Медицински университет -Варна
„Проф. Д-р Параскев Стоянов”

Факултет по медицина
Катедра по обща клинична патология,
съдебна медицина и деонтология

МОРФОЛОГИЧНА И ИМУНОХИСТОХИМИЧНА СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ТУМОРИТЕ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА

Д-р Доротея Василева Малинова

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“,
научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител:

Проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Варна, 2019

Дисертационният труд съдържа 156 стандартни страници и е онагледен с 49 фигури и 25 таблици. Литературната справка включа 190 литературни източника, от които 5 са на кирилица и 185 са на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на .....

от .....ч в.....

въз основа на Заповед.....на Ректора на МУ-Варна, пред научно жури в състав:

Външни членове:

Проф. д-р Радина Стефанова Иванова, д.м.н.

Доц. д-р Екатерина Боянова Софтова, д.м.

Доц. д-р Веселин Тодоров Беловеждов, д.м.

Вътрешни членове:

Проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Проф. д-р Добринка Демирева Радойнова, д.м.

Резервен външен член:

Доц. д-р Силвия Николаева Генова, д.м.

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Петър Иванов Генев, д.м.

Съдържание:

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

АТА – американска тиреоидна асоциация

СЗО – световна здравна организация

ТАБ – тънкоиглена аспирационна биопсия

ПК – папиларен карцином

ФВПК – фоликуларен вариант на папиларен карцином

ФК – фоликуларен карцином

ОК – онкоцитарен карцином

ФА – фоликуларен аденом

ОА - онкоцитарен аденом

НС – нодозна струма

ХЛТ – хроничен лимфоцитарен тиреоидит

ТХ – тиреоидит на Хашимото

ЛТ – огнищен лимфоцитарен тиреоидит

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

ТСХ – тиреоиден стимулиращ хормон

РЛВ – регионални лимфни възли

ППС - положителна предиктивна стойност

НПС - негативна предиктивна стойност

Ч - чувствителност

Сп - специфичност

ДТ - диагностична точност

На латиница

HPF – high power field

Bcl-2 – B Cell Lymphoma - 2

Bax – Bcl-2–associated X *protein*

AJCC - American Joint Committee on Cancer

BRAF V - raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

HBME-1 -Hector Battifora mesothelial-1

RAS - Rat sarcoma oncogene; a transforming oncogene

RET - Rearranged during transfection; a proto-oncogene encoding a receptor tyrosine kinase

TTF-1 - Transcription termination factor 1

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Точната диагноза на туморите на щитовидната жлеза е определяща за лечението, изисква познаване на специфичните морфологични особености на всеки тиреоиден тумор, както и на критериите за поставяне на съответната диагноза (Lamarina L et al., 2018). Злокачествените неоплазми на щитовидната жлеза са около 1% от всички малигнени тумори. На базата на хистологичната характеристика, те са категоризирани в четири основни категории: папиларен карцином, фоликуларен карцином, анапластичен карцином и медуларен карцином, като в последната класификация на СЗО от 2017 г. са включени и някои по-редки варианти. Приблизително 90-95% от тиреоидните карциноми са добре диференцирани папиларни или фоликуларни карциноми, които водят началото си от фоликуларните клетки на щитовидната жлеза, около 2-3% са медуларни карциноми, с произход от С клетки на щитовидната жлеза и 2% са ниско диференцирани и анапластични карциноми. Диференцираните тиреоидни карциноми имат относително благоприятно протичане (Katoh et al., 2015; Lloyd RV et al., 2017). Леталитетът, предизвикан от тиреоидните карциноми, е нисък. Това е свързано с подобрената диагностика и лечение на пациентите през последните 10–15 години. Независимо от благоприятното поведение на диференцираните карциноми, в около 8-10 % от случаите настъпва летален изход, което е свързано с рецидив или персистиране на заболяването (Katoh et al., 2015).

Идентифицирането на нови молекулярни биомаркери при тиреоиден карцином в комбинация с морфологичните характеристики гарантира подобряване точността на диагнозата и определяне прогнозата при пациентите (Lamarina L et al., 2018).

Генът *CK19* е с повишена експресия при малигнените тиреоидни клетки. Имунохистохимично, CK19 е подходящ маркер за идентифициране на папиларен карцином, но сензитивността му е ниска за верификация на фоликуларен карцином. Оскъдни и противоречиви са данните относно експресията на CK19 при останалите варианти на тиреоидния карцином и в съседната нетуморна тъкан (Bose D et al., 2012; Siderova M et al., 2016).

През последните десетилетия туморната ангиогенеза е обект на задълбочени проучвания. Инвазията на васкуларните структури от неопластични клетки се счита за по-агресивен маркер, отколкото размера на тумора. Стана известно, че васкуларизацията при малигнените тумори е абнормална и тя е предиктивен фактор за метастази в лимфните възли, и за неблагоприятна прогноза (Cao F et al., 2013; He L et al., 2015). Антитялото CD34 е индикатор за васкуларна диференциация и е подхощящо за определяне на микроваскуларната плътност на туморната строма (Jebreel A et al., 2007).

Апоптозата, която представлява програмирана клетъчна смърт, обезпечава физиологичното равновесие и генетичната стабилност на организма чрез самоунищожение на генетично изменени и дефектни клетки (Hassan M et al., 2014). Двата основни протеина, които регулират апоптозата на клетките, са Bcl-2 и Bax. Bcl-2 блокира апоптозата, докато Bax индуцира апоптоза (Shanone C et al, 2015). Нормалните клеки имат ограничен живот и умират след определен брой деления. При карциномите,

нормалният контрол е нарушен, клетките на практика стават безсмъртни и способни да се разпространяват далеч от мястото на произход (Hassan M et al., 2014). Апоптотичните протеини са слабо проучени при тумори на щитовидната жлеза, както и връзката им с други имунохистохимични маркери (Gupta A et al., 2016).

Рядко се интерпретират фоновите заболявания при различните хистологични видове неоплазми и морфологичните промени в туморната и околната нетуморна тъкан.

Идеалният молекулярен биомаркер или панел от биомаркери би допринесъл за разграничаване на доброкачествените от злокачествени неоплазми, за верифициране на отделните хистологични варианти на тиреоиден карцином, и в резултат подобряване на диагнозата и лечението на пациентите.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:

Цел на настоящото изследване е да се проучи диагностичната и прогностична стойност на морфологичните характеристики и имунохистохимичната експресия на цитоскелетния протеин CK19, съдовия ендотелен маркер CD34, проапоптотичния Bax протеин и антиапоптотичния Bcl2 протеин при доброкачествени и злокачествени тумори на щитовидната жлеза.

За постигане на тази цел си поставихме следните **задачи**:

1. Да се определи относителният дял на доброкачествените и злокачествени тумори на щитовидната жлеза за петгодишен период (2013 - 2017 г. по данни на Клиниката по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“) и връзката им с клинико-морфологични показатели и фонови процеси на щитовидната жлеза.
2. Да се проучат и сравнят морфологичните промени в туморната и извънтуморна тъкан при доброкачествени и злокачествени тиреоидни неоплазми.
3. Да се изследва и сравни имунохистохимичната експресия на CK19 при тиреоидни неоплазми и в нетуморна тъкан на щитовидната жлеза.
4. Да се определи имунохистохимично, чрез маркера CD34, васкуларизацията на туморната и околната на тумора тъкан при доброкачествени и злокачествени тумори на щитовидната жлеза и се сравни МВП в двете локализации.
5. Да се проучи и сравни имунохистохимичната експресия на Bax в туморната и нетуморна тъкан при доброкачествени и злокачествени тумори на щитовидната жлеза.
6. Да се оцени имунохистохимичната реакция на антитяло Bcl-2 при доброкачествени и злокачествени тиреоидни неоплазми и се сравни експресията с околната на туморите тъкан.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

3.1. Материал.

Всички биопсични материали, включени в настоящото проучване, са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след стандартна обработка са включени в парафин с точка на топене 52-54ºC.

Пациентите, включени в настоящото изследване, са разделени в три групи:

Първа група. Първата група е представена от 607 неселектирани пациенти с хемитиреоидектомия или радикална тиреоидектомия за периода от 2013 до 2017 г. включително, оперирани в УМБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна. Проучването е ретроспективно, за петгодишен период и включва нетуморни и туморни заболявания на щитовидната жлеза. Морфологичната диагноза е поставена съгласно критериите на СЗО от 2017, като стадият на туморите е определен според 8-мото издание на AJCC (Lloyd RV et al., 2017).

Втора група. Втората група е представена от 122 селектирани пациента с доброкачествени и злокачествени тиреоидни тумори, оперирани в УМБАЛ „Св. Марина“ Варна за периода 2016 и 2017 г. Тази група включва 41 фоликуларни аденома, 9 онкоцитарни аденома, 55 папиларни карцинома, 4 фоликуларни карцинома, 3 медуларни карцинома и 6 онкоцитарни карцинома. Всички хистологични препарати от архива на Клиниката по обща и клинична патология повторно са огледани и от материалите на всеки пациент са избрани средно по две парафинови блокчета: едно от туморната формация и второ от тумора заедно с перитуморна тъкан. Определени са следните показатели: големина на тумора, наличие на калцификати, наличие на капсула, наличие на тиреоидит, некроза, фиброза, кръвоизливи.

Трета група. Третата група материали, подбрани от архива на Клиниката по обща и клинична патология са 40 парафинови блокчета с тиреоидни карциноми (25 папиларни карцинома, 10 фоликуларни карцинома и 5 онкоцитарни карцинома), 25 блокчета с аденоми (15 фоликуларни и 10 онкоцитарни), и 10 блокчета нетуморни лезии самостоятелно за контрола от пациенти без тумори на щитовидната жлеза. Подбраните материали са за имунохистохимично изследване. Срезите от тумора съдържат и нетуморна тъкан, защото едновременното им оценяване (на едно стъкло) е подходящо за определане на фоновите промени и сравняване на имунохистохимичната експресия в туморната и нетуморната тъкан. След изследване на околната на тумора тъкан, резултатът се сравняваше с контролната група - 10 нетуморни лезии.

3.2. Методи

Срези с дебелина 5 µm са оцветени с хематоксилин-еозин (ХЕ) за оценка на хистологичните промени в тумора и перитуморната тъкан. Материалите от втората и трета група са оценени по следните морфологични параметри и критерии за тяхното определяне.

3.2.1.Критерии за категоризиране на отделните параметри

1) **Размер на тумора**. Големината на тумора се определи спрямо най-големия измерен диаметър на формацията в сантиметри; при мултифокалност се избра лезията с най-голям диаметър, съгласно препоръките на AJCC (Amin MB et al, 2017).

2) **Капсула**. Туморът е пълно или непълно отграничен от тънка или дебела фиброзна капсула.

3) **Калцификати**. Отлагането на калций се приема за позитивно, когато има поне 2 или повече калциеви депозита в тумора. Калциевите отлагания се определиха като централни, в стромата (центъра) на лезията; и периферни, когато са локализирани перитуморно или в капсулата на лезията;

4) **Хистологичен тип** на тумора. Диагнозата е поставена според класификацията на СЗО за туморите на щитовидната жлеза от 2017 година (Lloyd RV et al., 2017). Всеки злокачествен тумор е стадиран по TNM класификацията (Amin MB et al, 2017);

5) **Присъствие или липса на хроничен лимфоцитарен тиреоидит (ХЛТ).** Критериите за тиреоидит на Хашимото (ТХ) са лимфни фоликули с герминативни центрове, онкоцитна метаплазия и деструкция на паренхима на тиреоидната жлеза. Огнищният лимфоцитарен тиреоидит (ЛТ) се характеризира с пръснати лимфоидни агрегати в паренхима на жлезата при липса на критерии за тиреоидит на Хашимото (Kumar et al., 2014).

6) **Фиброза в стромата на тумора**. Фиброзната тъкан в тумора е категоризирана като позитивна или негативна.

7) **Некрози.** Използвана е двустепенна скала за оценка: присъстват или липсват некрози.

3.2.2. Имунохистохимичен метод

Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024. Имунохистохимичното изследване е извършено на материалите от третата група.

Използвани са следните антитела:

1. Monoclonal mouse anti-human BCL2 clone: 124 (Dako);
2. Polyclonal rabbit anti-human Bax (Dako); monoclonal mouse anti-human Bax (Skytex);
3. Monoclonal mouse anti-human CD34 class II clone QBEnd (Dako);
4. Monoclonal mouse anti-human CK19 clone RCK108 (Dako);

При негативните контроли, вместо първичното антитяло, срези от парафиновите блокчета се инкубират с нормален неимунен серум. За позитивни контроли е използвана тъкан от малък мозък – клетки на Пуркиние за Bax, лимфен възел за bcl-2, чревна мукоза за CK19.

Таблица 1. *Използвани антитела, разреждания, тъкан за позитивна контрола, приложение и производител на антителата.*

Антитяло	Разреждане	Позитивна контрала	Маркер за	Фирма производител
anti- CK19 clone RCK108; mouse monoclonal to CK19	1:200	Дебелочревна лигавица	Епителен маркер	Dako
anti- CD34 class II clone QBEnd; mouse monoclonal to CD34	1:200	Черен дроб	Ендотел	Dako
anti- Bax; rabbit polyclonal to Bax	1:400	Малък мозък	Апоптоза	Dako
anti- Bax; mouse monoclonal to Bax	1:200	Малък мозък	Апоптоза	Skytex
anti- bcl-2 clone 124; mouse monoclonal to bcl-2	1:200	Лимфен възел	Апоптоза	Dako

Таблица 2. *Системи за оцветяване и други реактиви*

HRP- DAB System	Оригинална оцветяваща система	Dako
Mayer's hematoxilin	Counterstaining	Dako

3.2.2.1. Оценка на експресия на CK19

Оценката на експресията на CK19 е извършена, като са изследвани 10 полета от всеки материал на най-голямо увеличение (10x40). Методът е полуколичествен и се базира на интензитета на реакцията и процента на позитивните клетки. Експресията на CK19 е цитоплазмена в епитела на фоликуларните клетки и интензитетът е определен чрез тристепенна скала:

липсва/слаба - 0;

умерена експресия – стойност 1;

интензивна експресия – стойност 2;

Липсата на кафява оцветка на цитоплазмата, както и слабото кафяво оцветяване са отчетени като негативни. Умерената и изразената по интензитет реакция са определени съответно като стойност 1 и стойност 2. Оцветяването на колоида се оцени като фалшиво позитивна реакция. Процентът на позитивните клетки е отчетен като следва:

<5 % - стойност 1;

от 5 до 25 % - стойност 2;

от 25 до 75 % - стойност 3;

>75 % - стойност 4;

Общият скор на CK19 се определи като се умножи стойността на интензитета на експресия по процента позитивни клетки: Интензивност Х Площ = краен резултат на експресия. Туморът или съседната на тумора тъкан и нетуморната тъкан се приеха за позитивни, ако общият скор е повече от 2 **(**Palo S. et al., 2017**)**.

3.2.2.2. Експресия на CD34 и определяне на МВП

CD34 се експресира в цитоплазмата на ендотелни клетки. Приехме за позитивна реакция оцветяването в единични ендотелни клетки и групи ендотелни клетки, стига да са разделени едни от други, независимо от наличието или липсата на лумен. Определихме микроваскуларната плътност (МВП) според метода описан от Jebreel et al. (2007). На малко увеличение (10x4) се определиха зоните с най-много на брой съдове (hot spots). От тях се подбраха три полета с най-висока МВП в които липсват фиброза и лимфоцитарни инфилтрати. МВП е определена във всяка от трите зони на увеличение (10x20). Крайната МВП се определи като средна стойност от трите измервания.

3.2.2.3 Експресия на Bax и определяне на H-score

Bax се експресира в цитоплазмата на фоликуларните епителни клетки. Позитивността на Bax е оценена полуколичествено чрез определяне на **H-score** (histo-score) върху тъканните проби по метода на Gupta A et al. (2016). H-score е определен с цел сравнителен анализ с данните, получени от други автори, използвали този метод. Последният е подходящ за полуколичествена оценка на имунохистохимичната реакция, защото отчита два компонента: интензивност и процент позитивни клетки (площ на експресия). На всеки препарат е определена интензивността на реакцията на клетките. Използвана е четири степенна скала за оценка:

Липсва - 0

Слаба експресия – стойност 1

Умерена експресия – стойност 2

Интензивна експресия – стойност 3

Всяка стойност на експресията е умножена по % клетки от съответната интензивност и H-score е изчислен по следната формула [1x (% клетки с 1+) +2x (% клетки с 2 +) + 3x (% клетки с 3+)], в диапазон от 0 до 300.

3.2.2.4. Експресия на Bcl-2 и определяне на H-score

Bcl-2 се експресира предимно в цитоплазмата на фоликуларните епителни клетки и в единични ядра. Морфометричното изследване е на базата на цитоплазмената експресия. H-score е определен по същия метод, както **Bax (**Gupta A et al., 2016).

3.2.3. Статистически методи

➢ Дисперсионен анализ (ANOVA) за оценка доколко влиянието на даден фактор е статистически значимо или не

➢ Вариационен анализ за изследване на количествените характеристики на показателите

➢ Корелационен анализ за оценка на зависимостта между изследваните показатели. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите от коефициента на Пиърсън (r) и на Спиърман (ρ):

- $0<r\ (\rho) < 0,3$ – слаба корелация
- $0,3<r\ (\rho)<0,5$ – умерена корелация
- $0,5<r\ (\rho)<0,7$ – значителна корелация
- $0,7<r\ (\rho)<0,9$ – висока корелация
- $0,9<r\ (\rho)<1$ – много висока корелация

➢ Сравнителен анализ (оценка на хипотези) – χ^2, t-test Student's за сравняване на количествени и качествени показатели и изследване на разликата между тях

➢ Графичен и табличен метод на изобразяване на получените резултати

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p<0,05$, $p < 0,01$, $p<0,001$ при доверителен интервал 95%.

При обработка на данните е използван статистическия софтуерен пакет – IBM SPSS for Windows, v.20.0.

➢ Диагностична стойност на показател/маркер бе определена чрез следните величини:

- Положителна предиктивна стойност (ППС)/Positive predictive value (PPV)

$$\mathbf{PPV} = \frac{\textbf{Броя на истински позитивните резултати}}{\textbf{Броя на истински позитивните резултати + Броя на фалшиво позитивните резултати}}$$

- Негативна предиктивна стойност (НПС)/Negative predictive value (NPV)

$$\mathbf{NPV} = \frac{\textbf{Броя на истински негативните резултати}}{\textbf{Боря на истински негативните резултати + Броя на фалшиво негативните резултати}}$$

- Чувствителност/Sensitivity (SN)

$$SN = \frac{\textbf{Броя на истински позитивните резултати}}{\textbf{Броя на истински позитивните резултати + Броя на фалшиво негативните резултати}}$$

- Специфичност/Specificity (SP)

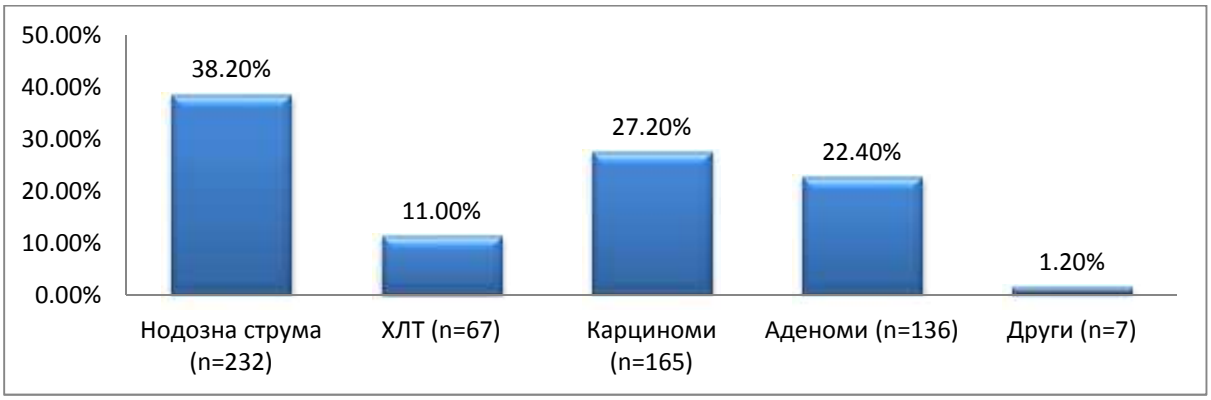
$$SP = \frac{\textbf{Броя на истински негативните резултати}}{\textbf{Броя на истински негативните резултати + Броя на фалшиво позитивните резултати}}$$

- Диагностична точност/Diagnostic accuracy (DA)

$$DA = \frac{\textbf{Броя на истински негативните резултати + Броя на истински позитивните резултати}}{\textbf{Броя на негативните резултати (фалшиви и истински) + Броя на позитивните резултати (фалшиви и истински)}}$$

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Клинико-морфологична характеристика на пациентите, оперирани по повод заболяване на щитовидната жлеза и относителен дял на неопластичните процеси за петгодишен период.



Фигура 1. *Разпределение на пациентите според заболяванията на щитовидната жлеза.*

За период от 5 г. (2013-2017 г.) са изследвани морфологично 607 пациента със заболявания на щитовидната жлеза, оперирани в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, претърпели хеми- или тотална тиреоидектомия. Проучването е ретроспективно - данните са получени от наличната медицинска документация от архива на Клиниката по обща и клинична патология. На фигура 1 е представено разпределението на пациентите според заболявания на щитовидната жлеза за 5 годишния период. На таблица 3 е представена клинико-морфологичната характеристика на пациентите.

Таблица 3. *Клинико-морфологична характеристика на пациентите.*

Показател		**N/%**
Пол	жени	537/88.5 %
	мъже	70/11.5 %
Възраст	mean±SD (range)	48,3 г. ± 13.8 г. (7-79 г.)
	< 20 г.	13/2.1 %
	21 – 30 г.	52/8.6 %
	31 – 40 г.	120/19.8 %
	41 – 50 г.	152/25.0 %
	51 – 60 г.	135/22.2%
	61 – 70 г.	112/18.5 %
	> 71 г.	23/3.8 %
Диагноза	Нодозна струма	232/38.2%
	Огнищен лимфоцитарен тиреоидит	10/1.6%
	Хашимото тиреоидит	57/9.4%
	Папиларен карцином	141/23.2%
	Фоликуларен аденом	112/18.5%
	Фоликуларен карцином	9/1.5%
	Онкоцитарен аденом	24/4.0%
	Онкоцитарен карцином	10/1.6%
	Медуларен карцином	4/0.7%
	Анапластичен карцином	1/0,2 %
	Други*	7/1.1%

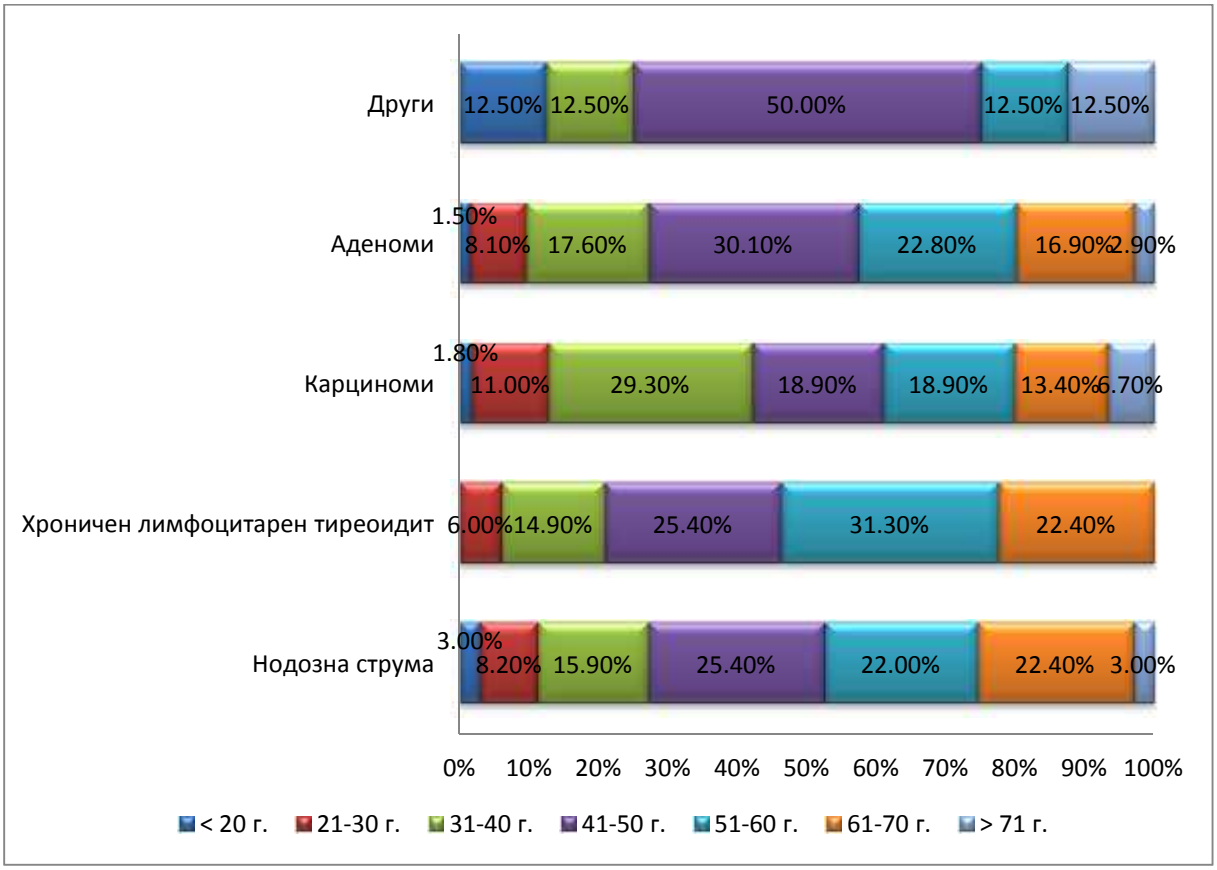
Легенда. *1 първичен В-едроклетъчен лимфом, 1 лимфангиом, 1“Black“ аденома, 3 фоликуларни тумора с неясен малигнен потенциал, 1 грануломатозен тиреоидит

Получените от нас резултати показват, че женският пол (88,50%) е много по-често засегнат в сравнение с мъжкия пол (11,50%). Най-засегнатата възрастова група е между 41-60 г. (47,2%). От неоплазмите най-висока е честотата на папиларния карцином – 141 случая (23,20%). На второ място е фоликулярният аденом на щитовидната жлеза – 112 случая (18,50%).

