

PADĖKA

Visų pirma, nuoširdžiai dėkoju Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslo instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros vadovui ir šio darbo moksliniam konsultantui prof. dr. Algirdui Utkui už suteikta galimybę atlikti šį darbą, už pasitikėjimą, pagalbą, nepaisant itin užimto grafiko ir daugybės atsakomybių.

Nuoširdžiai dėkoju šio darbo mokslinei vadovei prof. dr. Loretai Cimbalistienei už vertingą pagalbą mokslinio darbo rengimo metu, jos gerumą, šiltą bendravimą ir nuolatinį palaikymą.

Ypatinga mano padėka skirta doc. dr. Laimai Ambrozaitytei už pagalbą atliekant genetinius tyrimus ir kasdienį darbą laboratorijoje, kantrybę ir supratingumą, už draugišką ir nuoširdų palaikymą, disertacijos rankraščio peržiūrą.

Mano padėkos žodžiai doc. dr. Almai Molytei už vertingą pagalbą atliekant bioinformacinę duomenų analizę.

Už idėjas, patarimus, nuolatinį padrąšinimą ir palaikymą esu dėkinga prof. dr. Algirdui Edvardui Tamošiūnui.

Nuoširdi padėka VUL SK Laboratorinės medicinos centro Hematologijos ir bendrosios citologinės laboratorijos vedėjai Elvyrai Ostanevičiūtei už kasdieninį darbą ir kolegišką pagalbą atrenkant citologinius mėginius.

Dėkoju darbą vertinusiems recenzentams – prof. dr. Arvydui Laurinavičiui, doc. dr. Aušrai Matulevičienei bei doc. dr. Editai Mišeikytei Kaubrienei už vertingas pastabas, patobulinusias šį darbą.

Dėkoju VUL SK Endokrinologijos centro kolektyvui už draugišką darbinę aplinką.

Skiriu nuoširdžią padėką tiriamiesiems, sutikusiems dalyvauti šiame tyrime.

Už palaikymą ir padrąšinimą padėkos žodžius tariau savo draugams.

Labiausiai noriu padėkoti visiems savo šeimos nariams už jų meilę, kantrybę, besąlygišką palaikymą mano kelyje ir buvimą kartu.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.