Съществена разлика в диагнозата според пола не се установи ($p>0,05$), което се дължи според нас на малкия брой пациенти от мъжки пол. Във възрастовата група до 20 г. всички пациенти с тумори са жени – 5 случая.

Относителният дял на карциномите на щитовидната жлеза е 27,0% (165 случая), на аденомите - 22,40% (136 случая) (фиг. 1).

Статистически значима разлика се установи между възрастта на пациентите и вида на тумора (злокачествен или доброкачествен). Щитовидните карциноми са с най-висок относителен дял във възрастовата група 31-40 г. (29,30%), докато аденомите се срещат с по-висока честота във възрастовата група 41-50 г. (30,10%) ($\chi^2=44,02$; $p=0,008$) (фиг. 2).

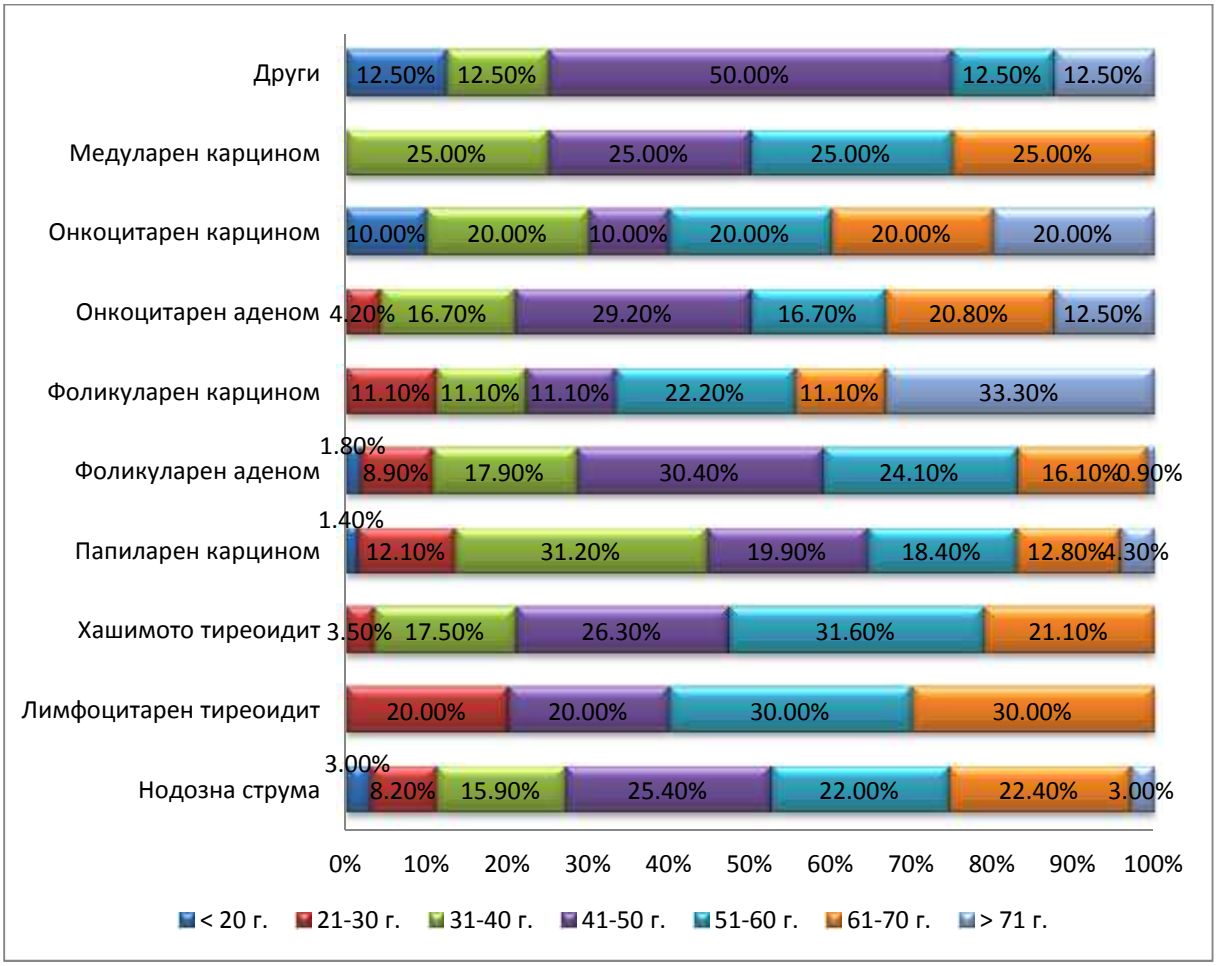


Фигура 2. *Сравнителен анализ на диагнозата според възрастовата група*

На фигура 3 е представен сравнителният анализ на пациентите според хистологичната диагноза и възрастовата група. Получените от нас резултати показват съществена разлика между пациентите с диагноза карцином и тези с аденом ($\chi^2=90,57$; $p=0,001$). Най-често срещаният карцином в нашата извадка е папиларният карцином,

чиято най-висока честота е във възрастовата група 31-40 г., 51 случая (31,20%). От аденомите най-висока е честотата на фоликуларния аденом, като най-висок е относителният дял на пациентите във възрастовата група 41-50 г., 41 случая (30,40%) (фиг. 3).

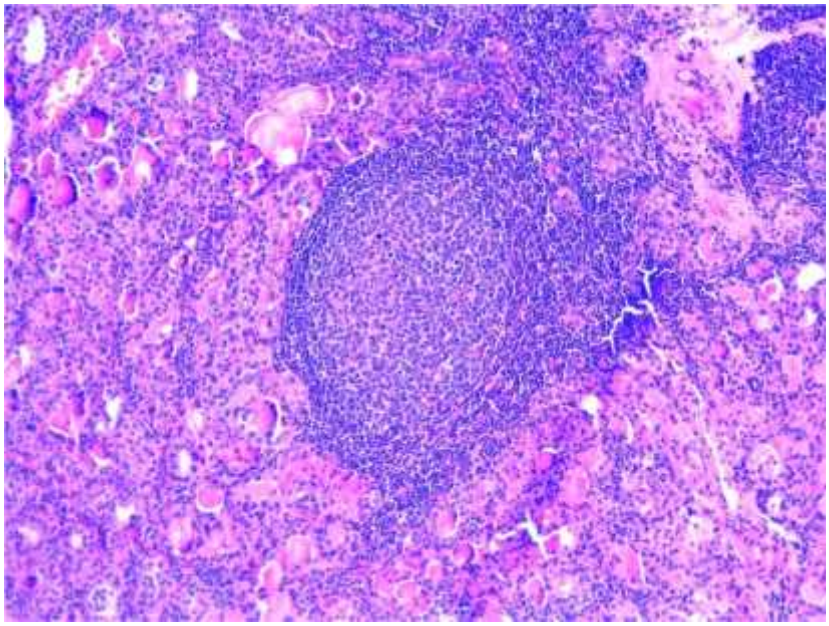
При изследване на риска за карцином в щитовидната жлеза при пациенти с ХЛТ се установи, че огнищният лимфоцитарен тиреоидит се асоциира с висок риск за карцином (RR=2.875 (1.822-4.538); p<0.001), и за аденом на щитовидната жлеза (RR=1.691 (1.041-2.749; p<0.05). От друга страна тиреоидитът на Хашимото е рисков фактор само за тиреоиден карцином (RR=1.628 (1.172-2.261; p<0.01). В сравнение с нодозната струма, ХЛТ носи по-висок риск за развитие на карциноми (RR=2.107 (1.631-2.722); p<0.001). Между ХЛТ и риска от развитието на карцином се установи умерена зависимост (r=0.319; p<0.001). Пациентите с карцином в 10,17 % от случаите са имали като фон ХЛТ на щитовидната жлеза.



Фигура 3. *Сравнение на пациентите по възраст и хистологичен вид на тумора*

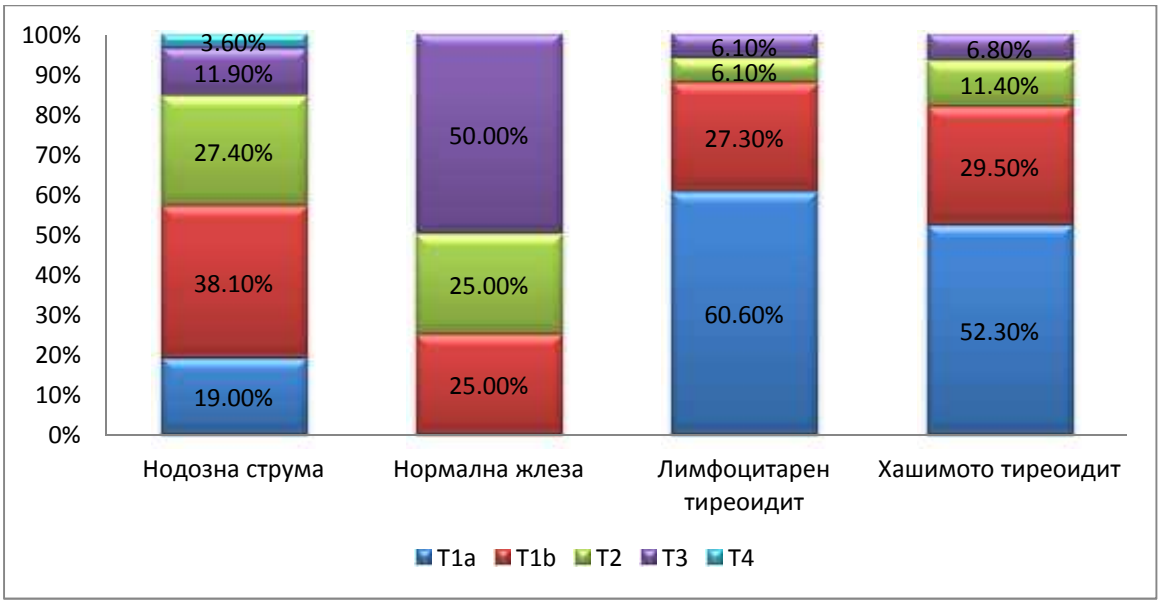
В настоящото изследване към хроничен лимфоцитарен тиреоидит, са включени пациенти с хистологични критерии за ТХ, както и пациенти с ЛТ (Фигура 4). При повечето пациенти липсва информация за антитиреоидни антитела и диагнозата е поставена на базата на морфологични критерии. От 165 карцинома, 77 (46,67%) са на фона на ХЛТ, от които 72 (93,50%) са папиларни карциноми, 2 (2,60%) са медуларни карциноми и 3 (3,90%) са фоликуларни карциноми. При нито един от пациентите с

онкоцитарни карциноми (n=10) в настоящото проучване не е описан лимфоцитарен тиреоидит.



Фигура 4. Тиреоидит на Хашимото – централно се вижда лимфен фоликул с герминативен център, периферно разположени онкоцити, H&E, x100.

При анализа на размера на карциномите се установи умерена зависимост между Т-стадия и вида на фоновото заболяване (r=0.346; p<0,001). При пациентите с ХЛТ преобладават предимно микрокарциномите (Т1а) (фиг. 5). При изследване на ХЛТ като фон при карциномите, се установи, че в 55,80% от случаите размерът на тумора е под 1 см. (Т1а), докато при пациентите с нодозна струма в 65,50% от случаите размерът на тумора е над 1 см и варира между 1,1 и 4 см (Т1b-Т2).



Фигура 5. *Разпределение на пациентите с карцином на щитовидната жлеза според фоновото заболяване и размер на тумора (Т).*

При 42 пациенти с карцином на щитовидната жлеза са налице данни за нодалния статус. Ние установихме, че рискът за поява на метастази в РЛВ на фона на нодозна струма е значително по-висок в сравнение с риска при пациентите с хроничен лимфоцитарен тиреоидит (съответно 70,0% и 18,20%) (RR=3,85 (1.516-9.775; p<0.001). Освен съществената разлика в метастазирането в РЛВ (χ^2=11,48; p<0,001) според фоновото заболяване, установихме и силна зависимост между двата фактора (метастазиране и фоново заболяване) (r=0.655; p<0,001).

Зависимост между фоновото заболяване и броя на туморните огнища не се установи.

В нашето изследване пациентите със злокачествени тумори на фона на ХЛТ се характеризират с по-малък размер и обикновено са без метастази в шийни лимфни възли, което до известна степен говори за протективна роля на ХЛТ. От друга страна се установи, че ХЛТ е рисков фактор за поява на тиреоиден карцином. Обяснението може да се получи след детайлно изследване характера на клетъчния инфилтрат, дали той е инициран от тумора, т.е. проява на антитуморна защита, или клетките продуцират цитокини и други медиатори с проонкогенно действие.

Фигура 6. *Стадиране на карциномите*

На фиг. 6 е представено процентното разпределение на карциномите според стадия на заболяването. Съществена разлика е установена между стадия на заболяването при различните карциноми (χ^2=213,14; p<0,001). Между вида на карцинома и туморния стадий съществува умерена зависимост (r=0.393; p<0,001). Пациентите с папиларни, фоликуларни и онкоцитарни карциноми са предимно в първи стадий на заболяването.

Ние, както и В Uhliarova et al. (Uhliarova et al., 2017 г), установихме преобладаване на женския пол сред пациените с тиреоидни заболявания. Средната възраст на жените със заболяване на щитовидната жлеза в тяхното изследване е 46,5±19.7, а на мъжете 46.4±20.9. Относителният дял на злокачествени заболявания в

тяхното проучване е 23% от всички заболявания, а пациенитите с малигнени тумори са значително по-млади, отколкото пациентите с доброкачествени заболявания. При B Uhliarova, както и при нас, най-често срещаният карцином е папиларният. Girardi FM et al. (2017) изследват карциноми на щитовидната жлеза и съобшават, че 79,6% от пациентите при тях са жени. Отношението мъже:жени е 1:3.9. Средната възраст на лицата със злокачествени тумори е 48.14 години. Пикът на карциномите е във възрастовата група от 51 до 60 години. Папиларният карцином е най-честият тумор, с пик между 31 и 50 години.

Ние, подобно на други автори търсим зависимост между вида на туморите на щитовидната жлеза от една страна и хроничния лимфоцитарен тиреоидит от друга. B Uhliarova et al. (Uhliarova et al., 2017) установяват, че тиреоидитът на Хашимото се асоциира по-често с карциноми, отколкото с бенигнени тумори. Zhang Yi et al., 2014, откриват, че заболеваемостта от малигнени тумори на щитовидната жлеза е по-висока при пациенти с хроничен лимфоцитарен тиреоидит, отколкото при пациенти без това заболяване. Друго изследване показва асоциация на тиреоидита на Хашимото конкретно с папиларен карцином на щитовидната жлеза (Resende de Paiva C et al., 2017).

На таблица 4 са представени други подобни проучвания от последните 10 години (Matesa-Anic D et al., 2009; Gul K et al., 2010; Mazokopakis EE et al., 2010; Konturek A et al., 2013; Paparodis R et al., 2014; Zayed AA et al., 2015; Zhang Y et al., 2014).

Смята се, че лимфоидният инфилтрат секретира хемокини, растежни фактори и цитокини, които увреждат фоликуларния епител с последващо развитие на фиброза и атрофия (Kumar V et al., 2013). Някои автори считат, че това води до ДНК увреда, чрез формиране на кислородни радикали, като резултатът са мутации, които водат до развитие на карцином (Pacifico F et al., 2010, Ahn D et al, 2011; Azizi G et al., 2014).

Патогенетичната връзка между хроничните възпалителни процеси и малигнените тумори е известна отдавна. Тя е доказана при IBD (болест на Крон и язвен колит) и аденокарцином на дебело черво, при хроничния вирусен хепатит тип B и тип C и хепатоцелуларния карцином, при инфекцията с Helicobacter pylori и стомашния карцином, при хроничната обструктивна белодробна болест и белодробния карцином (Guarino V et al., 2010). При тиреоидит на Хашимото могат да се открият ядрени промени, подобни на тези при папиларен карцином, както и RET/PTC пренареждания (Colotta F et al., 2009), което показват общи молекулярни патогенетични механизми при двете заболявания.

Лимфоцитите мигрират около туморите с цел да ограничат разрастването им (Fridman WH et al., 2011). Лимфоцитарният инфилтрат около и в туморната строма е имунологична реакция, индуцирана от антигени, произведени от тумора, т.нар. тумор инфилтриращи лимфоцити (TILs). Тази имунологична реакция е слабо представена при настоящото проучване и не е обект на изследване.

Таблица 4. *Проучвания върху честотата на тиреоиден карцином при пациенти с тиреоидит на Хашимото от последните 10 години.*

Държава	**Брой пациенти**	**Карциноми (Лимфоми)**	**ТК(n)**	**ТХ(n)**	**ТК+ТХ Възраст (медиана)**	**%ТК при пациенти с ТХ**	**RR**
Полша (2013)	7545	Папиларни	636	452	53.5	23.45% (106/452)	3.14
Хърватия (2009)	10508	Папиларни	269	2156	50	1.95% (42/2156)	0.72
Турция (2010)	613	Папиларни Фоликуларни Медуларни Лимфоми	171 11 5 1	92	43	43.48% 1.09% 0 % 1.09%	1.729 0.566 0.510 16.839
Гърция (2010)	140	Папиларни	32	42	49.3	28.57% (12/42)	1.400
Китай (2014)	647	Папиларни Фоликуларни Медуларни Анапластичен Лимфом	134 2 4 3 1	108	43.3	37.96%(41/108) 0% 1.85%(2/108) 0% 0.93%(1/108)	2.20 0.99 4.99 0.71 14.86
САЩ (2014)	2718	Папиларни Фоликуларни	807 56	567	-	42.68%(242/567) 1.76%(10/567)	1.63 0.83
Йордания (2015)	863	Медуларни Папиларни Фоликуларни	15 137 27	78	51.3	20%(3/15) 5.84%(8/137) 0(0/27)	2.04 0.60 0.18
Собствено проучване (2017)	607	Папиларни Фоликуларни Онкоцитарни Медуларни Анапластичен	141 9 10 4 1	117	-	34%(40/117) 1.7% (2/117) 0 1.7%(2/117) 0	1.55 1.21 0 1.21 0

Легенда: ТК – тиреоиден карцином, ТХ – тиреоидит на Хашимото.

Лимфоцитарни инфилтрати се описват често около туморите на щитовидната жлеза (French et al. 2010). DG Villagelin et al. изследват 157 пациента и степенуват лимфоцитарния инфилтрат в три степени: дифузен, перитуморен (само в и около тумора) и липсващ. След период на проследяване средно около 8 години, те установяват значително висок брой рецидиви при пациентите, при които липсват лимфоцити в сравнение с групата пациенти, при които има перитуморни лимфоцити

или инфилтрацията в жлезата е дифузна. Според авторите, вероятно присъствието на лимфоцити в туморната микросреда има отношение към по-добрата прогноза (Villagelin et al. 2011). От друга страна, J French et al. (2010) изследват 100 пациента с папиларни карциноми и ги разделят в две групи: първата група с фоново заболяване тиреоидит и втората група с тумор инфилтриращи лимфоцити (TILs). Пациентите с TILs са в по-напреднал стадий на заболяването, имат по-изразена инвазия и метастази в лимфни възли, в сравнение с пациентите без лимфоцитарни инфилтрати или тези с фоново заболяване – хроничен лимфоцитарен тиреоидит.

Данните от литературата показват, че липсва яснота по отношение на ролята на TILs и възпалителния инфилтрат при хроничния лимфоцитарен тиреоидит при тиреоидния карцином. През 2014 г. изследването на Imam S et al. допринася за изясняване на проблема. Авторите откриват, че лимфоцитите при тиреоидит на Хашимото се различават от TILs. TILs „служат“ на тумора, т.е. има толеранс между тях и тиреоидния карцином, докато лимфоцитите при автоимунните тиреоидити атакуват туморните клетки и тяхната активност може да бъде стимулирана. На базата на тези изследвания се стига до извода, че с помощта на имунотерапия и засилване на автоимунитета, туморните клетки могат да бъдат елиминирани (Mellman et al., 2011; Imam et al., 2014). Оказва се, че при автоимунните нарушения, освен тъканно увреждане, настъпва и деструкция на туморните клетки, което е от съществено значение при създаване на нови терапевтични агенти.

Ние, подобно на други автори установихме, че при ХЛТ, карциномите са по-малко агресивни, с по-малък размер, по-рядко има ангажиране на лимфни възли в сравнение с тези при които той липсва (Gul K et al., 2010, Ahn D et al, 2011; Girardi F et al., 2015). Според други автори няма същетвена разлика в размера на тумора, възрастта, присъствието на лимфни метастази и стадия при пациенти с тиреоиден карцином при пациенти с или без хроничен лимфоцитарен тиреоидити (Zhang Yi et al., 2014).

При настоящото изследване не открихме зависимост между фоновото заболяване и броя на туморните огнища. Други автори намират връзка между двата фактора: лимфоцитарен тиреоидит и мултифокалност на тиреоидния карцином (Zhu F et al., 2016).

В заключение, при настоящото изследване относителният дял на пациентите с туморни заболявания е 49.60% от общия брой пациенти с хемитиреоидектомия и радикална тиреоидектомия. Женският пол преобладава при всички групи заболявания. Карциномите се срещат по-често при млади жени на възраст между 31 и 40 години, докато аденомите са предимно във възрастта между 41 и 50 години. Доброкачествените и злокачествени тумори често са асоциирани с ХЛТ. Тиреоидитът на Хашимото е рисков фактор само за карцином на щитовидната жлеза. Т-стадият на карциномите показва зависимост от фоновото заболяване. При ХЛТ повечето тумори са в T1a стадий, докато при пациентите без ХЛТ болшинството от туморите са над 1 см и са в T1b или T2 стадий. N-стадият също показва зависимост от фоновото заболяване. При наличие на ХЛТ липсват метастази в РЛВ, а при пациенти без ХЛТ, обикновено има метастази в РЛВ. Възможно е това да се дължи на протективната роля на лимфоцитарните инфилтрати в паренхима на жлезата при тези заболявания.

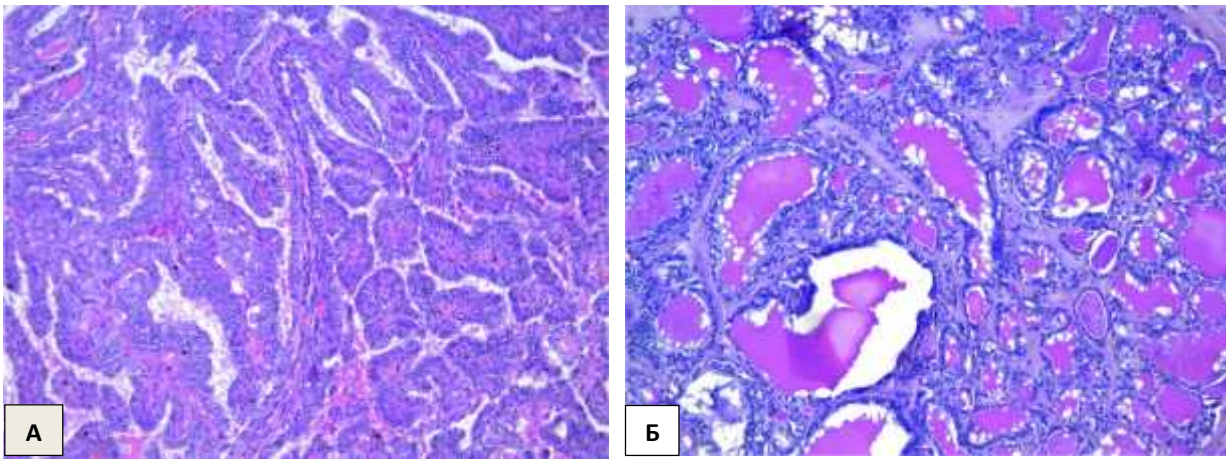
4.2. Морфологична характеристика на доброкачествените и злокачествените тумори на щитовидната жлеза.

Осъществен е ретроспективен анализ на 122 пациента, оперирани в УМБАЛ „Св.Марина“ по повод неоплазми на щитовидната жлеза, като резултатите са представени на табл. 5. Данните от хистологичните резултати са от архива на Клиниката по обща и клинична патология.

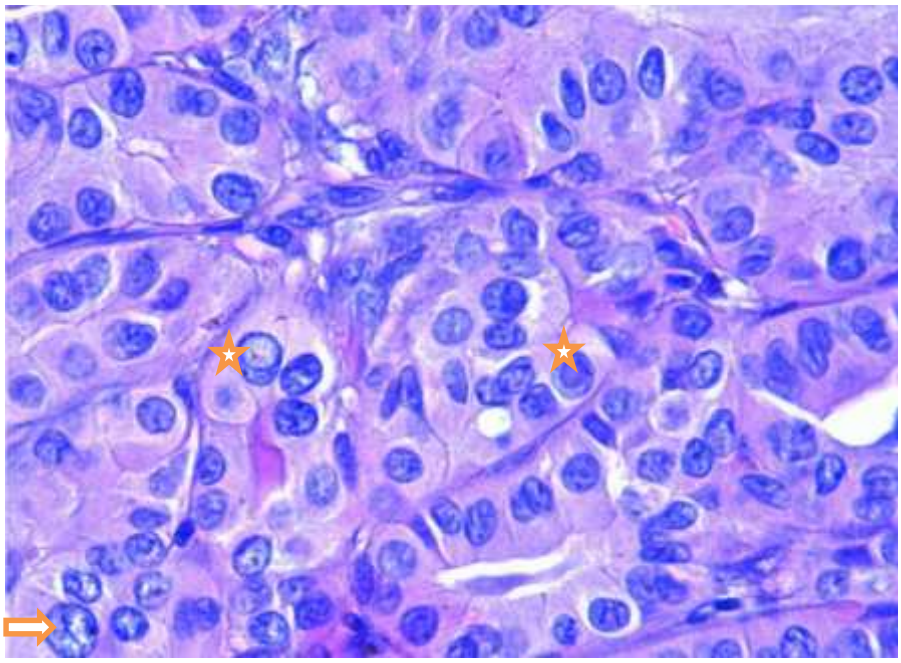
Таблица 5. *Клинико-морфологична характеристика на пациентите, оперирани за тиреоидни неоплазми*

Показател		**Карциноми (n=69)**	**Аденоми (n=53)**
Пол	мъже	7/ 10,10 %	11/ 20,80 %
	жени	62/ 89,90 %	42/ 79,20 %
Възраст	mean±SD (range)	45,9 г. ± 14,5 г. (17-75 г.)	49,3 г. ± 13,3 г. (16-72 г.)
Фон	Нодозна струма	29/ 42,00 %	39/ 73,60 %
	Нормална жлеза	4/ 5,80 %	3/ 5,70 %
	Огнищен лимфоцитарен тиреоидит	11/ 15,90 %	5/ 9,40 %
	Тиреоидит на Хашимото	25/ 36,20 %	6/ 11,30 %
Диагноза	Папиларен карцином	57/82,60 %	-
	Фоликуларен карцином	4/5,80 %	-
	Онкоцитарен карцином	5/7,20 %	-
	Медуларен карцином	3/4,30 %	-
	Фоликуларен аденом	-	45/84,90 %
	Онкоцитарен аденом	-	8/15,10 %
Размер	mean±SD (range)	1,34 см. ± 0,99 см. (0,10 – 5,00 см.)	1,80 см. ± 1,03 см. (0,30 – 4,50 см.)
Локализация	Десен дял	27/ 39,10 %	25/ 47,20 %
	Ляв дял	27/ 39,10 %	27/ 50,90 %
	Ангажиране на двата дяла	11/ 15,90 %	-
	Истмус	4/ 5,90 %	1/ 1,90 %

На фигурите: 7 (А и Б), 8, 9 (А и Б), 10 (А и Б) са представени, някои от характерните морфологични характеристики на изследваните тумори. На фигура 8 са показани характерните нуклеарни черти на папиларните карциноми.



Фигура 7. *А - Класически папиларен карцином, H&E,увеличение x100;*
Б - Фоликуларен вариант на папиларен карцином, H&E,увеличение x40.



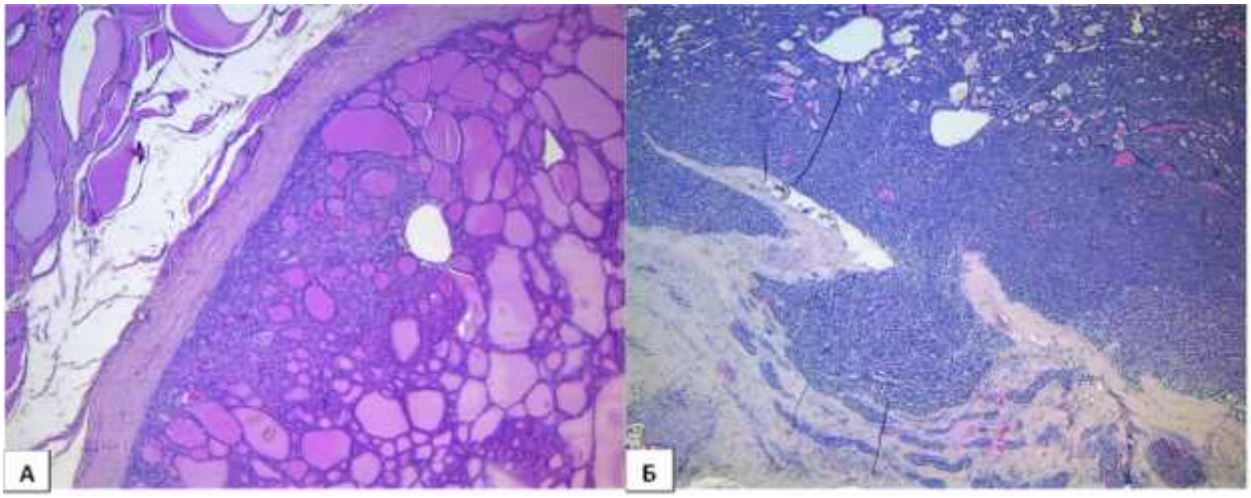
Фигура 8. Ядрени бразди (стрелка) и псевдовключвания (звезда) при папиларен карцином, H&E, x400.

Основните критерии за разграничаване на фоликуларните и онкоцитарните карциноми от съответните аденоми се основава на капсулната или васкуларна инвазия според критериите на СЗО от 2017 година. На фигура 9Б и 10Б са представени двата вида инвазия.

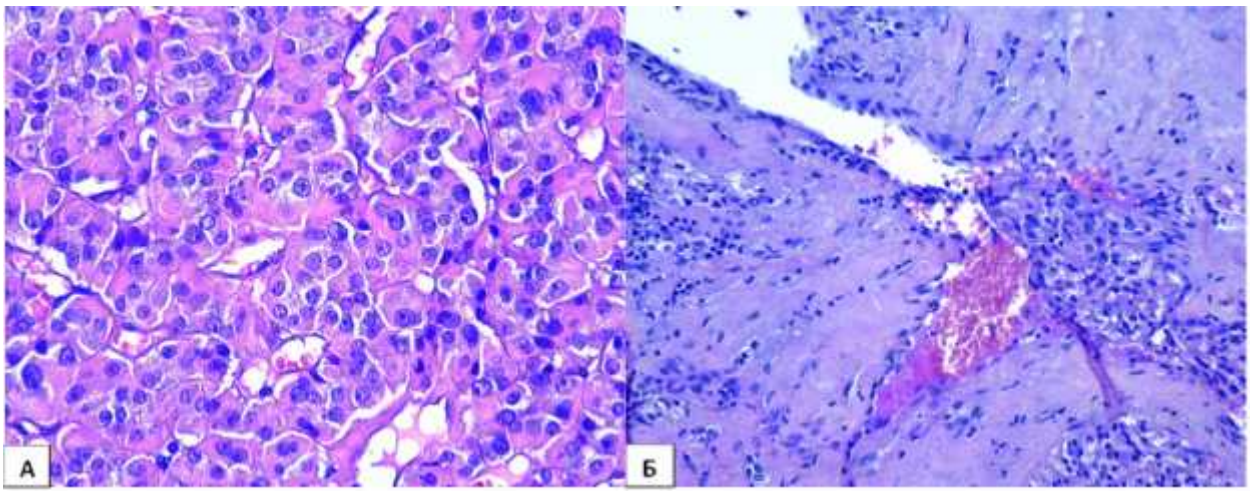
Анализът на резултатите на пациентите от втората група относно пола във връзка с риска от развитие на тумор показа статистически значима разлика (χ^2=2,68;

p<0,05). Женският пол е рисков фактор за развитие на тиреоиден карцином (OR=2,32 (0,832-6,468)).

Средната възраст на пациентите с тиреоидни карциноми във втората група е по-малка от средната възраст на пациентите с аденоми, тенденция установена и при неселектираните пациенти.



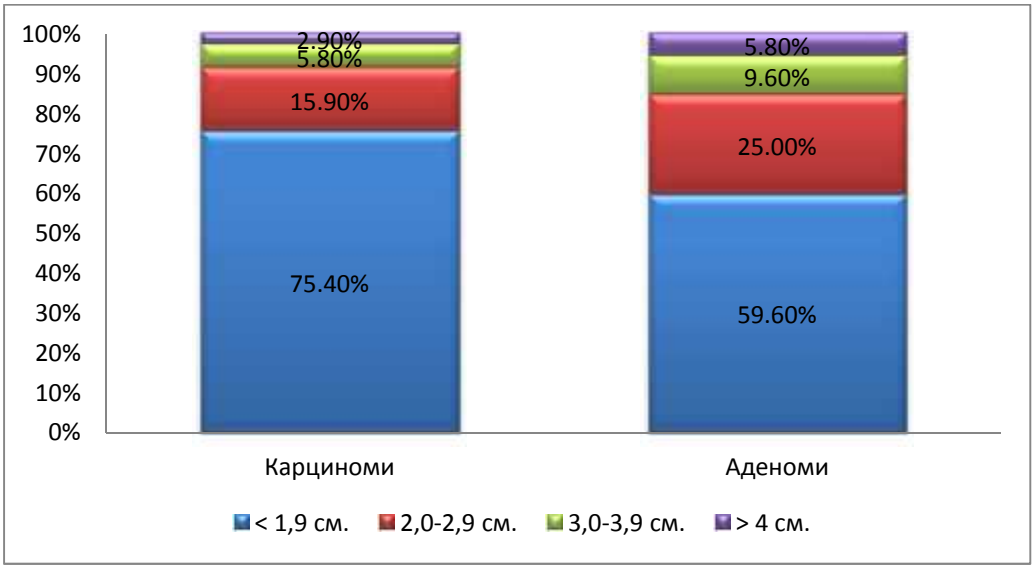
Фигура 9. *А – Фоликуларен аденом, с интактна капсула, H&E,увеличение x40;*
Б - Фоликуларен карцином, с капсулна инвазия H&E,увеличение x40.



Фигура 10. *А – Онкоцитарен аденом, с туморни клетки с обилна еозинофилна цитоплазма, H&E,увеличение x400;*
Б - Онкоцитарен карцином, с ангиоинвазия, H&E,увеличение x200.

По отношение на фоновото заболяване в селектираната група се откри статистически значима разлика между карциномите и аденомите (χ^2=13,65; p=0,003). 52,10% от карциномите са на фона на хроничен лимфоцитарен тиреоидит (Огнищен лимфоцитарен тиреоидит или тиреоидит на Хашимото), докато 73,60% от аденомите са на фона на нодозна струма. При пациентите от неселектираната група ЛТ се асоциира,

както с доброкачествените, така и със злокачествените тиреоидни неоплазми, докато ТХ е рисков фактор само за карциномите.



Фигура 11. *Разпределение според размера на тумора.*

Установихме сигнификантна разлика в размера на неоплазмите (p=0,014), като аденомите се характеризират с по-голям размер. Около три/четвърти (75,40%) от карциномите са с размер до 2,0 см., докато 40,40% от аденомите са с размер над 2,0 см. (фиг. 11). В нашето проучване рискът за карцином е по-голям при пациенти с неоплазми до 2 см. (OR=2.07 (0.951-4.515); p<0.05). Открихме и съществена разлика в размера на карциномите в зависимост от хистологичния вид. Папиларните карциноми и медуларните карциноми се характеризират с размер под 2 см. (съответно 84,20% и 66,70%), докато всички онкоцитарни карцином са над 2 см в диаметър (p=0,003).

Не установихме съществена разлика по отношение на локализацията на аденомите и карциномите в ляв и десен дял на щитовидната жлеза.

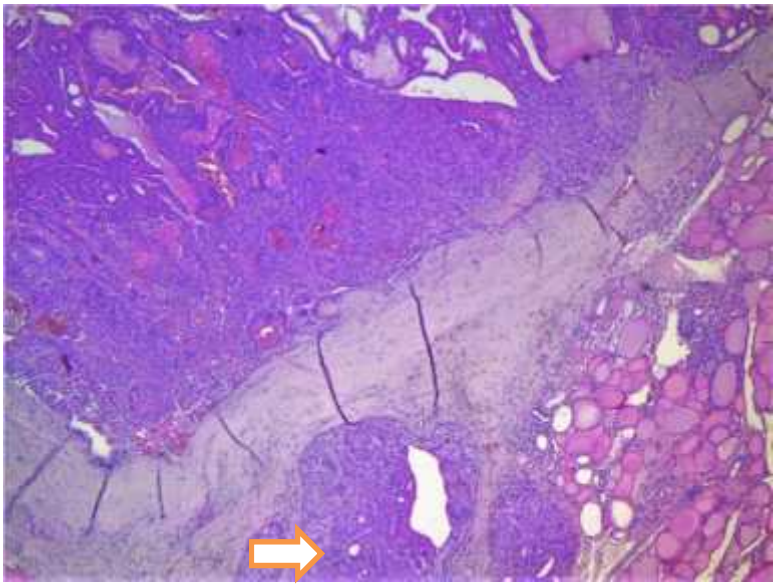
На таблица 6 е представена морфологичната характеристика на изследваните от нас тумори. Сравнителният анализ се базира на следните показатели: съединително-тъканна капсула, фиброза в стромата на тумора, туморна некроза, колоид, калцификати и кръвоизливи. Използвана е двустепенна скала на оценка: присъствие или не на изследвания морфологичен критерий.

Всички изследвани от нас аденоми са изцяло капсулирани, според критериите на СЗО от 2017 г., докато значителна част от карциномите са с неясни граници и инфилтративен растеж. Само 17 (24,60%) карцинома са частично/изцяло капсулирани, като 47,10% от тях са папиларни карциноми. На фигура 12 е представен капсулиран папиларен карцином с инвазия през капсулата.

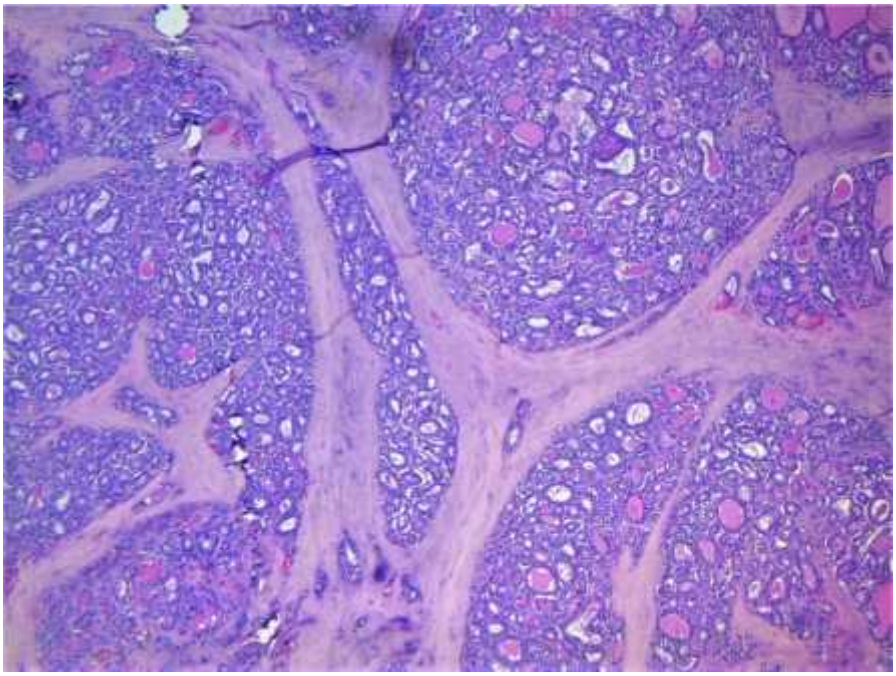
Статистически значима разлика се установи по отношение на фиброзата в стромата на тиреоидните карциноми и аденоми (p<0,001). При карциномите превалира относителният дял на фиброзните промени в тумора (59,40%). Има умерена зависимост между присъствието на фиброзна тъкан в стромата и вида на тумора (r=0.408; p<0.001). Карциномите имат по-висок риск за развитие на фиброза (OR=3,09 (1,718-5,553); p<0.001).

Таблица 6. *Морфологична характеристика на доброкачествените и злокачествени тумори.*

Показател		**Карциноми**	**Аденоми**	χ^2	**p**
Капсула	няма	52/75,40 %	-	69,61	< 0,001
	има	17/24,60 %	53/ 100 %		
Фиброза	няма	28/ 40,60 %	43/ 81,10 %	20,26	< 0,001
	има	41/ 59,40 %	10/ 18,90 %		
Некроза	няма	68/ 98,60 %	53/ 100 %	0,77	0,566
	има	1/1,40 %	-		
Колоид	няма	55/ 79,70 %	3/ 5,70 %	65,91	< 0,001
	има	14/ 20,30 %	50/ 94,30 %		
Калцификати	липсват	36/ 52,20 %	42/ 79,20 %	31,16	< 0,001
	периферни	4/ 5,80 %	11/ 20,80 %		
	централни	29/ 42,00 %	-		
Кръвоизливи	липсват	64/ 92,80 %	45/ 84,90 %	4,09	0,129
	има без ТАБ	4/ 5,80 %	3/ 5,70 %		
	с ТАБ	1/ 1,40 %	5/ 9,40 %		



Фигура 12*. Капсулиран папиларен карцином с капсулна инвазия (стрелки), H&E, увеличение x40.*



***Фигура 13**. Фоликуларен вариант на папиларен карцином с фиброза в стромата на тумора, H&E, увеличение x40.*

На таблица 7 е представена диагностичната точност на показателя фиброза в туморната строма при разграничаване на карциномите от аденомите. Липсата на фиброза разграничава доброкачествените тумори в 81% от случаите, като диагностичната точност на метода е 69%. На фигура 13 сме представили фиброза в стромата на папиларен карцином.

***Таблица 7**. Разграничаване на карциноми от аденоми чрез оценка на фиброза в тумора (положителна предиктивна стойност (ППС), негативна предиктивна стойност (ОПС), чувствителност (Ч), специфичност (Сп), диагностична точност (ДТ)).*

Показател	**Ч%**	**Сп%**	**ППС%**	**НПС%**	**ДТ%**
Фиброза	59%	81%	80%	60%	69%

Статистически силна зависимост се установи между фиброзата в туморната тъкан и метастазите в РЛВ при пациентите с тиреоиден карцином ($r=0.595$; $p<0.001$). В 35,4% от случаите при пациенти с метастази в РЛВ се наблюдава фиброза в стромата на тумора. Подобна фиброза е описана при различни малигнени тумори, като се смята, че има ефект върху биологичното им поведение.

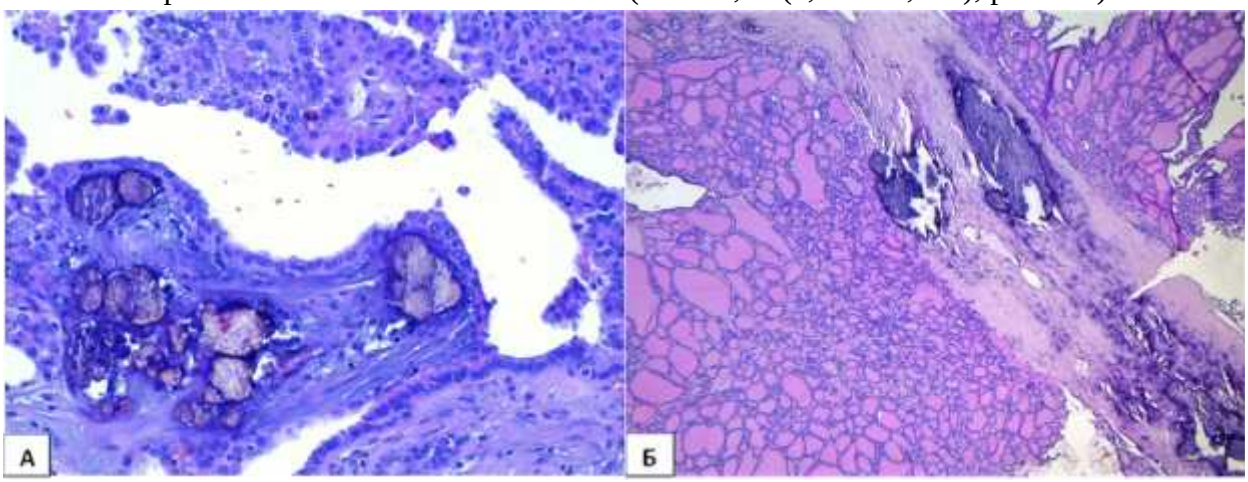
Некроза не се откри при изследваните доброкачествени и злокачествени тумори на щитовидната жлеза.

Статистически силна корелационна зависимост се установи между съдържанието на колоид в туморната тъкан и вида на тумора (r=0.735; p<0.001). Наличието на колоид е характерно за бенигнените тумори.

Кръвоизливите са рядка находка при изследваните пациенти с тумори на щитовидната жлеза. При наличие на кръвоизливи трябва да се изключи предхождаща ТАБ. При част от пациентите с хеморагии се установиха данни за предварително цитологично изследване на щитовидната жлеза.

Съществена разлика се установи между локализацията на калцификати и вида на тумора: доброкачествен или злокачествен (p<0,001). При карциномите преобладават централните калцификати в тумора (42,0%), докато при аденомите калцификатите са предимно с периферна локализация, т.е. в капсулата. На фигура 14 (А,В) са показани централни калцификати в тумора и периферни калцификати.

Умерена зависимост е установена между разположението на калцификатите и вида на тумора (r=0.405; p<0.001). Корелацията между централно разположените калцификати в карциномите и наличието на метастази в регионалните лимфни възли (РЛВ) е силна (r=0.506; p<0.001). Присъствието на централни калцификати в тумора носи висок риск за поява на метастази в РЛВ (OR=10,50 (1,856-59,401); p<0.001).



Фигура 14. А -централни калцификати в туморната строма, папиларен карцином, H&E, увеличение x100; Б – периферни калцификати в капсулата, фоликуларен аденом, H&E, увеличение x40.

Таблица 8. *Разграничаване на карциноми от аденоми чрез характеристика на калцификатите (положителна предиктивна стойност (ППС), негативна предиктивна стойност (ОПС), чувствителност (Ч), специфичност (Сп), диагностична точност (ДТ)).*

Вид на калцификатите	**Ч%**	**Сп%**	**ППС%**	**НПС%**	**ДТ%**
Централни	42%	100%	100%	57%	67%
Периферни	20%	94%	73%	60%	62%

На таблица 8 е представена диагностината точност на показателя калцификати в тумора за разграничаване на малигнените от бенигнени тумори.

На таблица 9 е представена диагностичната точност едновременно на двата показателя: фиброза и калцификати за разграничаване на малигнените от бенигнени тумори.

***Таблица 9**. Разграничаване на тиреоидните карциноми от аденомите на базата на фиброзата и калцификатите в тумора (положителна предиктивна стойност (ППС), негативна предиктивна стойност (ОПС), чувствителност (Ч), специфичност (Сп), диагностична точност (ДТ)).*

Показател	**Ч%**	**Сп%**	**ППС%**	**ОПС%**	**ДТ%**
Фиброза и калцификати	55%	90%	86%	64%	72%

Получените от нас резултати показват, че аденомите имат по-голям размер в сравнение с карциномите. Средният размер на аденомите в нашето изследване е 1,80±1,03 см, докато при карциномите е 1,34±0,99 см. Подобни резултати са получени и от други автори (Zhu et al., 2016), които устновяват, че размерът на бенигнените лезии е по-голям, от този на малигнените, като в групата на бенигнените лезии са включени и хиперпластични разраствания. Ние, подобно на тези автори установихме, че бенигнените неоплазми имат добре оформена капсула, докато при малигнените тумори тя е непълна или липсваща. G Godazandeh et al. намират, че средният размер на бенигнените лезии е 3.38±1.86 см., а на малигнените е 2.91±1.29 см. (p=0.15). Според някои ехографски проучвания нодули с размер над 4 см. обикновено са карциноми (McCoy KL et al., 2007). Подобни резултати са установени и при други изследвания (Rausei et al., 2011, McHenry CR et al., 2008).

Средната възраст на пациентите с карциноми в настоящото проучване е по-малка в сравнение с тази на пациентие с аденоми. Подобни резултати са получени и при други изследвания (Godazandeh G et al., 2016), които изследват пациенти оперирани по повод на тиреоиден възел и установяват, че средната възраст на пациентите с малигнена неоплазма е по-малка (34.93±11.86) от средната възраст на пациентите с доброкачествен нодул (42.37±12.26) и тази разлика е статистически значима (p=0.002). Не при всички изследвания се открива подобна зависимост. Според SN Pinchot et al. (2009), карциномите преобладават при по-възрастни пациенти, докато спред Rosario et al. (2014), няма значима разлика между възрастта на пациентите с доброкачествени и злокачествен лезии на щитовидната жлеза.

Много проучвания върху туморите на щитовидната жлеза съобщават за преобладаващо засягане на на женския пол (Zhang Y et al., 2014; Zhu F et al., 2016;

Uhliarova B et al., 2017). Възможно обяснение е различното действие на мъжките и женски полови хормони върху всички органи и системи, в това число и върху щитовидната жлеза. При женския пол нивата на щитовидните и полови хормони се променят по време на менструалния цикъл и бременност, и тези промени се посочват като една от причините за преобладаващото засягане на жените от папиларен карцином (Rahbari R et al., 2010). Според други проучвания има връзка между папиларния карцином и репродуктивни фактори, като възраст при менархе, менопауза, брой бременности. Negri et al. съобщават, че съществува връзка между тези фактори и риска от тиреоиден карцином (Negri et al., 1999). В Япония, в едно мащабно проучване, проследяват 37 986 жени на възраст между 40-79 години, и установяват, че 86 жени развиват карцином на щитовидната жлеза, като в 70% от случаите се касае за папиларен карцином. Изследователите не откриват зависимост между пациентите с карцином на щитовидната жлеза и фактори като тютюнопушене, БМИ (BMI-body mass index) и диабет. Липсва зависимост между репродуктивни фактори и развитието на карцином (Pham TM et al, 2009). В едно проучване в САЩ върху карцином на щитовидната жлеза, се установява по-висок риск от малигнен процес при менархе под 12 годишна възраст, отколкото менархе след тази възраст. Същите автори коментират протективната роля на оралните контрацептиви (Sakoda LC et al., 2002).

Отдавна е известна връзката между половите хормони и мамарния и простатен карцином (Rahbari R et al., 2010). Експресия на естрогенни рецептори е установена в ядрата на клетките на папиларен тиреоиден карцином. Естрогените стимулират пролиферацията на клетъчни линии от папиларен карцином, за разлика от мъжките полови хормони, които не стимулират растежа (Lee LM et al., 2005). Ефектът на естрогените е различен в зависимост от хистологичния вариант на карцинома на щитовидната жлеза. Установено е, че естрогените стимулират растежа на клетъчните култури от папиларен карцином, но инхибират растежа на тези от анапаластичен карцином (Zeng Q et al., 2008). Някои автори смятат, че естрогенът се асоциира с повишена адхезия, инвазия и миграция на клетъчните линии от тиреоиден карцином. Добавянето на антагонисти на естрогена има противоположен ефект, което означава, че определянето на естрогенови рецептори може да се окаже полезно за терапията на карциномите (Rajoria et al., 2010).

При бременност, човешкият гонадотропен хормон стимулира растежа както на доброкачествените, така и на злокачествените тумори на щитовидната жлеза. G Vannucchi et al. проследяват 123 бременни пациентки с диференцирни тиреоидни карциноми през различни интервали по време на бременността им. Те установяват, че туморите открити по време на бременност, обикновено персистират или рецидивират. В 87.5% от случаите карциномите, открити по време на бременност са позитивни за естрогенови рецептори (Vannucchi G et al., 2010). Според други автори обяснението за преобладаване на женския пол е по-различно – като цяло жените страдат по-често от заболявания на щитовидната жлеза, по-често се изследват и проследяват и за това при тях по-често се откриват тумори (Bertakis KD et al., 2009).

Калцификатите в щитовидните тумори са важен морфологичен белег. Въпреки че се откриват при бенигнени и при малигнени тумори на щитовидната жлеза, много проучвания показват връзката на калциевите отлагания с карциномите (Wang et al.,

2006; Triggiani V et al., 2008). Малко е известно за механизмите, чрез които се отлага калций в туморната тъкан на щитовидната жлеза. Преди се е считало, че псамомните телца при папиларен карцином са резултат от некроза на интраваскуларни или интралимфатични туморни тромби с последващо дегенеративно отлагане на калций (Johannessen JV et al., 1980). Според други теории става въпрос за калциеви депозити във витални клетки. Възприето е, че псамомните телца са резултат от дегенеративно вкалцяване на туморни клетки, лимфни съдове или строма (Lloyd RV et al., 2017). Kim et al., (2013) изследват появата на калцификати при доброкачествени и злокачествени тиреоидни възли, като съпоставят предоперативното ултразвуково изследване със следоперативната хистологична диагноза. Те стигат до извода, че калцификатите в стромата на тумора (псамомни телца и стромални калцификати) са характерни за малигнени неоплазми, докато при бенигнениге възли в щитовидната жлеза не се открива характерен начин на отлагане на калций. При тяхното изследване калцификатите като цяло, независимо от разположението им, са по-чести при малигнените лезии, отколкото при бенигнените. При настоящото изследване не се установи съществена разлика в присъствието на калцификати между бенигнените и малигнените неоплазми, а разлика има само по отношение на разположението им. Zhu C et al., (2016) сравняват компютърно-томографските с хистологичните находки при пациенти с тиреоидни възли на фона на ХЛТ с цел, разграничане на бенигнените от малигнените лезии на щитовидната жлеза. Те откриват, че в сравнение с доброкачествените неопластични лезии, малигнените имат по-често калцификати. Ние, подобно на тях, също установяваме, че основните калциеви отлагания при малигнените тумори са във вид на микрокалцификати вътре в стромата на тумора (централни). Bai Y et al., (2009) изследват калцификатите при папиларни карциноми на щитовидната жлеза и влиянието им върху преживяемостта на пациентите. При това проучване калцификатите се разделят хистологично на псамомни телца, стромални калцификати в тумора и костно формиране. Получените от тях резултати показват, че наличието на псамомни телца корелира с присъствието на макроскопски метастази в РЛВ и се асоциира с екстратиреоидна екстензия на туморите. Стромалните калцификати се асоциират с по-напреднал стадий на заболяването и присъствие на макроскопски метастази в РЛВ. Пациентите с псамомни калцификати в тумора имат значително по-кратък период, свободен от заболяване (период без рецидиви), в сравнение с пациентите, при които липсват калцификати.

Получените от нас резултати показват, че съществува силна зависимост между присъствието на фиброза и метастази в РЛВ при пациентите с карциноми. Стромална фиброза е наблюдавана при различни малигнени тумори и се смята, че тя има ефект върху биологичното им поведение. Някои проучвания сочат, че фиброзата се асоциира с по-висока честота на рецидивите и по-висока смъртност на пациентите (Hwang RF et al., 2008; Zhang C et al., 2009; Mujtaba SS et al., 2013).

Туморната строма се характеризира с ремоделиране на екстрацелуларния матрикс и уплътняване на тъканите, като десмопластичната реакция се използва при диагностициране на неопластичните процеси в различни органи (Butcher et al., 2009). Тези промени в ЕЦМ стимулират клетъчния растеж, оцеляването и миграцията на туморните клетки (Lo et al., 2000). Ригидността на стромата нарушава тъканната

морфогенеза чрез повишаване на клетъчното напрежение (Paszek et al., 2005). Paszek et al. изследват клетъчни култури и установяват, че понижаването на клетъчното напрежение инхибира малигнения фенотип на мамарните епителните клетки и нормализира поведението на туморните клетки при карцином на гърдата. Levental KR et al. (2009) откриват, че тъканната фиброза регулира прогресията на малигнените тумори, чрез повлияване на биофизичните свойства на микросредата. Авторите отбелязват, че огнищните адхезии на тъканни елементи са по-изразени при карциномите на млечна жлеза, и засилването на тези адхезии стимулира инвазивния растеж на мамарните епителни клетки, докато инхибирането на тези „слепвания“ или редуцирането на тъканната плътност, намалява туморната инвазия. Модулирането на активността на различни ензими и молекули, участващи в този процес, може директно да повлияе на туморната прогресия.

Според Worthley DL et al. (2010) туморната строма играе важна роля в инвазията и метастазирането на туморите на храносмилателния тракт. При карциномите на щитовидната жлеза фиброзата е слабо проучена. Знае се, че стромата на папиларните карциноми се характеризира с фиброзна тъкан, съставена от фибробласти и колагенни влакна. Някои от фибробластите в стромата на тези тумори са от миофибробластен тип. Подобни клетки се откриват в тъканите при зарастване на рани, както и в зоните на хроничен възпалителен процес, като промотират ангиогенезата, епителната пролиферация, произвеждат ЕЦМ, растежни фактори и цитокини (Takeda M et al., 2018). В проучването на M Takeda et al. (2018) върху папиларен карцином с хетеротопична осификация и влиянието ѝ върху туморната прогресия, изследват паралелно и фиброзата в тумора, тъй като процесите са тясно свързани. В тяхното проучване участват общо 113 пациента с описание на статуса на лимфните възли. Резултатите показват, че случаите на папиларни карциноми с хетеротопична осификация, както и тези с фиброза в тумора, се характеризират с по-висока честота на метастази в ЛВ, в сравнение със случаите на папиларен карцином без фиброза. Екстратиреоидната инвазия е по-честа в случаите с фиброза в тумора, отколкото в случаите, когато липсва. Liu X et al. (2018) изследват интратуморна фиброза при папиларни микрокарциноми и асоциацията и с биологичното поведение на тумора. От 511 пациента с карцином, 340 са с фиброза в стромата и авторите откриват статистически значима зависимост между фиброзата и възрастта на пациентите, размерите на тумора и лимфните метастази.

В заключение можем да твърдим, че женският пол и фертилната възраст са рискови фактори за развитие на карцином на щитовидната жлеза. Аденомите на щитовидната жлеза имат по-големи размери в сравнение с карциномите (обикновено над 2 см. в диаметър), интактна съединително-тъканна капсула, често с калцификати в нея, съдържат колоид, рядко в тях се откриват фиброзни промени. Карциномите се развиват често на фона на ХЛТ, могат да са частично капсулирани, колоид липсва или е оскъден, в стромата се откриват калцификати и фиброзни промени. Карциномите с малки размери – под 2 см в диаметър, обикновено са папиларни, докато с най-големи размери са онкоцитарните карциноми. Присъствието на фиброзни промени и калцификати в туморната строма повишава риска от поява на лимфни метастази, което прави наложително клиничното проследяване.

4.3. Експресия на CK19 при туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза

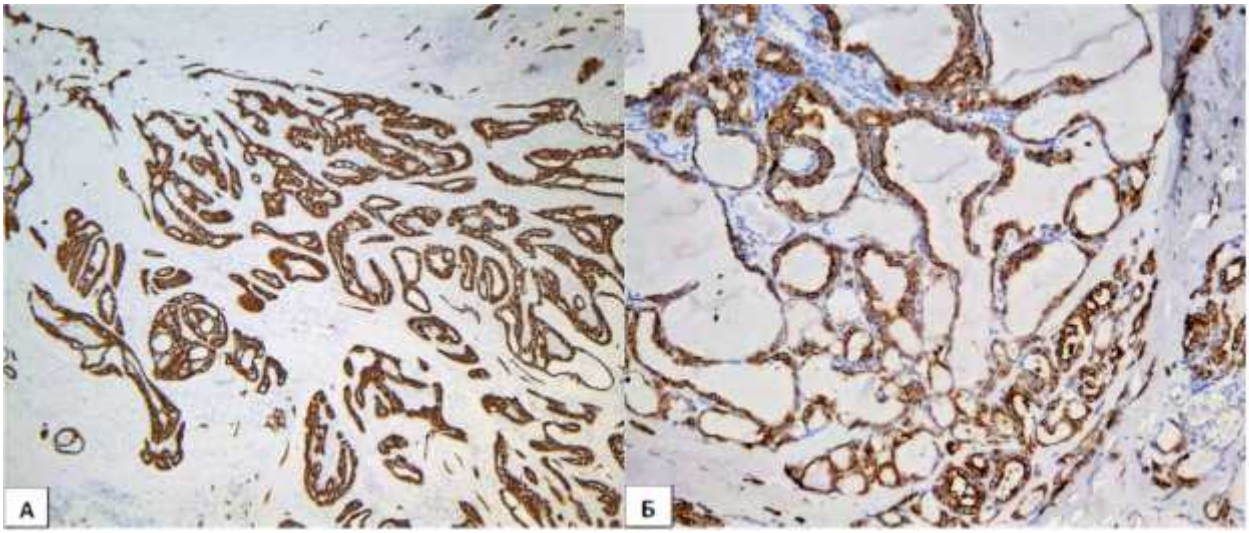
Таблица 10. *Експресия на CK19 при тумори на щитовидната жлеза*

Изследване	Оценка на експресията		ПК	ФВПК	ФК	ОК	ФА	ОА
Palo S., Biligi DS (2017)	% Позитивни клетки	0	0	1	4	-	7	-
		1	0	0	0	-	2	-
		2	0	3	0	-	2	-
		3	1	6	0	-	3	-
		4	15	5	0	-	0	-
	Интензитет	0	0	4	4	-	10	-
		1	4	8	0	-	2	-
		2	12	3	0	-	2	-
Собствено изследване (2018)	% Позитивни клетки	0	0	0	2	3	6	4
		1	0	0	1	2	4	4
		2	0	1	2	0	3	1
		3	2	2	4	0	1	0
		4	8	12	1	0	1	1
	Интензитет	0	0	0	4	3	6	4
		1	2	1	5	1	9	4
		2	8	14	1	1	0	2

На таблица 10 са представени резултатите от експресията на CK19 при различните неоплазми на щитовидната жлеза и резултатите са сравнени с тези на други автори (Palo S. et al., 2017).

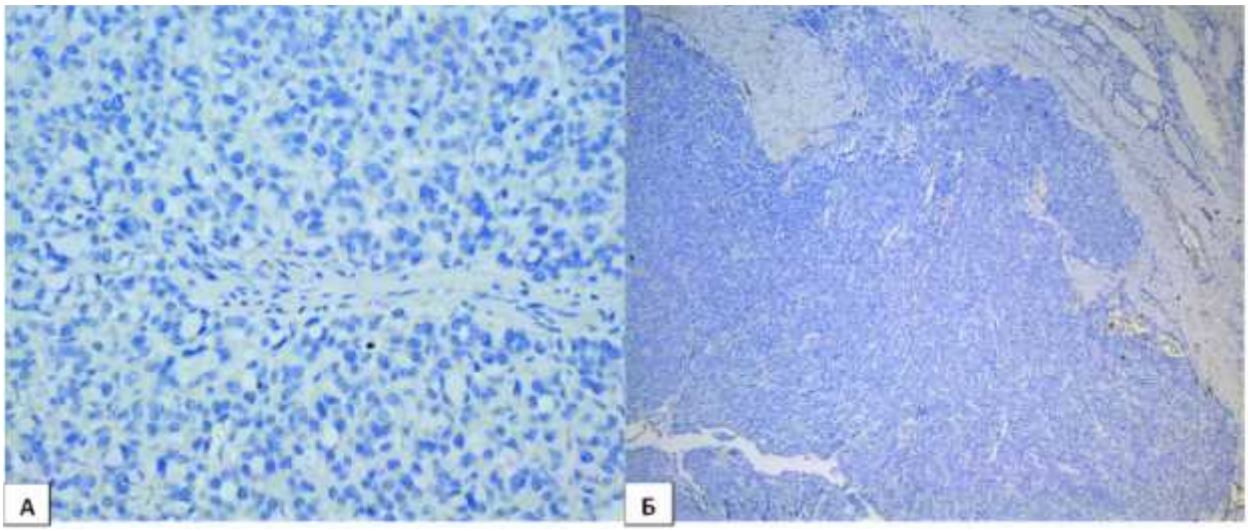
При изследване процента на позитивни за CK19 клетки в нашето изследване е установена съществена разлика между различните хистологични видове карциноми и аденоми (χ^2=56,59; p<0,001). Значителна зависимост се установи между вида на туморното заболяване и процента на позитивните клетки (ρ=-0,713; p<0,001) и в 50,80% от случаите процентът на позитивните клетки зависи от хистологичния вид на тумора. Папиларните карциноми, класическият и фоликулярният вариант, показват дифузна експресия на CK19 (Фигура 15). При всички останали неоплазми експресията е предимно фокална или липсва. При онкоцитарните карциноми и по-голямата част от онкоцитарните аденоми липсва реакция или CK19 се експресира в отделни клетки (Фигура 16-А,Б). При фоликуларните карциноми експресията е хетерогенна (Фигура 17-Б) и само един тумор от 10 случая показа дифузна експресия на маркера, като реакцията не е интензивна. Две/трети от фоликуларните аденоми показват експресия само в единични клетки, останалите 1/3 са негативни (Фигура 17-А). Статистически значима разлика не е установена между фоликуларните аденоми и фоликуларните

карциноми по отношение на CK19 (p>0,05). Липсва разлика и между доброкачествените и злокачествени онкоцитарни неоплазми (p>0,05).

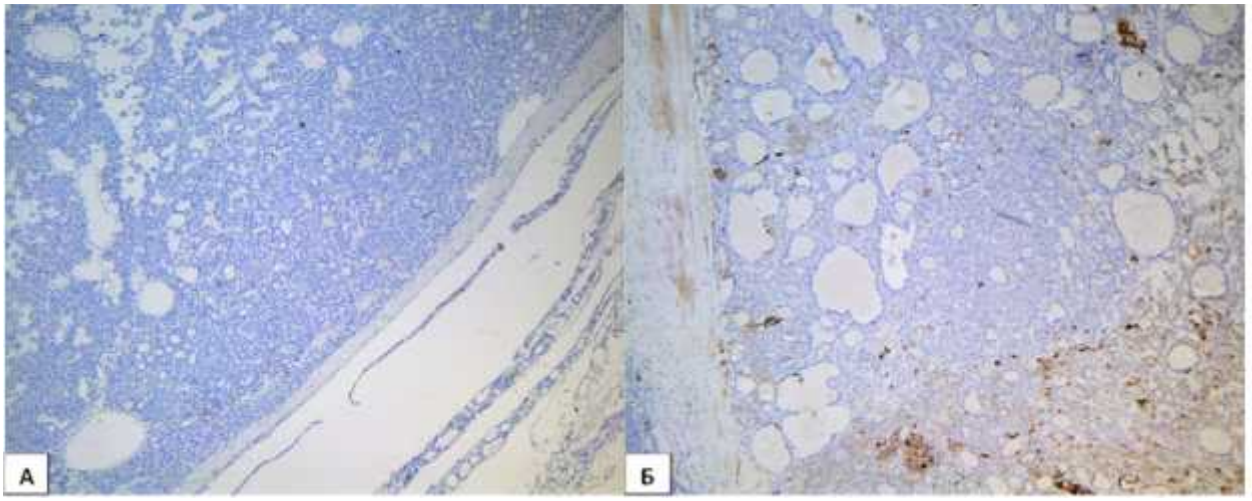


Фигура 15. А- Експресия на CK19 при папиларен карцином (класически, увеличение x40); Б - Експресия на CK19 при фоликуларен вариант на папиларен карцином, увеличение x100.

В настоящото проучване е намерена съществена разлика между интензивността на реакцията на CK19 при папиларния карцином в сравнение с останалите хистологични типове карцином на щитовидната жлеза (χ^2=43,75; p <0,001). Съществува силна зависимост между вида на тумора на щитовидната жлеза и интензитета (ρ=-0,614; p<0,001) и в 37,70% от случаите интензитетът зависи от хистологичния вид на тумора. Папиларните карциноми се характеризират, освен с дифузна, и с интензивна цитоплазмена експресия на маркера (Фигура 18). При останалите карциноми: ФК и ОК и аденомите: ФА и ОА, маркерът е негативен или интензивността на реакция е слаба, и само отделни групи клетки показват огнищна експресия. Съществена разлика в интензивността на CK19 между фоликуларните аденоми и карциноми, както и между онкоцитарните тумори не е установена (p>0,05).

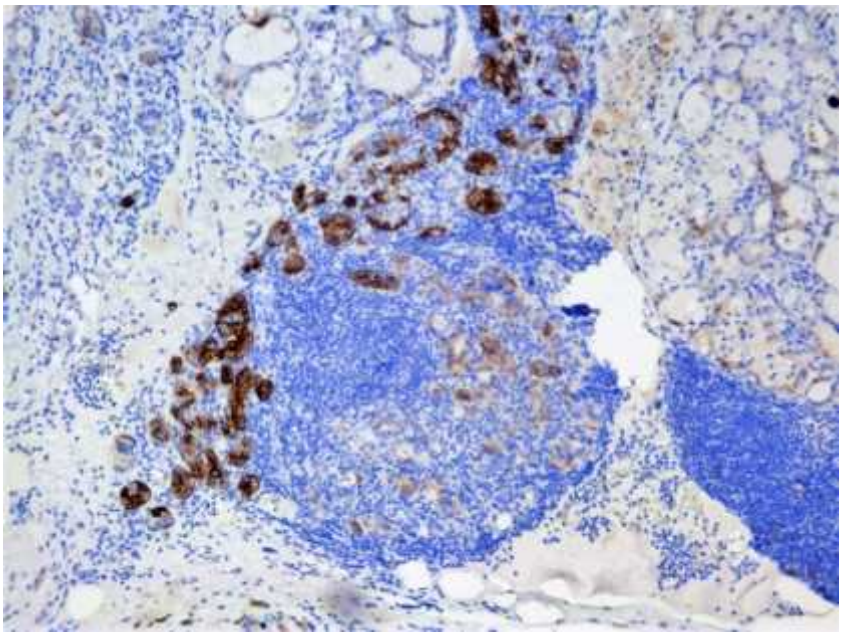


Фигура 16. А- Експресия на CK19 при онкоцитарен аденом (липсва реакция), увеличение 200x; Б - Експресия на CK19 при онкоцитарен карцином (липсва реакция), x40.



Фигура 17. А- Експресия на СК19 при фоликуларен аденом (липсва реакция), увеличение х40; Б - Експресия на СК19 при фоликуларен карцином (огнищна реакция), х40.

При всички неоплазми в настоящото изследване се оцени експресията на СК19 в околния нетуморен паренхим на жлезата. В нормален фоликуларен епител липсва СК19. Във фоликуларните клетки при нодозна струма и тиреоидит на Хашимото обикновено експресията липсва или е фокална, като интензивността на реакция е слаба до умерена. Фокалната експресия е във фоликуларни клетки с дегенеративни промени сред зони на фиброза, в огнища с кистична дегенерация и участъци с онкоцитарна метаплазия. Получените от нас резултати показват, че експресията на СК19 в околния на туморите паренхим не се различават от резултатите при изследване на СК19 в контролната ни група (10 пациента с нодозна струма или тиреоидит на Хашимото, но без туморно заболяване). Няма промяна в експресията на маркера в перитуморния паренхим.



***Фигура 18**.Експресия на СК 19 в онкоцити при тиреоидит на Хашимото, х40.*

Интерес представлява фактът, че онкоцитите при тиреоидит на Хашимото показват дифузна и умерена експресия на CK19 (всички участъци с метапластичен епител са позитивни на маркера – Фигура 18). За разлика от тях, при онкоцитарните тумори единични клетки експресират CK19 – т.е. метапластичните клетки и туморните клетки са с еднаква морфология при рутинно оцветяване с H&E, но се различават имунофенотипно.

На таблица 11 е представена ефективността на CK19 при разграничаване на бенигнените и малигнените тумори на щитовидната жлеза. Получените от нас резултати показват, че експресията на CK19 има висока чувствителност (82,50%) спрямо точното диагностициране на неоплазмите, но има ниска специфичност (40,00%), т.е. само на базата на CK19 не може категорично да се твърди, че лезията е бенигнена или малигнена. Позитивната и негативна предиктивна стойност показват, че маркерът е точен в малко над половината от случаите. На таблица 11 са представени резултатите и на други автори по отношение на положителна предиктивна стойност (ППС), негативна предиктивна стойност (ОПС), чувствителност (Ч), специфичност (Сп), диагностична точност (ДТ).

Таблица 11. *Оценка на експресията на CK19 при разграничаване на бенигнени от малигнени тумори.*

	Ч (%)	**Сп (%)**	**ППС (%)**	**НПС (%)**	**ДТ (%)**
Dunđerović D et al., (2015)	75.4	70.9	80.0	65.12	-
Palo S et al., (2017)	75.0	71.4	87.1	52.6	74.0
Собствено изследване (2018)	82.5	40.0	68.8	58.8	66.2

На таблица 12 е представена ефективността на маркера при разграничаването на нетуморни лезии от малигнени тумори. Според нашите резултати CK19 се характеризира с висока степен на чувствителност (82,50%) и позитивна предиктивна стойност (82,50%), което показва, че маркерът има висока ефективност по отношение на диагностицирането на пациентите със злокачествени тумори. Представени са собствените резултати и тези на други автори.

Таблица 12. *Оценка на експресията на CK19 при разграничаване на нетуморни лезии от малигнени тумори*

	Ч (%)	**Сп (%)**	**ППС (%)**	**НПС (%)**	**ДТ (%)**
Saleh et al., (2010)	84.6	50.0	65.7	74.2	
Palo S et al., (2017)	75.0	80.0	93.1	47.1	76.1
Собствено изследване (2018)	82.5	30.0	82.5	30.0	72.0

От гледна точка на разграничаването на ФВПК от ФА, CK19 показа висока ефективност, като чувствителността на маркера е 100%, а позитивната и негативна предиктивна стойност са съответно 62,50% и 100%. Ние установихме, че когато няма експресия на маркера, диагнозата ФВПК е малко вероятна (Таблица 13). От друга страна CK19 се характеризира и с висока диагностична точност при разграничаване на ФВПК от ФА (70,0%).

Таблица 13. *Оценка на експресията на CK19 при разграничаване на ФВПК от ФА.*

	Ч (%)	**Сп (%)**	**ППС (%)**	**НПС (%)**	**ДТ (%)**
Palo S et al., (2017)	73.3	71.4	-	-	-
Abouhashem et al, (2017)	85.7	83.3	66.7	93.8	84.0
Собствено изследване (2018)	100	40.0	62.5	100	70.0

В настоящото проучване един от туморите е капсулиран и първоначално е класифициран като фоликуларен аденом. След имунохистохимичното изследване на аденома, експресията на CK19 е интензивна. След направените серийни срези, оцветени с H&E, се установиха фокални ядрени белези за папиларен карцином. На базата на тези морфологични промени и имунохистохимичното изследване лезията е преоценена като неинвазивна фоликуларна неоплазма с нуклеарни характеристики на папиларен карцином (СЗО, 2017).

При изследване на ефективността на CK19 относно разграничаването на ФВПК от ФК се отчитат високи стойности на чувствителност, позитивна и негативна предиктивна стойност и диагностична точност. Получените от нас резултати са представени на таблица 14 заедно с данните на други автори.

Таблица 14. *Оценка на експресията на CK19 при разграничаване на ФВПК от ФК*

	Ч (%)	**Сп (%)**	**ППС(%)**	**НПС(%)**	**ДТ(%)**
Palo S et al., (2017)	73.3	100	-	-	-
Abouhashem et al, (2017)	85.7	60.0	75.0	75.0	74.9
Собствено изследване (2018)	100	40.0	71.4	100	76.0

Цитокератините са филаментозни протеини, които участват във формирането на цитоскелета и служат за механична опора на епителните клетки. Те съдействат за междуклетъчната сигнализация, отговора на стрес и апоптоза, чрез повлияване придвижването на органели и субстрати в цитоплазмата (Jain R et al., 2010). CK19 е нискомолекулярен цитокератин, който е изследван при злокачествени заболявания на

млечна жлеза, гастроинтестинален тракт, щитовидна жлеза и др. (Jain R et al., 2010, Bose D et al., 2012; Vieites B et al., 2016). При карцином на щитовидната жлеза, експресията на ген *KRT19*, кодиращ протеин CK19 е повишена. Ние, подобно на други автори (Dunđerović D et al., 2015; Abouhashem NS et al., 2017, Palo S et al., 2017), изследвахме експресията на маркера при доброкачествени и злокачествени неоплазми на щитовидната жлеза.

Ние установихме, че процентът на позитивните CK19 клетки се различава от една страна между отделните хистологични варианти на карцинома на щитовидната жлеза, а от друга страна между тиреоидните карциноми и аденоми. Подобни резултати са получени и от други автори (S. Palo, 2017). На таблица 14 са представени собствените резултати и данните от литературата. Ние, подобно на други автори, установихме дифузна и интензивна цитоплазмена експресия на CK19 при ПК, която не се наблюдава при другите тиреоидни неоплазми. При фоликуларния и онкоцитарен карцином липсва експресия на CK19 или има фокална позитивна реакция. Подобна експресия се наблюдава и при фоликуларния и онкоцитарен аденом. Взети заедно, получените от нас резултати показват, че CK19 има диагностична стойност при папиларния карцином, но само в случаите, когато реакцията е интензивна и дифузна. Съществена разлика в експресията на CK19 между ФА и ФК, и между ОА и ОК липсва ($p>0.05$). Подобни са резултатите на Dunđerović D et al., (2015), които установяват, че експресията на CK19 не може да се използва като допълнителен критерий при разграничаването на злокачествените от доброкачествените фоликуларни тумори, както и при злокачествените и доброкачествените онкоцитарни неоплазми.

Резултатите от различни проучвания, са подобни на нашите – папиларните карциноми показват дифузна и интензивна цитоплазмена експресия на маркера, която не се наблюдава при другите тиреоидни неоплазми. Фоликуларните и онкоцитарните неоплазми (аденоми и карциноми) в нашето изследване и при други проучвания се характеризират с липсваща/слаба/рядко умерена и почти винаги огнищна експресия на маркера (Calangiu CM et al., 2014; Abouhashem NS et al., 2017, Palo S et al., 2017). На таблица 15 са представени някои изследвания на експресията на CK19 в тумори на щитовидната жлеза от последните десет години.

Ние установихме, че при нодозна струма и тиреоидит на Хашимото фоликуларните клетки показват фокална, слаба до умерена по интензитет реакция за CK19 или тя липсва. В околния нетуморен паренхим на жлезата ние открихме CK19 позитивност в епителни клетки с дегенеративни промени, сред фиброзни полета, в зони с кистична трансформация на епитела и в огнища на онкоцитна метаплазия. Подобни промени са наблюдавани и от други автори (Bose D et al., 2012; Abouhashem NS et al., 2017) в съседния на неоплазмите паренхим.

Таблица 15. *Проучвания върху експресията на CK19 през последните десет години.*

Проучване, година	Брой позитивни случаи/Общ брой случаи (%)				
	ФА	ФК	ФВПК	ПК, класически	ПК
Liu et al., 2008	0/12(0)	0/13(0)	2/11(22)	-	41/53(78)
Murhy et al., 2008	4/15(27)	6/14(43)	2/9(18)	-	20/20(100)
Saleh et al., 2010	23/46(50)	19/22(86.3)	10/12(83.3)	17/20(85)	-
Siderova et al., 2013	1/10(10)	3/5(60)	4/5(80)	12/12(100)	-
NechiforBolia et al., 2014	0/5(0)	-	3/5(60)	4/6(66.7)	-
Alshenawy et al., 2014	4/7(57)	8/15(53)	8/8(100)	8/8(100)	-
Dunderovic et al., 2015	6/27(22)	5/15(33)	31/40(78)	75/87(86)	-
Наше проучване, 2017	5/15 (33.2)	7/10(70)	15/15(100)	10/10(100)	-

Ние открихме, че всички онкоцити при тиреоидит на Хашимото показват дифузна и умерена експресия на CK19, т.е. всички огнища на метапластичен онкоцитарен епител са позитивни за маркера. За разлика от онкоцитите, само единични клетки при онкоцитарните тумори експресират CK19. Tsybrovskyy et al., (2009) предлагат теория, според която онкоцитните промени не са обикновен процес на хиперплазия на митохондрии в клетката, а са сложна, специализирана реорганизация на всички вътреклетъчни органели, асоциирани с метаплазия и малигнизация. Те откриват, че значителната хиперплазия на ендоплазмения ретикулум в цитоплазмата (багри се интензивно от еозина) на онкоцитите се асоциира с възпалителни процеси, докато пролиферацията на митохондрии в цитоплазмата е свързана с неопластични процеси. Тези наблюдения показват, че онкоцитните нетуморните и туморни лезии, оцветени с хематоксилин и еозин не могат да се различат. Необходимо е имунохистохимично изследване за идентифициране на митохондриите и ЕР в цитоплазмата с цел определяне ролята и значението на съответните онкоцитни алтерации. Протеин CK19, позитивен в онкоцитите при тиреоидит на Хашимото и негативен при онкоцитните неоплазми според нас показва, че онкоцитните тумори не са асоциирани с метапластични онкоцитни промени. От друга страна CK19 като

цитоскелетен протеин вероятно участва в реорганизация на вътреклетъчни органели в онкоцитите при тиреоидит на Хашимото.

Появата на CK19 вероятно е ранен белег за увреда на клетките в резултат на хроничния възпалителен процес. Нито един от онкоцитарните тумори при настоящото изследване не е на фона на ХЛТ. Според нас, туморните онкоцити са различни от метапластичните онкоцити и най-вероятно имат различно клинично значение. Някои автори откриват в ядрата на метапластичните фоликуларни клетки при тиреоидит на Хашимото поява на нуклеарни бразди и псевдоинклузии, морфологични белези, характерни за ядрата на неопластичните клетки при папиларен карцином (Asa SL, 2014). При настоящото проучване, както показват и данните от литературата, папиларният карцином се асоциира с ТХ (Jankovic B et al., 2013; Lee JH et al., 2013). Има данни, че ТХ и папиларният карцином притежават сходни молекулярни алтерации (Colotta F et al., 2009). Взети заедно получените от нас данни и тези от литературата показват, че са необходими допълнителни проучвания в тази област с цел изясняване на възможността появата на онкоцити при ХЛТ да е пренеопластично състояние, което да е асоциирано с ПК.

Туморите на щитовидната жлеза с фоликуларен строеж са едни от най-трудните в диагностичната практика и в диференциално диагностичен план трябва да се има предвид ФА, ФК и ФВПК. При някои случаи на ФВПК, характерните нуклеарни черти като псевдоинклузии, бразди, „матовостъкловидни“ ядра могат да липсват или тези черти са твърде дискретни. Получените от нас резултати показват, че експресията на CK19 има висока чувствителност (82,50%) по отношение разграничаването на бенигнените от малигнените тумори на щитовидната жлеза, но има ниска специфичност (40,00%). Според данните от изследването на Palo S et al., (2017) ефективността на CK19 при двете групи неоплазми: бенигнени и малигнени е значително по-висока в сравнение с данните от настоящото изследване. Авторите установяват висока специфичност и чувствителност на CK19.

Според H A Alshenawy, сензитивността и специфичността на CK19 по отношение разграничаване на малигнени от бенигнени тумори е съответно 65% и 78%, но при разграничаване на ПК от бенигнени нетуморни лезии, сензитивността и специфичността на маркера е 100% и 77% (Alshenawy HA, et al., 2014). Резултатите от настоящото изследване са в съответствие с данните на други автори за ефективността на CK19 при разграничаването на ФВПК от ФА (Таблица 13). Оценявайки ефективността на CK19 при отдиференциране на ФВПК от ФК, ние отчитаме високи стойности на чувствителност, позитивна и негативна предиктивна стойност и диагностична точност. В сравнение с настоящото изследване, специфичността на CK19 при разграничаването на ФВПК от ФК, определена от други автори е по-висока (таблица 14). От друга страна в изследване на Alshenawy HA et al., при разграничаване на ФВПК от ФК, CK19 показва 100% сензитивност и подобно на нас, авторите установяват 47% специфичност.

Подобно на други автори, и ние не открихме зависимост между експресията на CK19 и възрастта, пола и размера на тумора (Calangiu CM et al., 2014; Kaliszewski K et al., 2016).

В заключение, резултатите от настоящото изследване показват, че CK19 се експресира по-често при малигнените тумори на щитовидната жлеза, отколкото при бенигнени лезии. Експресията на антитялото при папиларния карцином е значително по-висока от тази на ФК. С помощта на CK19 може да се разграничи фоликуларният вариант на папиларен карцином от фоликуларен аденом и от фоликуларен карцином. Маркерът не допринася за отдиференциране на фоликуларния аденом от фоликуларен карцином. Онкоцитарните неоплазми са негативни за CK19 или експресират маркера само в единични клетки. Онкоцитите при хроничен лимфоцитарен тиреоидит са винаги позитивни за CK19. Интензивното цитоплазмено оцветяване за CK19 при тумори с фоликуларен строеж изисква допълнително морфологично изследване, за да се потърсят типичните ядрени характеристики на папиларния карцином.

4.4. Микроваскуларна плътност при туморни и нетуморни лезии на щитовидната жлеза

На таблица 16 са представени, получените от нас резултати от микроваскуларната плътност (МВП) при туморни и нетуморни лезии на щитовидната жлеза и данните са сравнени с тези от литературата (Rzeszutko M et al., 2004; Jebreel A et al., 2007). Най-ниска е стойността на МВП при папиларен карцином, а най-висока при онкоцитарен карцином. МВП между папиларния карцином и другите хистологични видове карцином е статистически значима ($p<0,05$). Статистически значима е разликата между папиларния карцином и бенигнените лезии (НС, ТХ) ($p<0,05$).

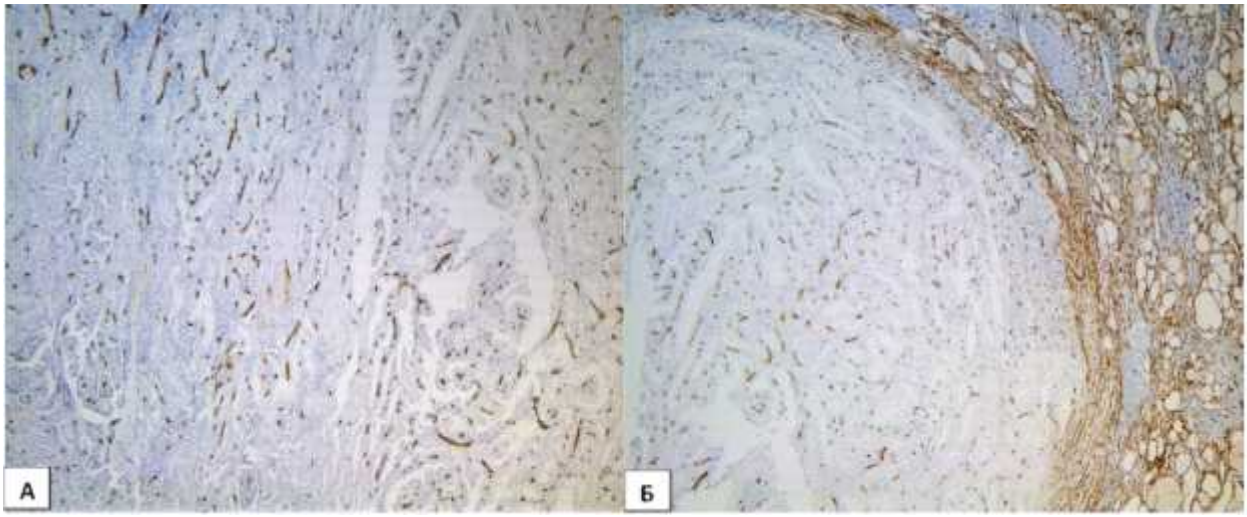
Таблица 16. *Микроваскуларна плътност при тумори на щитовидната жлеза, нодозна струма и Хашимото тиреоидит*

	M. Rzeszutko et al. (2004)		A. Jebreel et al. (2007)		Собствени резултати (2018)	
	N	mean	N	mean	N	mean
Нодозна струма	10	30.3	25	34.5	5	37.7
ТХ	-	-	8	33.3	5	37.9
ПК	23	24.4	7	40.3	25	28.5
ФА	8	33.5	10	29.1	15	33.8
ФК	9	18.7	-	-	10	35.4
ОА	-	-	-	-	10	35.4
ОК	-	-	-	-	5	38.7

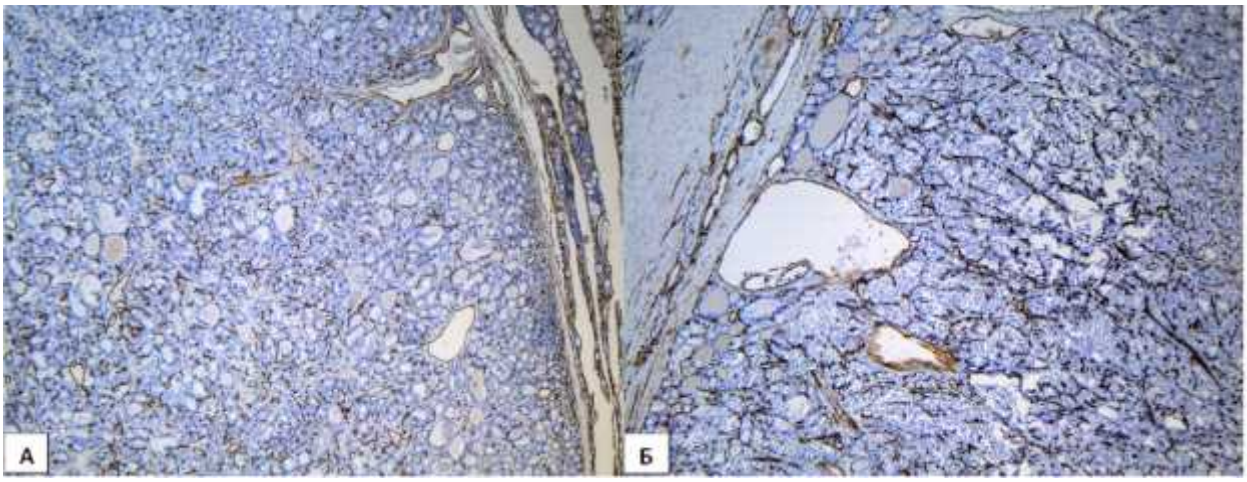
При сравняване на ПК с ФК се установи, че стойностите на МВП са сигнификантно по-ниски при пациентите с ПК ($t=2.4$; $p<0.05$). Подобни резултати се

отчетоха при сравняване на МВП на ПК с ОК (t=4,43; p=0.001), с ФА (t=2.99; p<0.01) и ОА (t=3.92; p=0.001). От друга страна статистически значима разлика от проведения сравнителен анализ на МВП между останалите туморни заболявания се установи само между ОК и ФА, като средната стойност на МВП е по-висока при ОК (съответно 38,7 и 33,8) (t=2.16; p<0.05). При сравняване на МВП на нетуморните заболявания (нодозна струма и ТХ) и туморните образувания разликата е статистически значима между нетуморните заболявания и ПК (t=5.47; p<0.001) и ФА (t=2.63; p<0.05), където стойностите на МВП са сигнификантно по-ниски от тези на нетуморните заболявания.

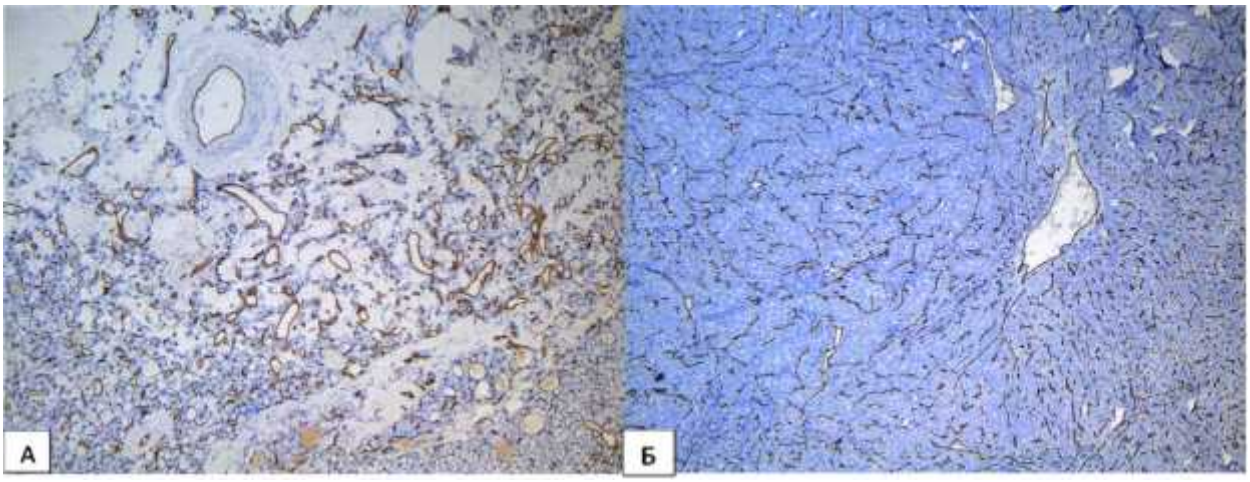
При папиларните карциноми открихме сравнително равномерно разпределени малки по калибър съдове, докато в съседната на тумора тъкан се намериха съдове от по-голям калибър (Фигура 19-.А,Б). Във фоликуларните и онкоцитарните аденоми открихме малки по калибър съдове в центъра на лезиите, а периферно субкапсулно – по-големи тънкостенни съдове (Фигура 20-А,Б). При фоликуларните и онкоцитарните карциноми съдовете са неравномерно разпределени, като има съдове с различен калибър, както и съдове с дебела стена (Фигура 21-А,Б).



***Фигура 19**. Експресия на CD34 в съдове при папиларен карцином – А - малокалибрени съдове, х40; Б – перитуморни съдове, х40.*

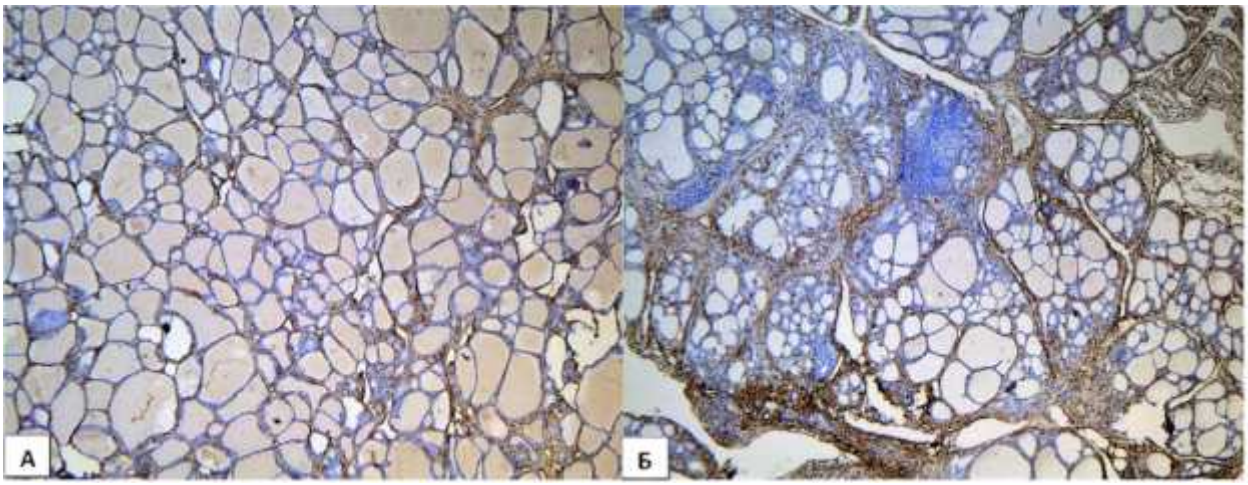


***Фигура 20**. Експресия на CD34 в съдове при: А - фоликуларен аденом и Б – онкоцитарен аденом – субкапсулни съдове с по-голям калибър, увеличение х40.*



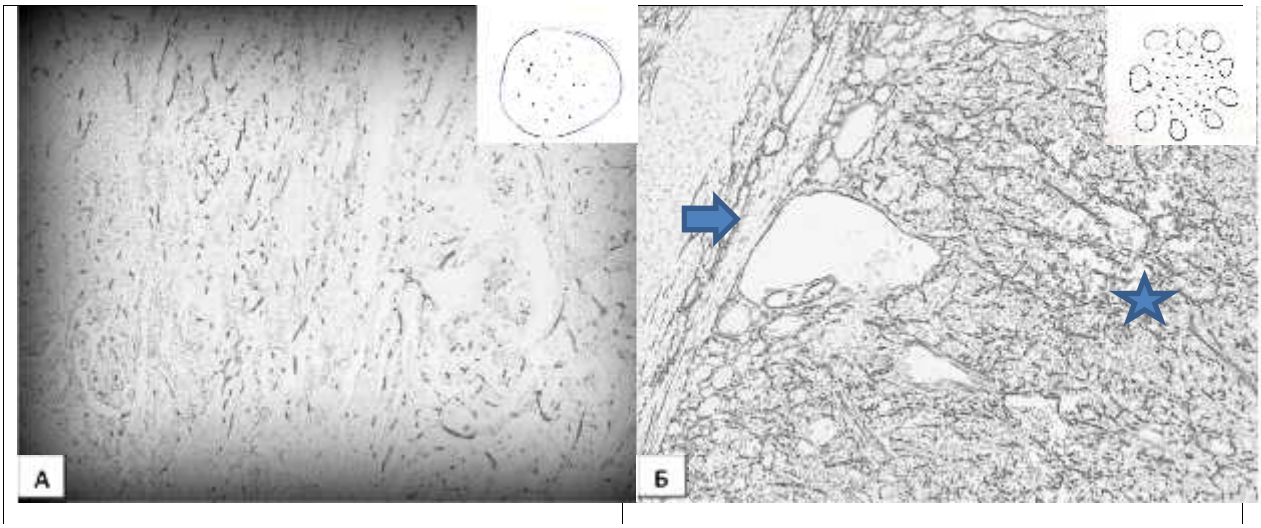
Фигура 21. *Експресия на CD34 в съдове при: А - фоликуларен карцином и Б – онкоцитарен карцином – дебелостенни съдове с по-голям калибър, увеличение х40.*

На фиг. 22 е представена експресията на CD34 при нетуморните заболявания: нодозна струма и тиреоидит на Хашимото. Наблюдава се гъста мрежа от разнокалибрени съдове, които са неравномерно разпределени.



Фигура 22. А – експресия на CD 34 при нодозна струма, увеличение х40; Б – експресия на CD 34 при тиреоидит на Хашимото, увеличение х40.

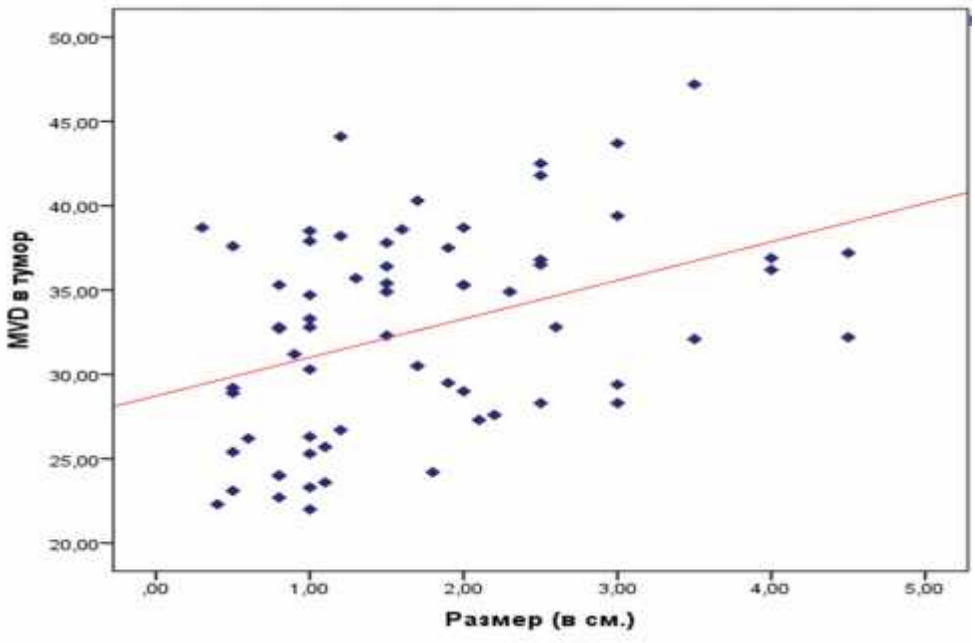
За представяне на различията в съдовата мрежа при туморите, предлагаме следните схеми, описани на Фигура 23.



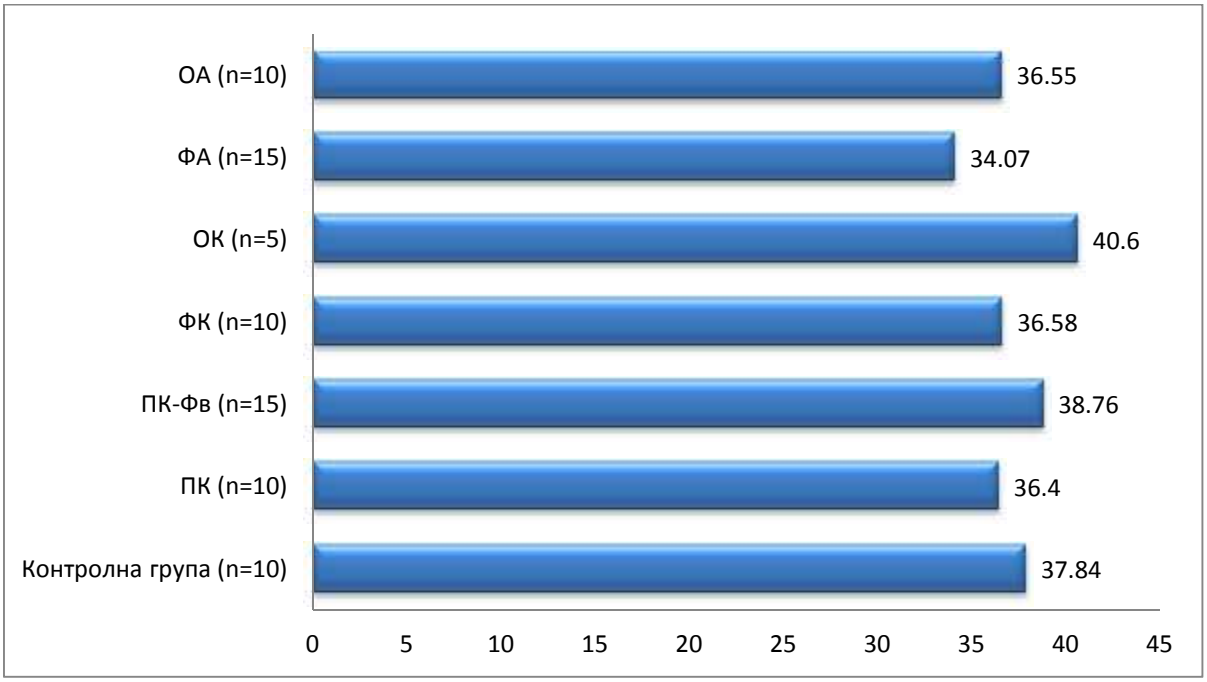
Фигура 23. *А – схематично представяне на съдова мрежа тип „сито“ при папиларни карциноми; Б – схематично представяне съдова мрежа тип „цвете“ при фоликуларни и онкоцитарни аденоми – субкапсулни големи съдове (стрелка), централни малокалибрени съдове (звезда) – схема в горен десен ъгъл.*

При анализ на връзката между размера на тумора и микроваскуларната плътност беше установена правопропорционална умерена зависимост между двата фактора (r=0.386; p=0.001) (Фиг. 24).

При сравнителния анализ на микроваскуларната плътност в околния на туморите паренхим не се установи съществена разлика, както между самите тумори, така и с пациенти без туморни заболявания на щитовидната жлеза (фиг. 25). Съдовата мрежа в околната или перитуморната тъкан не се промения при наличие на туморен процес.



Фигура 24. *Зависимост между размера на тумора и микроваскуларната плътност.*



Фигура 25. *МВП в съседния на туморите паренхим на щитовидна жлеза.*

.

Сравнителният анализ на микроваскуларната плътност при различните туморни образувания на щитовидната жлеза показа, че има съществена разлика между ПК и останалите тумори. При сравняването на ПК с ФК установихме, че стойностите на МВП са по-ниски при пациентите с ПК. Подобни резултати отчетохме и по отношение на сравняването на МВП при ПК с: ОК, ФА и ОА. Rzeszutko et al. (2004) от своя страна съобщават за най-висока микроваскуларна плътност при папиларните карциноми в сравнение с останалите малигнени тумори в тяхното проучване – медуларни и фоликуларни карциноми (табл. 16). Те определят фоликуларните аденоми, както и нодозната струма като лезии с висока МВП. При тях лезии с ниска МВП са фоликуларните карциноми, а лезии с умерена (междинна) МВП са папиларните карциноми. При изследването на Rzeszutko et al. (2004) има значителна разлика в МВП между бенигнените нетуморни заболявания и малигнените неоплазми, като нетуморните болести се характеризират с по-висока МВП. В настоящото изследване при сравняването на нетуморните заболявания (нодозна струма и ТХ) с туморните образувания, съществена разлика беше установена само по отношение на ПК и ФА, където стойностите на МВП са сигнификантно по-ниски от тези на нетуморните заболявания. Според друго изследване (Jebreel A et al., 2007) най-висока е МВП при папиларните карциноми и най-ниска при фоликуларните аденоми. Някои автори търсят зависимост между диференциацията на тиреоидните карциноми и МВП и установяват висока МВП при добре диференцирани тиреоидни карциноми включително при папиларен карцином (Karaca Z et al., 2011). De la Torre et al. (2006) изследва 191 пациента с тиреоидни заболявания, в това число и карциноми, и установяват, че МВП е ниска не само при папиларни карциноми, както е при настоящото изследване, но също

и при хиперпластични заболявания, бенигнени и малигнени лезии в сравнение с нормалната тиреоидна тъкан и разликата е статистически значима ($p<0.0001$). Според нас, различията в получените данни могат да се дължат на различните методики на оценка на микроваскуларната плътност, на използваните антитела за визуализация на неоваскуларизацията, както и на клинико-морфологичните показатели на туморите, в това число и стадият на заболяването.

Според някои проучвания, ниската МВП при ПК се асоциира с напреднал стадий на заболяването, лоша прогноза и намалена преживяемост (FrigugliettI CU et al., 2000). Според други изследвания, намалената преживяемост при пациентите с папиларен карцином се свързва с висока МВП (Tanaka et al., 2002). Според проучване на Гълъбова и съавтори, подобно на Frigugliettl et al., пациентите с папиларни карциноми в напреднал стадий имат ниска МВП (Гълъбова и др., 2014).

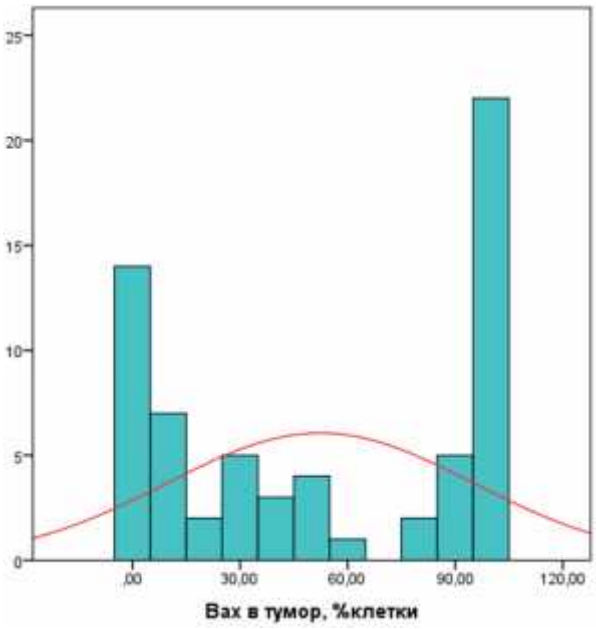
При папиларните карциноми ние открихме сравнително равномерно разпределени малки по калибър съдове, като в нетуморната тъкан, установихме по-големи по калибър съдове. Scarpino et al. (2003) описват също два типа съдове при папиларен карцином: деликатна мрежа от капиляри в стромата на тумора и големи венозни съдове в перитуморната тъкан.

В заключение, можем да обобщим, че микроваскуларната плътност, определена имунохистохимично с ендотелния маркер CD34, може да се използва като допълнителен критерий при диференциалната диагноза на туморите на щитовидната жлеза. Папиларните карциноми имат най-ниската МВП и съдовата мрежа се представя като тип „сито“. Фоликуларните и онкоцитарните аденоми са с по-висока МВП и съдовата мрежа е тип „цвете“. Най-голяма е МВП при онкоцитарните и фоликуларните карциноми, които нямат характерни черти на съдовата мрежа, в стромата на туморите се откриват дебелостенни съдове.

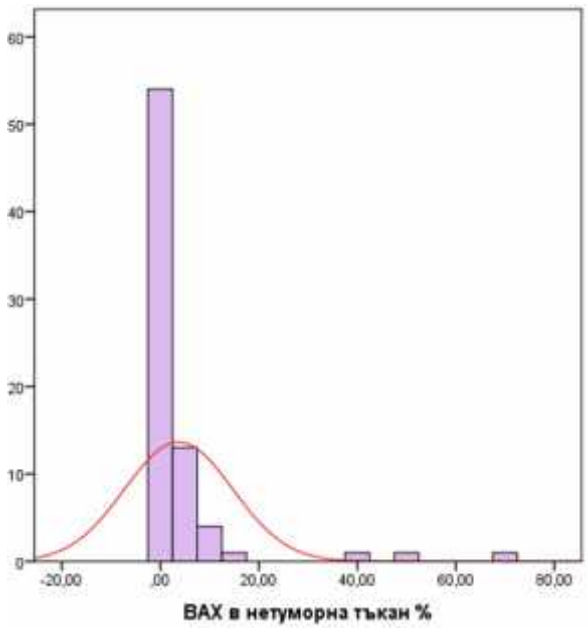
4.5. Експресия на Bax при туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза

Експресията на Bax протеин е изследвана при 65 пациента с тумори на щитовидната жлеза: 10 класически папиларни карцинома, 15 фоликуларни варианта на папиларен карцином, 10 фоликуларни карцинома, 5 онкоцитарни карцинома, 15 фоликуларни аденома и 10 онкоцитарни аденома. На фигура 26 е представена експресията на антитялото. Получените от нас резултати показват, че средната площ на позитивните клетки е 52,38±42,78%, като минималната площ е 0 (липсват позитивни клетки), а максималната - 100%.

На фиг. 27 е представена експресията на Bax в околния паренхим на представените тумори, като процентът на позитивните клетки е 3,73%±10,97%, минимумът е 0%, а максимумът е 70%. Резултатите са сравнени с тези на 10 пациента с нетуморни заболявания на щитовидната жлеза. Съществена разлика в експресията на Bax протеина между двете групи не се установи ($p>0,001$).

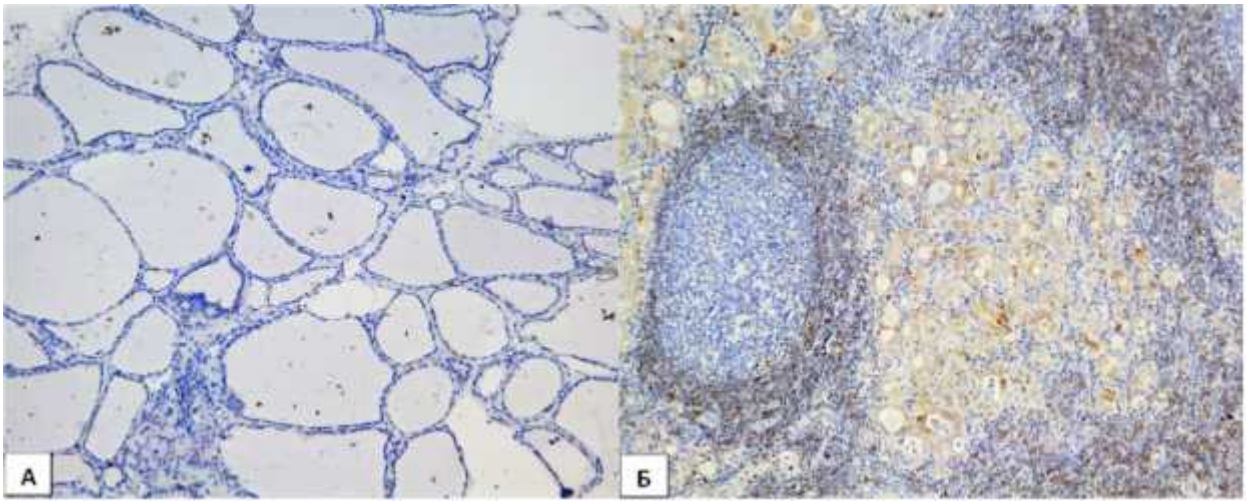


Фигура 26. *Експресия на Bax в туморна тъкан (% позитивни клетки).*



Фигура 27. *Експресия на Bax в нетуморна тъкан (% позитивни клетки).*

Анализът на експресията на Bax в съседната на тумора тъкан и нетуморна тъкан и сравнен с Bax позитивността в туморна тъкан показа, че между двата вида експресия има статистически значима разлика ($p<0,001$). Нивото на Bax в нетуморната тъкан е значително по-ниско в сравнение с туморнатата тъкан.



Фигура 28. *Експресия на Bax в нетуморна тъкан – А- нодозна струма - липсва експресия, увеличение x100; Б – тиреоидит на Хашимото – експресия от онкоцити, увеличение x200.*

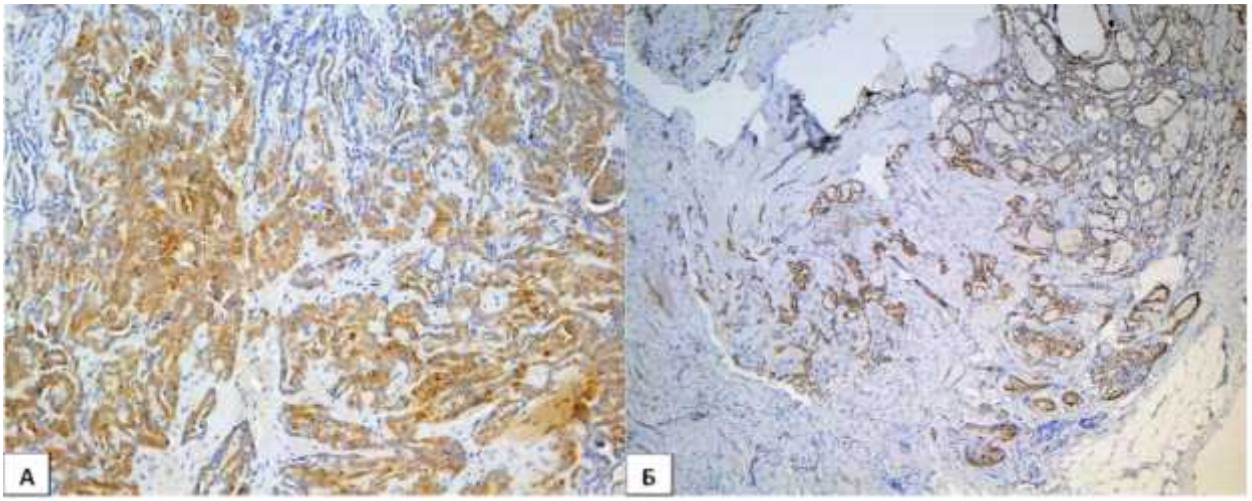
Експресията на Bax в настоящото изследване е цитоплазмена. Фоликуларните епителни клетки на нормалната щитовидна жлеза и нодозната струма са негативни за Bax (Фигура 28А) с изключение на фокална позитивност на клетки в огнища с фиброза

и кистична дегенерация. Експресия на Bax се откри в онкоцити при тиреоидит на Хашимото. Дифузно оцветяване с Bax се установи във фоликули с дифузна онкоцитарна метаплазия на епитела (Фигура 28Б).

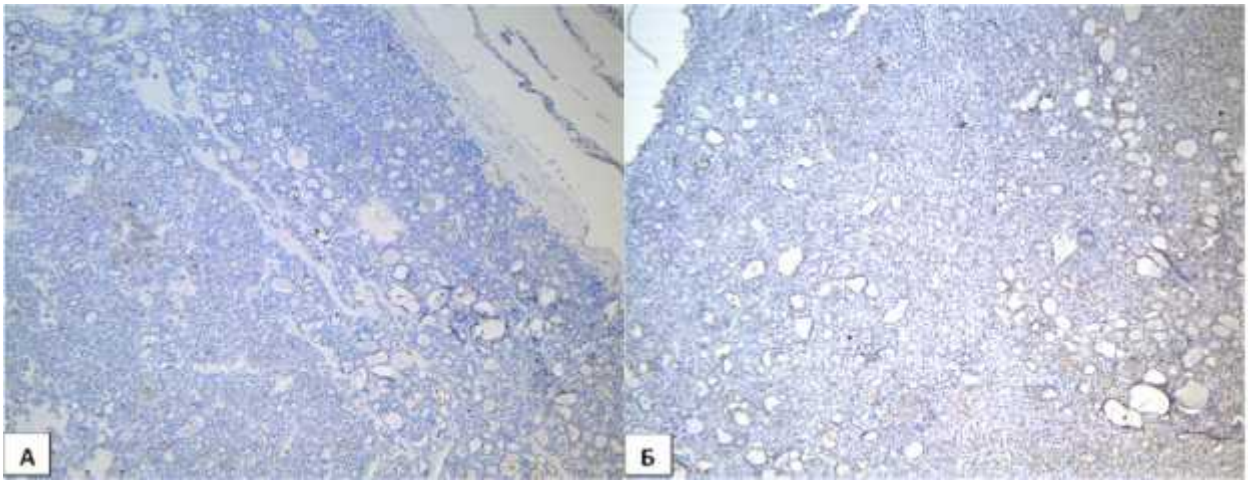
На фигура 29 е представен сравнителният анализ на експресията на Bax при различните тумори и околната им тъкан. Резултатите показват сигнификантна разлика между експресията на антитялото в папиларни карциноми и фоликуларни неоплазми ($F=8.25$; $p<0.001$). Най-висок процент на позитивните клетки е установен в групата на ПК и в частност на ФВПК (88,33%). Най-нисък процент е отчетен при фоликуларните аденоми (19,00%). Статистически значима разлика е установена между експресията на Bax в туморната тъкан и околната тъкан ($p<0,001$). Експресията на Bax в околната на туморите тъкан е значително по-ниска в сравнение с туморната тъкан. В околната на ПК нетуморна тъкан се наблюдават най-високите стойности на антитялото (съответно 7% за ПК и 3 % за ФВПК

Фигура 29. *Средна стойност на % позитивни клетки за Bax в туморите на щитовидната жлеза*

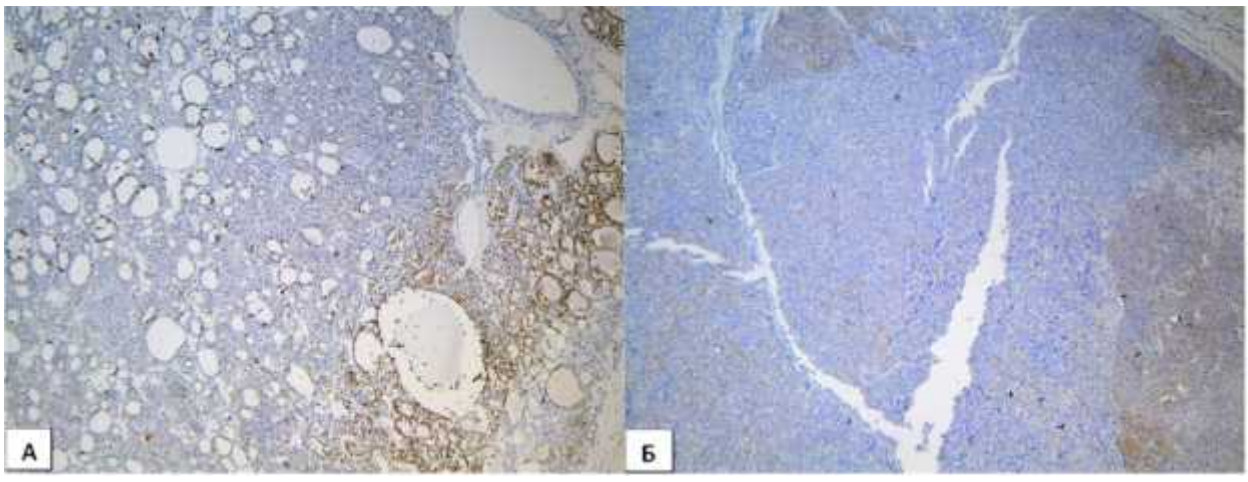
Класическият и фоликуларен вариант на папиларен карцином показват дифузна по площ и умерена по интензивност експресия на Bax в туморните клетки (Фигура 30 – А и Б). При фоликуларните аденоми и карциноми експресията е фокална, а интензивността на реакцията е слаба към умерена (Фигура 31 – А и Б). При онкоцитарните тумори (аденоми и карциноми) експресията е хетерогенна, като в част от туморите почти 50% от клетките експресират антитялото. Реакцията е умерена или слаба, но никога не е дифузна (Фигура 32 – А и Б). Експресията на Bax в перитуморната тъкан при някои папиларни карциноми се дължи на тиреоидит на Хашимото. Позитивната реакция е в участъците с онкоцитарна метаплазия. Bax, подобно на изследвания CK19 се експресира дифузно от метаплазиралите фоликуларни клетки.



***Фигура 30**. Експресия на Bax при: А - класически папиларен карцином, увеличение х100; Б –фоликуларен вариант на папиларен карцином, увеличение х40.*



***Фигура 31.** Експресия на Bax при: А – фоликуларен аденом, увеличение х40; Б – фоликуларен карцином, увеличение х40.*

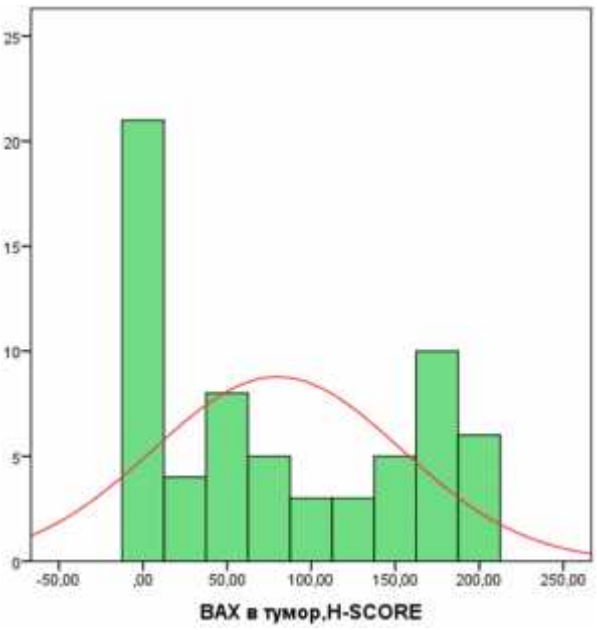


***Фигура 32.** Експресия на Bax при: А – онкоцитарен аденом, увеличение х40; Б – онкоцитарен карцином, увеличение х40.*

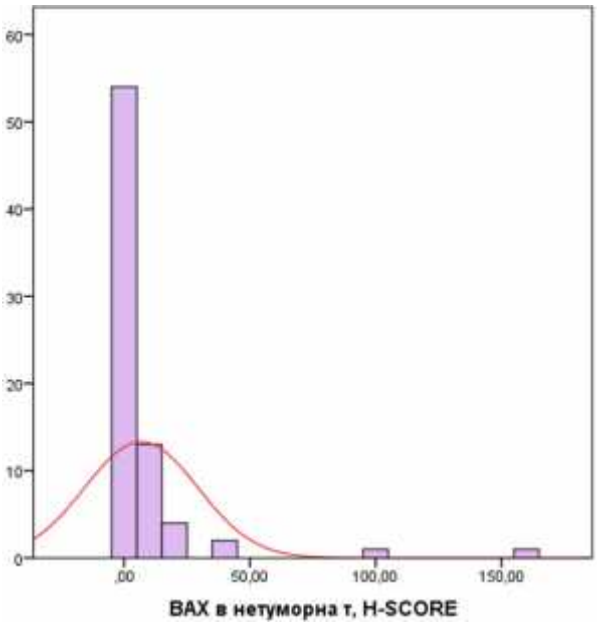
На фигура 33 е представено разпределението на H-score на експресията на Bax в туморната тъкан на щитовидна жлеза. H-score е определен на базата на процента позитивни клетки, умножен по съответния интензитет на експресията на Bax. Средната стойност е 79,92±73,87, като минималната е 0 (т.е. лисва експресия, в 21,50% от случаите), а максималната е 200 (1,50% от случаите).

На фигура 34 е представен H-Score на експресията на Bax в околния на туморите паренхим и нетуморна тъкан, като средната стойност е 6,80±22,46, минималната е 0 (72,0% от случаите), а максималната е 160 (1,3 % от случаите).

При сравняването на H-Score на експресията на Bax в туморната и нетуморна тъкан е установена статистически значима разлика (p<0,001). Стойностите на H-Score в нетуморната тъкан са значително по-ниски, като в около ¾ от случаите липсва на експресия.

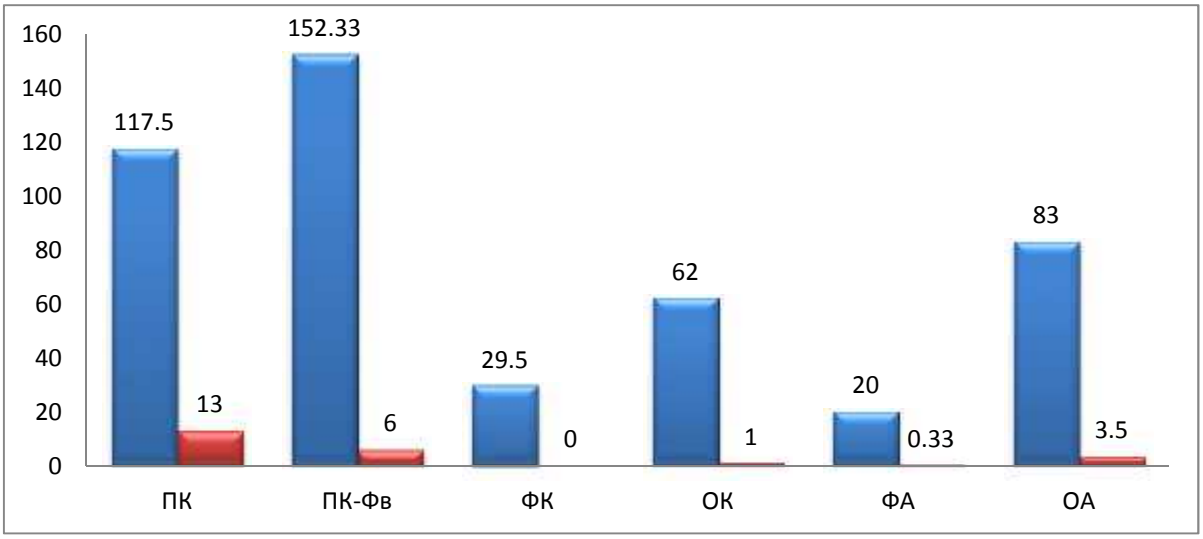


Фигура 33. *H-Score на експресията на Bax в туморна тъкан.*



Фигура 34. *H-Score на експресията на Bax в нетуморна тъкан.*

На фигура 35 е представен сравнителният анализ на H-Score на експресията на Bax при различните тумори и околния им паренхим. Получените от нас резултатите показват сигнификантна разлика между H-Score в туморите (F=11.68; p<0.001). Най-висока стойност беше установена в групата на ПК и в частност на ФВПК (152,33). Най-ниска е отчетена при фоликуларните аденоми (20,00). Сигнификантна разлика има и между H-Score в туморната тъкан и околния паренхим (p<0,001). Експресията на Bax в околния паренхим е значително по-ниска, отколкото в туморната тъкан.



Фигура 35. *Средна стойност на H-Score на експресията на Bax в туморите на щитовидната.*

Таблица 17. *Връзка на експресията на Bax с клинико-морфологични показатели*

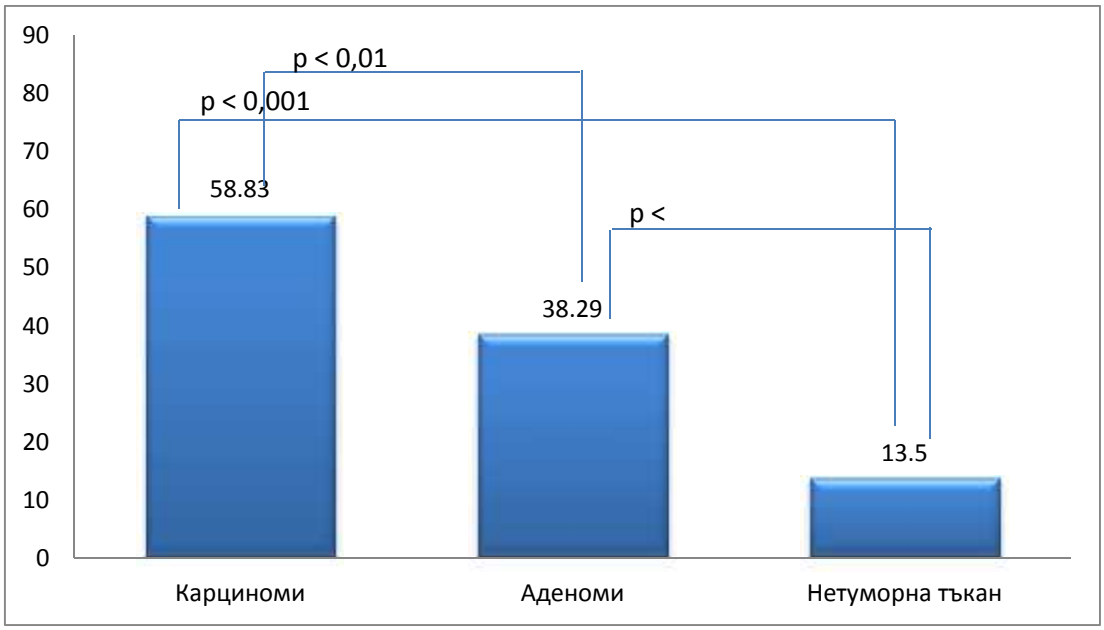
Показател		M. Martinez-Brocca et al., 2008			Собствено проучване, 2018		
		Ниска експресия	Висока експресия	p	Ниска експресия	Висока експресия	p
Пол	мъж	6 (35,3%)	11 (64,7%)	0,17	3 (50,0%)	3 (50,0%)	0,389
	жена	10 (17,5%)	47 (82,5%)		21 (35,6%)	38 (64,4%)	
Възраст	mean±SD	40,8±18,0	49,8±16,7	0,09	47,3±11,8	51,3±16,1	0,282
Хистологична диагноза	ПК	11 (19,6%)	45 (80,4%)	0,12	2 (20,0%)	8 (80,0%)	0,009
	ФВПК	-	-		1 (6,7%)	14 (93,3%)	
	ФК	7 (38,9%)	11 (61,1%)		6 (60,0%)	4 (40,0%)	
	ОК	-	-		2 (40,0%)	3 (60,0%)	
	ФА	-	-		10 (66,7%)	5 (33,3%)	
	ОА	-	-		3 (30,0%)	7 (70,0%)	
Размер (см)	mean±SD	3,4±1,9	2,9±1,5	0,31	1,9±1,2	1,6±0,9	0,165
Фон	НС	-	-	-	18 (47,4%)	20 (52,6%)	0,106
	ЛТ	-	-		3 (27,3%)	8 (72,7%)	
	ТХ	-	-		3 (18,8%)	13 (81,2%)	

На таблица 17 е представена връзката между експресията на Bax и клинико-морфологичните показатели. Резултатите от настоящото изследване са сравнени с данните от други изследвания (Martinez-Brocca et al., 2008). За сравнителния анализ, ние подобно на Martinez-Brocca et al. (2008) разделихме туморите и нетуморните заболявания на лезии с ниска или висока експресия на Bax. Граничната стойност, над която експресията се оцени като висока, е 25%. При позитивна реакция в повече от 25% от изследваните клетки, експресията е висока, а при позитивна реакция в по-малко или равно на 25% от клетките тя е ниска.

Не беше намерена съществена разлика в експресията на Bax според пола на изследваните лица. Разлика не беше установена и по отношение на възрастовия показател, въпреки че в групата на пациентите с ниска експресия на Bax възрастта е по-ниска.

В зависимост от хистологичната диагноза се установи съществена разлика при пациентите с ниска и висока експресия на Bax (p=0,009). Пациентите с ПК, ФВПК, ОК и ОА имат предимно висока експресия на антитялото. Между хистологичния вид на тумора и експресията на Bax е намерена умерена зависимост (ρ=0,496; p<0,01). Аденомите имат по-ниска експресия на антитялото в сравнение с карциномите.

При изследване на връзката между експресията на Bax и фоновото заболяване не беше установена съществена разлика.



Фигура 36. *Сравнителен анализ на експресията на Bax при карциноми, аденоми и нетуморна тъкан (в % позитивни клетки)*

На фигура 36 е представен сравнителният анализ на експресията на Bax в обобщен вид. В настоящото изследване е установена съществена разлика в средната стойност на експресията на Bax между карциномите и аденомите (средните стойности са съответно 58,83% и 38,29%, p<0,01). Подобна зависимост се установи между

карциномите и нетуморната тъкан (средните стойности са съответно 58,83% и 13,5%; p<0,001). Разлика има и между експресията на Bax при аденомите и нетуморната тъкан (средните стойности са съответно 38,29% и 13,5%; p<0,001).

Получените от нас резултатите показват, че експресията на Bax има висока чувствителност (87,50%) спрямо точното диагностициране на заболяването на пациентите, но има ниска специфичност (48,00%), т.е. не в възможно на базата на експресия на антитялото категорично да се разграничат карциномите от аденомите. Позитивната и негативната предиктивна стойност показват, че маркерът е точен в над 70% от случаите. Можем да твърдим, че Bax има висока диагностична точност по отношение на карциномите и аденомите (72,30%).

Експресията на Bax има висока чувствителност и специфичност (съответно 87,50% и 70,0%) спрямо точното диагностициране и разграничаване на пациентите с нетуморни заболявания и малигнени тумори. Позитивната и негативната предиктивна стойност показват, че маркерът е точен в малко над половината от случаите. При разграничаването на нетуморните заболявания и малигнените тумори Bax има висока диагностична точност (84,0%).

От гледна точка на разграничаването на ФВПК от ФА, Bax показва висока ефективност, като чувствителността на маркера е 93,3%, а позитивната и негативна предиктивна стойност са съответно 73,7% и 90,9%, което означава, че антитялото визуализира значително голям брой туморни заболявания. От друга страна маркерът се характеризира и с висока диагностична точност (80,0%).

Подобни резултати се отчитат и при изследване на ефективността на Bax относно разграничаването на ПК от ФК, където се отчитат високи стойности на чувствителност (93,30%), позитивна (77,70%) и негативна (85,70%) предиктивна стойност и диагностична точност (80,0%).

При изследване на връзката между експресията на Bax и CD34 се установи обратно пропорционална слаба към умерена зависимост (r=0.292; p=0.018). Между експресията на Bax и CK19 установихме умерена правопропорционална зависимост (r=0.440; p<0.001). На табл. 18, 19, 20 е представена общата диагностична точност на двата маркера (дифузна експресия на CK19 и Bax едновременно) при разграничаване на: бенигнени от малигнени тумори; ПКФВ от ФА; ПКФВ от ФК (положителна предиктивна стойност (ППС), негативна предиктивна стойност (ОПС), чувствителност (Ч), специфичност (Сп), диагностична точност (ДТ)).

Таблица 18. *Общата диагностична точност на CK19 и Bax при разграничаване на бенигнени от малигнени тумори.*

	Ч(%)	**Сп(%)**	**ППС(%)**	**НПС(%)**	**ДТ(%)**
Коекспресия CK19 и Bax	50	100	100	56	69

Таблица 19. *Общата диагностична точност на CK19 и Bax при разграничаване на ФВПК от ФА.*

	Ч(%)	**Сп(%)**	**ППС(%)**	**НПС(%)**	**ДТ(%)**
Коекспресия CK19 и Bax	80	100	100	77	88

Таблица 20. *Общата диагностична точност на CK19 и Bax при разграничаване на ФВПК от ФК.*

	Ч(%)	**Сп(%)**	**ППС(%)**	**НПС(%)**	**ДТ(%)**
Коекспресия CK19 и Bax	80	100	100	77	88

Използването на комбинацията **CK19 и Bax** за разграничаване на фоликуларен вариант на папиларен карцином от фоликуларен карцином и от фоликуларен аденом показва, че специфичността на маркерите при тези случаи е 100%. Ако двата маркера са негативни едновременно или присъстват само фокално в туморната тъкан, лезията не е папиларен карцином. С помощта на тази комбинация не могат да бъдат разграничени ФК от ФА.

Балансът между клетъчна пролиферация и клетъчна смърт е от решаващо значение за развитието и поддържането на тъканите в човешкото тяло (Liu Z et al., 2016). Смята се, че неспособността на клетките да претърпят програмирана клетъчна смърт – апоптоза, в отговор на различни стимули (генетични увреждания от радиация, лекарства и токсини), лежи в основата на туморогенезата и прогресията на малигнените процеси (Hassan M et al., 2014). Апоптозата се регулира от специфични гени и сигнални каскади, участват различни протеини – проапоптотични и антиапоптотични (Liu Z et al., 2016). След сигнал за настъпила необратима клетъчна увреда, цитозолният протеин Bax се разполага в митохондриите, където става част от интегралните мембранни протеини. Повишената експресия на Bax повишава пермеабилитетът на митохондриалната мембрана, при което се освобождава цитохром “C”. Последният, след серия от реакции, активира каспазната каскада (група от ензими, наречени каспази), като резултатът е елиминиране на увредената клетка (Liu Z et al., 2016).

При туморите на щитовидната жлеза, ролята на Bax е слабо проучена и данните от литературата са противоречиви.

При изследване на експресията на проапоптотичния протеин Bax при тумори на щитовидната жлеза, ние установихме висока експресия на антитялото при папиларни карциноми. Тези резултати се различават от данните на други автори, които установяват ниски нива на експресия на маркера при различни нетиреоидни карциноми (Liu Z et al., 2016). Получените от нас резултати са в съответствие със сравнително

малко на брой проучвания на апоптотични протеини при щитовидни тумори. Данните от литературата показват липса на Bax експресия в нетуморна щитовидна тъкан и позитивна реакция в туморите (Hermann S et al., 2001; Haynik DM et al., 2006; Martinez-Brocca MA et al., 2008). M. Martinez-Brocca et al. (2008) не установяват разлика в експресията на Bax между ПК и ФК. Те намират висока експресия на изследвания апоптотичен протеин и при двата тумора. При сравнителния анализ на резултатите от настоящото изследване с тези на M. Martinez-Brocca et al. (2008) се установи, че при двете изследвания експресията на Bax при ПК е висока. При ФК, резултатите получени от нас, показват ниска експресия в по-голямата част от случаите, за разлика от другото изследване, при което стойностите са високи (таблица 17).

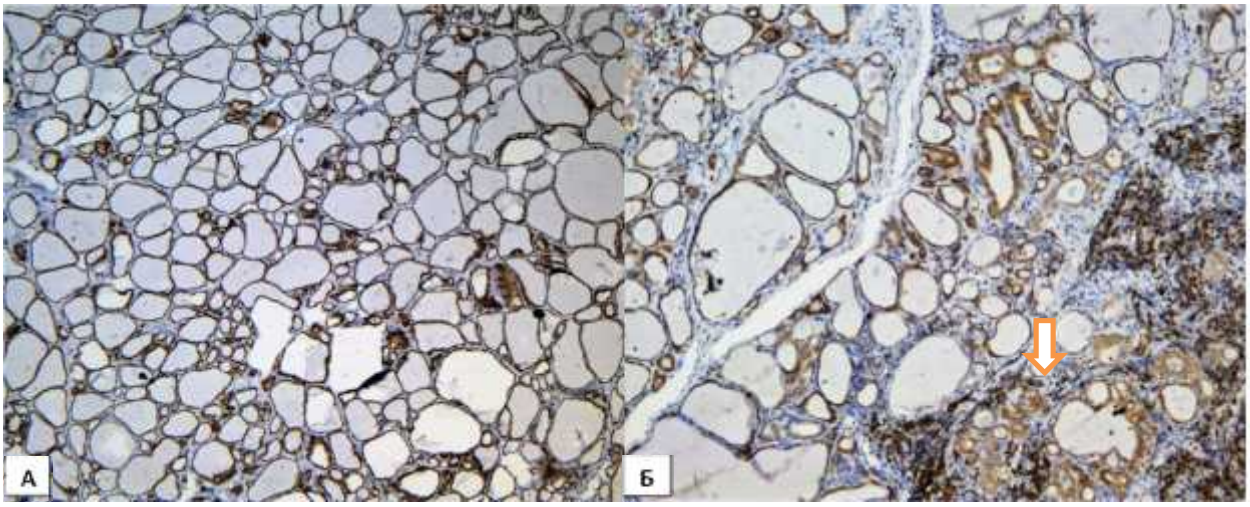
Анализът на двата протеина: Bax и CK19, показа умерена правопропорционална зависимост между експресията на Bax и CK19. По време на апоптоза, епителните клетки са подложени на медиирана от каспазите протеолиза (Liu Z et al., 2016). CK19, който се експресира в туморните клетки на различни карциноми, се разгражда от каспаза-3. Получените разтворими фрагменти могат да бъдат установени при пациенти с туморно заболяване, в това число и при пациентите с карциноми на щитовидната жлеза. Експресията на двата маркера е слаба или липсва в нетуморна тъкан, и единствено при папиларни карциноми експресията е дифузна. Bax подобно на CK19 се експресира дифузно в онкоцити при тиреоидит, но експсресията му в онкоцитарни тумори е фокална. Друго потвърждение, че метаплазиралите клетки се различават имунофенотипно от туморните онкоцити, въпреки че са с еднаква морфология на H&E.

Според нас, папиларните карциноми на щитовидната жлеза, поради дифузната експресия на Bax, придобиват проапоптотичен фенотип, което обяснява сравнително добрата прогноза при тези тумори. Данните от литературата показват, че липсата на Bax експресия в туморните клетки се асоциира с намален отговор на химиотерапевтични агенти, и намалена преживяемост на пациентите (Hassan M et al., 2014). Смята се, че Bax негативните тумори избягват апоптозата и в резултат имат по-интензивен растеж и прогресия, спрямо Bax-позитивните неоплазми. Експресията на Bax в щитовидните карциноми може да обясни и добрият отговор на лъчетерапия при тези пациенти. Различни медикаменти, които предизвикват апоптоза на туморните клетки, действат с участието на проапоптотичния протеин Bax (Liu Z et al., 2016). Нещо повече, ние определихме диагностичната точност на маркера при разграничаване на различни лезии, както самостоятелно, така и в комбинация с CK19. Bax се оказва подходящ имунохистохимичен маркер за разграничаване на някои тумори на щитовидната жлеза.

4.6. Експресия на Bcl-2 при туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза

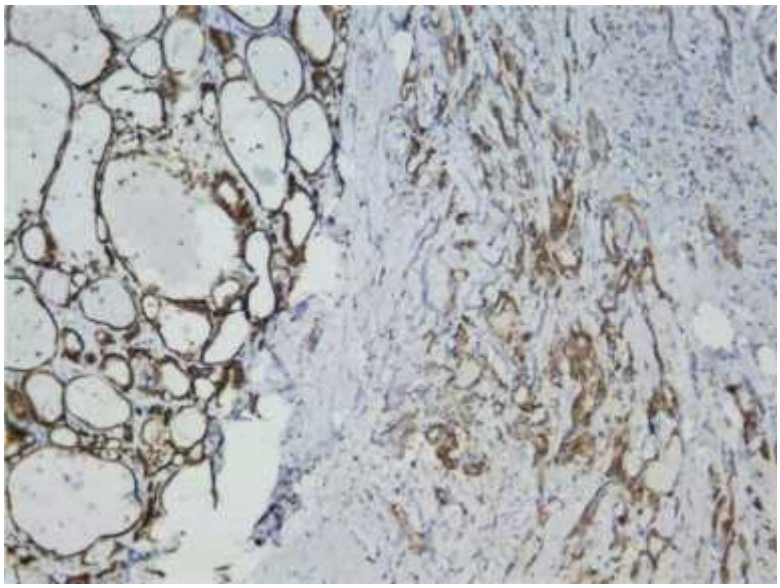
Bcl-2 се експресира в цитоплазмата на фоликуларния епител на щитовидната жлеза в нормална тиреоидна тъкан и нодозна струма. При двата случая експресията на антитялото е дифузна и интензивна (Фигура 37–А, Б). Подобна експресия се наблюдава

при случаите с хроничен лимфоцитарен тиреоидит. Изключение правят клетките с онкоцитарна метаплазия – те са по-слабо оцветени от маркера (Фигура 37Б).

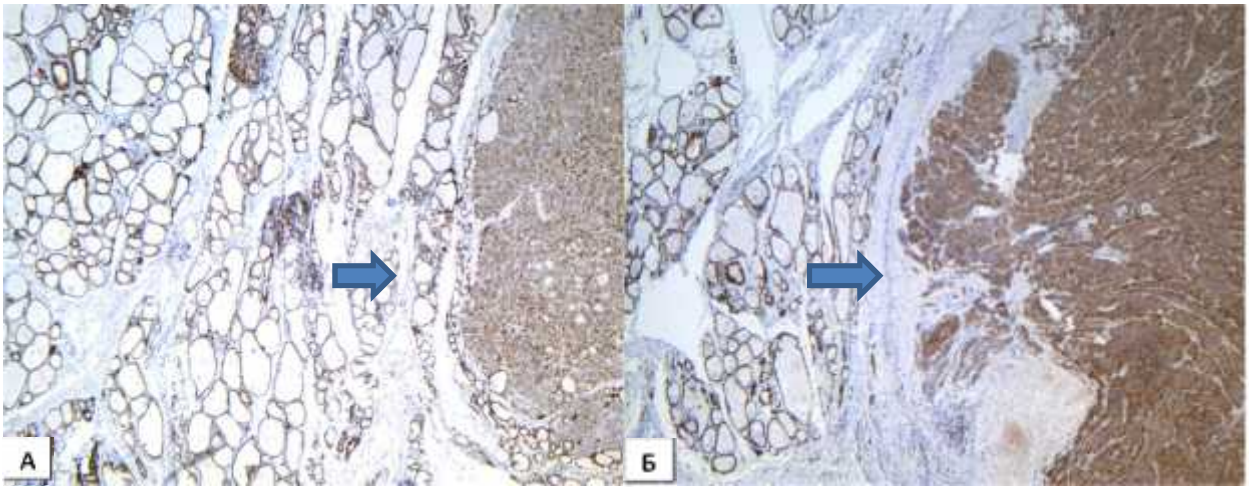


Фигура 37. *А- експресия на Bcl-2 във фоликуларен епител при нодозна струма (интензивна реакция, увеличение х40); Б - експресия на Bcl-2 във онкоцити при тиреоидит на Хашимото (умерена по интензитет реакция – стрелка, х100).*

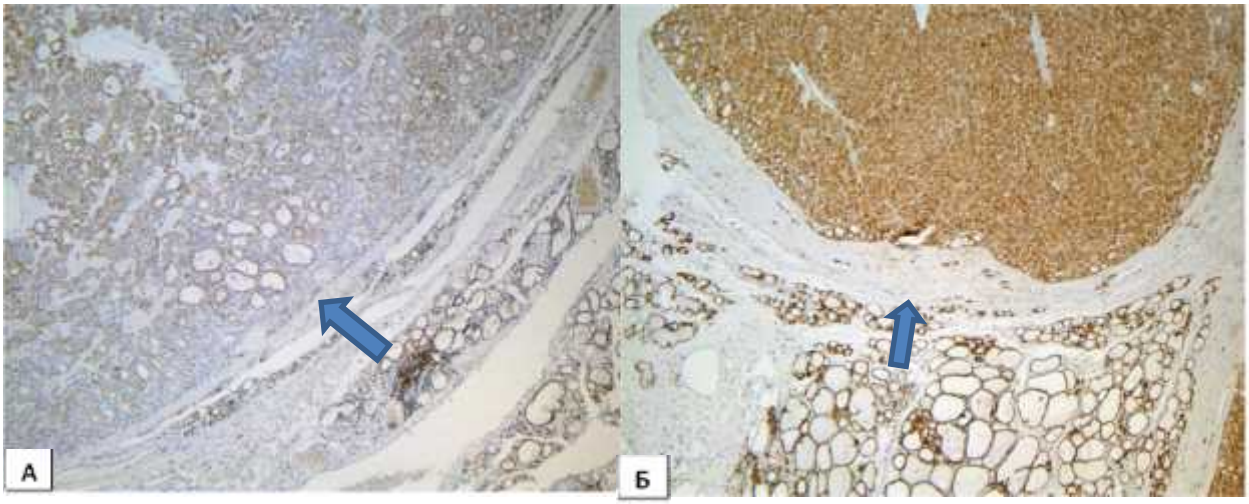
Експресията на Bcl-2 в туморите на щитовидната жлеза е дифузна или фокална, като интензивността на реакцията е умерена или липсва позитивност. Папиларните карциноми показаха умерена и дифузна реакция (Фигура 38). Фоликуларните карциноми и онкоцитарите тумори (аденоми и карциноми) имат умерена експресия на Bcl-2, която е предимно дифузна (Фигура 39 – А, Б). При фоликуларните аденоми в половината от случаите експресията на Bcl-2 е дифузна и умерена по интензивност (Фигура 40 – А, Б).



Фигура 38. *Експресия на Bcl-2 при папиларен карцином – интензивна реакция вляво,в нетуморната тъкан (в случая нодозна струма); умерена по интензивност реакция вдясно, в туморните клетки, увеличение х100.*

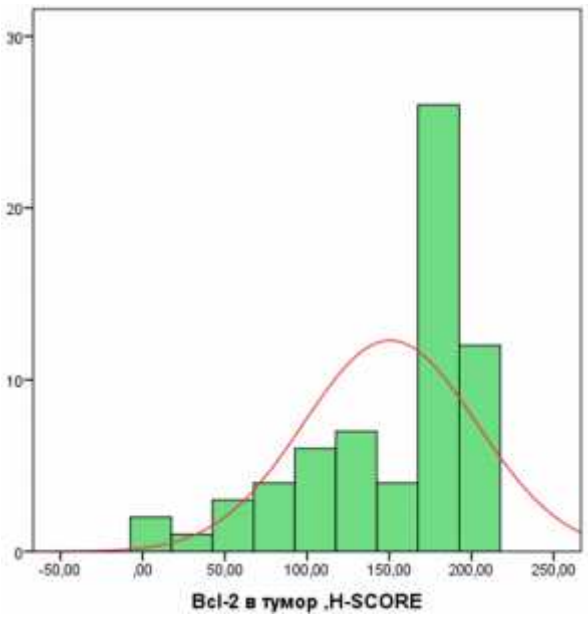


***Фигура 39**. А - Експресия на Bcl-2 при фоликуларен карцином (стрелка) – умерена по интензивност реакция, увеличение х40; Б - Експресия на Bcl-2 при онкоцитарен карцином (стрелка) – умерена по интензивност реакция, увеличение х40.*

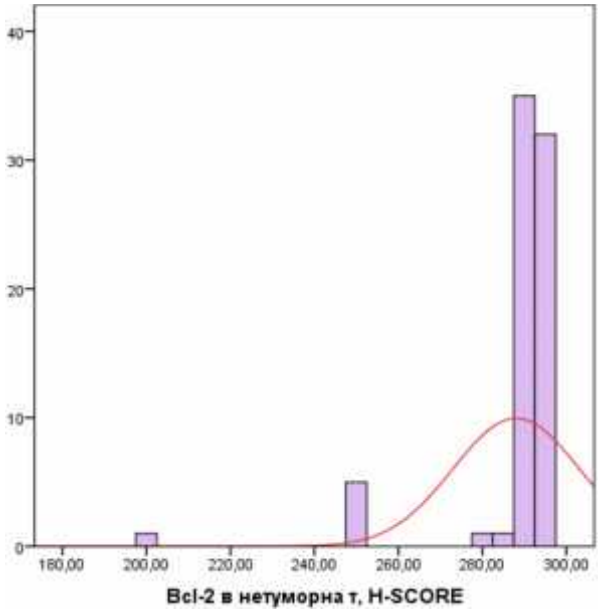


***Фигура 40**. А - Експресия на Bcl-2 при фоликуларен аденом (стрелка) – умерена по интензивност реакция, увеличение х40; Б - Експресия на Bcl-2 при онкоцитарен аденом (стрелка) – умерена по интензивност реакция, увеличение х40.*

На фигура 41 е представено разпределението на процента позитивни в туморната тъкан Bcl-2 клетки, умножен по съответния интензитет (H-Score). Средната стойност на H-score на Bcl-2 е 150,54±52,75, като минималната е 5 (1,50 %), а максималната е 205 (4,60 %). На фигура 42 е представен H-Score на Bcl-2 в нетуморна тъкан, т.е. в околния на туморите паренхим), като средната стойност е 288,07±15,04, минималната е 200 (1,30 %), а максималната е 295 (42,70 %). При сравнителния анализ на експресията на Bcl-2 в околния на туморите паренхим с контролната група нетуморни заболявания (n=10), не се установи статистически значима разлика в експресията ($p>0,05$).

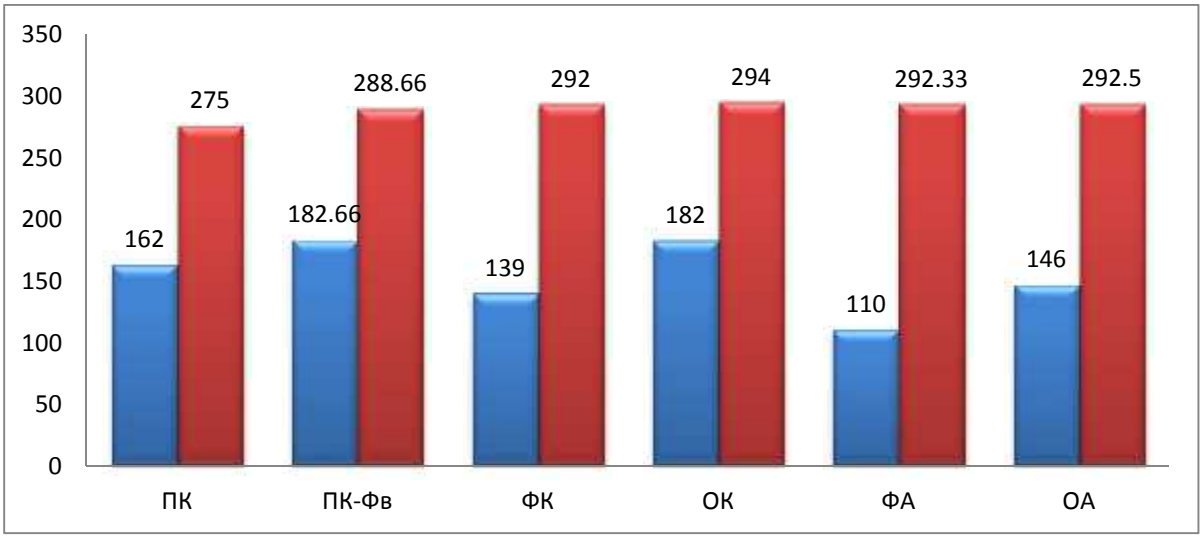


Фигура 41. *H-Score на експресията на Bcl-2 в тумори.*



Фигура 42. *H-Score на експресията на Bcl-2 в нетуморна тъкан.*

В настоящото изследване при сравняване на средната стойност на H-Score за Bcl-2 в туморна и нетуморна тъкан беше установена съществена разлика ($p<0,05$). Стойностите на H-Score в нетуморната тъкан са значително по-високи, като в 89,70% от случаите беше установен H-Score над 290.

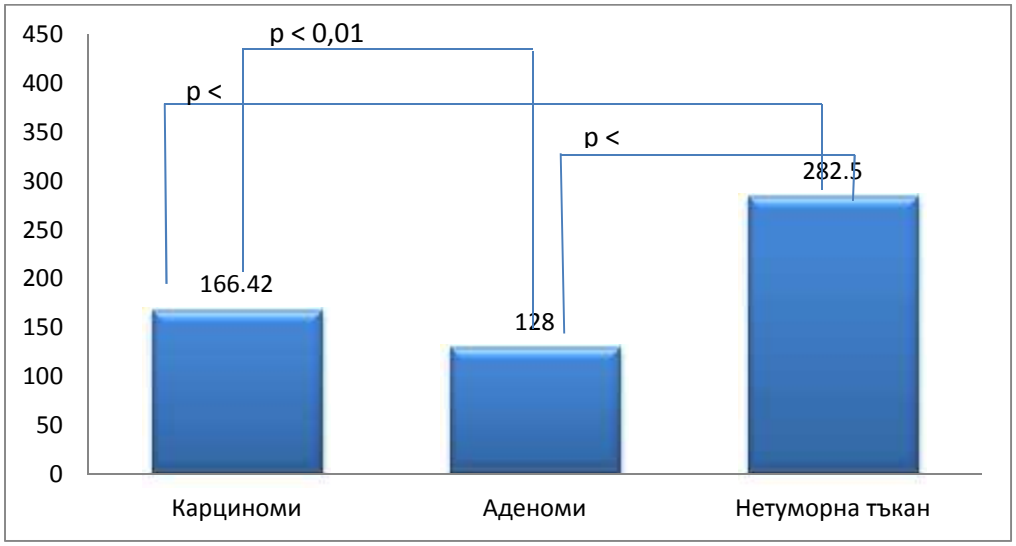


Фигура 43. *Средна стойност на H-Score на експресията на Bcl-2 в туморите на щитовидната жлеза (син цвят), както и в околния им паренхим (червен цвят).*

На фигура 43 е представен сравнителният анализ на стойностите на H-Score при различните тумори на щитовидната жлеза и околния им паренхим. Получените от нас резултати показват сигнификантна разлика между H-Score на различните тумори ($F=4,47$; $p=0,002$), както и между H-Score в туморната тъкан и околния паренхим

(p<0,001). Най-висока стойност на H-Score в туморна тъкан е установена в групата на фоликуларния вариант на папиларните карциноми (182,66). Най-ниска стойност е отчетена при фоликуларните аденоми (110,00). Експресията на Bcl-2 в околния паренхим е значително по-висока, отколкото в туморната тъкан, като най-високи стойности на H-score в околния паренхим се установяват при онкоцитарните карциноми (294) и най-ниски при папиларните карциноми (275) (F=2,29; p=0,044).

На фигура 44 е представен в обобщен вид сравнителният анализ на H-Score за Bcl-2 при изследваните карциноми, аденоми и нетуморната тъкан. Съществена разлика е установена между средната стойност на H-Score при карциномите и аденомите (съответно 166,42 и 128, p<0,01). Статистически значима е и разликата между карциномите и нетуморната тъкан (съответно 166,42 и 282,5; p<0,001). Разлика е открита между експресията на Bcl-2 при аденомите и нетуморната тъкан (съответно 128 и 282,5; p<0,001).



Фигура 44. *Сравнителен анализ на експресията на Bcl-2 при карциноми, аденоми и нетуморна тъкан (H-Score).*

Зависимост между експресията на Bcl-2 и клинико-морфологичните показатело като възраст, размер на тумора и фоново заболяване не се установи (p>0,01).

Правопропорционална и умерена зависимост се установи между експресията на Bcl-2 и относителният дял на позитивните клетки за CK19 (r=0.391; p=0.001). В 15,30% от случаите промените в експресията на Bcl-2 са асоциирани с изменения в относителният дял на позитивните клетки за CK19.

Умерена правопропорционална зависимост е установена между експресията на Bcl-2 и Bax (r=0.406; p=0.001). В 16,50% от случаите промените в експресията на Bcl-2 са асоциирани с изменения в експресията на Bax.

По отношение експресията на Bcl-2, резултати, подобни на получените от нас, са установени и от други автори (Mitselou A et al., 2004; Haynik DM et al., 2006). A Mitselou et al. (2004) изследват експресията на антитялото при папиларни карциноми и подобно на нас откриват по-висока експресия на Bcl-2 в нормалния тиреоиден

паренхим и нодозна струма, в сравнение с туморния паренхим. DM Haynik et al. (2006) изследват фоликуларни карциноми и установяват експресия на Bcl-2 в нормална щитовидна тъкан и липса на експресия при 63% от изследваните неоплазми. Авторите стигат до извода, че негативната експресия на Bcl-2 в туморните клетки корелира с по-висок риск от рецидив и по-висока смъртност на пациентите. За разлика от нас, C Shanone et al. (2015) намират интензивна експресия на Bcl-2 при папиларния карцином. При останалите хистологични варианти, подобно на нас, те откриват умерена интензивност при фоликуларните карциноми и фокална, умерена до ниска експресия при фоликуларните аденоми. В настоящото изследване експресията на маркера е силна (интензивно цитоплазмено оцветяване) само в случаите с нетуморни заболявания. За разлика от нас, C Shanone et al. не откриват експресия на Bcl-2 във фоликуларния епител в случаите с нодозна струма. В проучването си M Aksoy et al. (2005) установяват, че Bcl-2 се експресира в 96.7% от случаите в нормална щитовидна жлеза, докато при папиларни карциноми експресията е в 86.6% от случаите. Ние, подобно на тях, открихме по-ниска експресия на протеина в туморната в сравнение с нетуморната тъкан. Според M Aksoy et al. (2005) при папиларен карцином туморните клетки придобиват проапоптотичен фенотип, защото експресията на антиапоптотичния Bcl-2 протеин е по-слабо изразена.

A Gupta et al. (2016) определят експресия на Bcl-2 при различни хистологични варианти на тиреоиден карцином чрез определяне на H-score. Те установяват по-висока стойност на H-score при папиларен карцином, в сравнение с фоликуларен карцином. За разлика от нас, при тях H-score в папиларните карциноми е с по-ниска стойност. Те изследват медуларни карциноми, които също експресират маркера, и анапластични карциноми, при които експресията е значително по-ниска в сравнение с другите изследвани тумори. Авторите стигат до заключението, че експресията на Bcl-2 корелира с диференциацията на туморите и антиапоптотичният протеин участва в канцерогенезата. В изследването на C Shanone et al. (2015) средната стойност на H-score за папиларен карцином е най-висока - 140, за фоликуларен вариант на папиларен карцином е по-ниска – 90. При нас стойностите на H-score за папиларен карцином и фоликуларен вариант на папиларен карцином са по-високи, като разликата между тях не е сигнификантна (Фигура 43).

Правопропорционална умерена зависимост беше намерена между експресията на Bcl-2 и Bax Двата протеина са част от голямата група протеини, регулиращи апоптозата. При настоящото изследване се установи, че проапоптотичният протеин Bax липсва в нетуморния фоликуларен епител на щитовидна жлеза, докато антиапоптотичният протеин Bcl-2 се експресира от тиреоцитите. Ние предполагаме, че в нормалната щитовидна тъкан, нодозна струма и лимфоцитарен тиреоидит, високата експресия на Bcl-2 инхибира апоптозата. Участъците с онкоцитарна метаплазия в нашия анализ показаха поява на Bax протеин и намаляване интензивността на реакцията за Bcl-2 в същите клетки. По отношение на туморите на щитовидната жлеза, папиларните карциноми показват намаляване на Bcl-2 експресията в туморните клетки, в сравнение с нетуморния околен паренхим, и съответно, повишаване на Bax експресията спрямо нетуморната тъкан. В този случай, можем да твърдим, че при папиларни карциноми – класически и фоликуларен вариант преобладава

проапоптотичният фенотип, което е установено и от други автори (Aksoy M et al., 2005). Фоликуларните и онкоцитарите карциноми показват умерена експресия на Bcl-2, предимно дифузна, но от друга страна слаба към умерена фокална/липсваща експресия на Bax – при тези тумори превалират антиапоптотичните протеини. При онкоцитарните аденоми експресията на Bcl-2 е предимно дифузна и умерена по интезнзитет, но в половината от случаите bax също е с дифузна и умерена експресия. При фоликуларните аденоми в половината от случаите експресията на Bcl-2 е дифузна и умерена по интезнзитет, а Bax е предимно със слаба фокална или липсваща експресия.

Експресията на апоптотични протеини все още е обект на изследване при щитовидни тумори, доброкачествени и злокачествени. Bcl-2 и Bax могат да се окажат подходящи при разграничаването на тиреоидните лезии и в търсенето на терапевтични подходи (Farid P et al., 2001; Mitsiades C et al., 2007). Високата експресия на Bcl-2 протеина в туморните клетки при различни малигнени неоплазми се свързва с резистентност на химиотерапевични агенти (Martinez-Brocca MA et al., 2008). От друга страна, липсата на експресия на Bax в туморните клетки се асоциира с намален отговор на химиотерапевтични агенти и намалена преживяемост (Liu Z et al., 2016).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можем да обобщим, че женският пол преобладава при всички групи заболявания на щитовидната жлеза и е рисков фактор за появата на карцином на тиреоидеята.

Карциномите на щитовидната жлеза се срещат най-често при жени на възраст между 31 и 40 години, често са на фона на ХЛТ и в болшинството от случаите това е тиреоидит на Хашимото. Най-честият хистологичен вариант на тиреоидния карцином е папиларният карцином и клинико-морфологичните характеристики на карцинома са: малкия размер (до 2 см), централните калцификати и фиброзните промени в стромата, инвазията на капсулата и честата липса на колоид.

Аденомите се срещат предимно във възрастта между 41 и 50 години. Подобно на карциномите, често са на фона на ХЛТ, но асоциация с тиреоидит на Хашимото не се открива. Най-честият хистологичен вариант на аденома е фоликуларният аденом. Клинико-морфологичните черти, характеризиращи аденомите са: по-големите размери (над 2см) в сравнение с карциномите, калцификати в капсулата (т.е. периферна локализация), интактната капсула и присъствието на колоид.

Туморите на щитовидната жлеза, освен морфологично се различават и имунофенотипно. Най-честият карцином, а именно папиларният карцином, има имунохистохимичен профил, различен от останалите хистологични варианти по отношение експресията на CK19, Bax и MBП. Установеният имунофенотип може да се има предвид в диференциално диагностичния план на тиреоидните неоплазми и по-добрата прогноза при тези пациенти поне отчасти може да е асоциирана с имунофенотипа. Околният на туморите паренхим и нетуморните заболявания (НС и ХЛТ) са с различен имунофенотип от туморните заболявания. Неоплазмите на щитовидната жлеза показват различни нива на експресия на апоптотичните протеини: Bax и Bcl-2. Необходими са нови изследвания с цел определяне влиянието на тези и

други протеини, участващи не само в процесите на апоптоза, но и при други форми на клетъчна смърт.

VI. ИЗВОДИ

1. Хроничният лимфоцитарен тиреоидит корелира с малък размер на карциномите и с липса на метастази.
2. Фиброзните промени и калцификатите в стромата на карциномите се асоциират с метастази в регионалните лимфни възли.
3. **CK19** се експресира интензивно и дифузно при класическия и фоликуларен папиларен карцином, докато при фоликуларния и онкоцитарен карцином липсва експресия или тя е фокална.
4. **МВП** е най-ниска при класическия и фоликуларен папиларен карцином и е тип мрежа „сито“. Васкуларната плътност при фоликуларния и онкоцитарен карцином е по-голяма в сравнение с папиларния карцином и в стромата присъстват и големи дебелостенни съдове. При фоликуларния и онкоцитарен аденом МВП е по-изразена в сравнение с папиларния карцином, тя е мрежа тип „цвете“ и субкапсуларно се откриват големи тънкостенни съдове.
5. **Bax** се експресира дифузно с умерен интензитет при класическия и фоликуларен папиларен карцином и в зони с онкоцитарна метаплазия. Фоликуларните и онкоцитарни аденоми и карциноми показват фокална експресия на Bax протеин или са негативни.
6. **Bax** протеин не се открива в тиреоцитите при нодозна струма и в нормална щитовидна тъкан.
7. Всички тумори, независимо от хистологичния им вариант експресират **Bcl-2** умерено и дифузно. Нетуморните заболявания на щитовидната жлеза показват интензивна и дифузна експресия на **Bcl-2** със слаба позитивност в зоните с онкоцитна метаплазия**.**
8. **Онкоцитите при ТХ** се различават имунофенотипно от неопластичните клетки при онкоцитарните тумори и наподобяват повече на туморните клетки при папиларен карцином.
9. **Намаляването на МВП в туморите се свързва с повишена експресия на проапоптотичния протеин Bax**. Промените в апоптотичните протеини в туморните клетки (Bax/Bcl-2) се променят заедно с нивата на CK19.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

<u>Научни приноси с оригинален характер:</u>

1. Осъществена е комплексна морфологична и имунохистохимична оценка на туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза.
2. Извършен е сравнителен и обобщен анализ на процесите на апоптоза, васкуларизация и експресия на CK19 при доброкачествени и малигнени неоплазми на щитовидната жлеза

Научни приноси с приложен характер:

1. Потвърдена е връзката между морфологичните промени в съседната на тумора тъкан и карцинома на щитовидната жлеза.

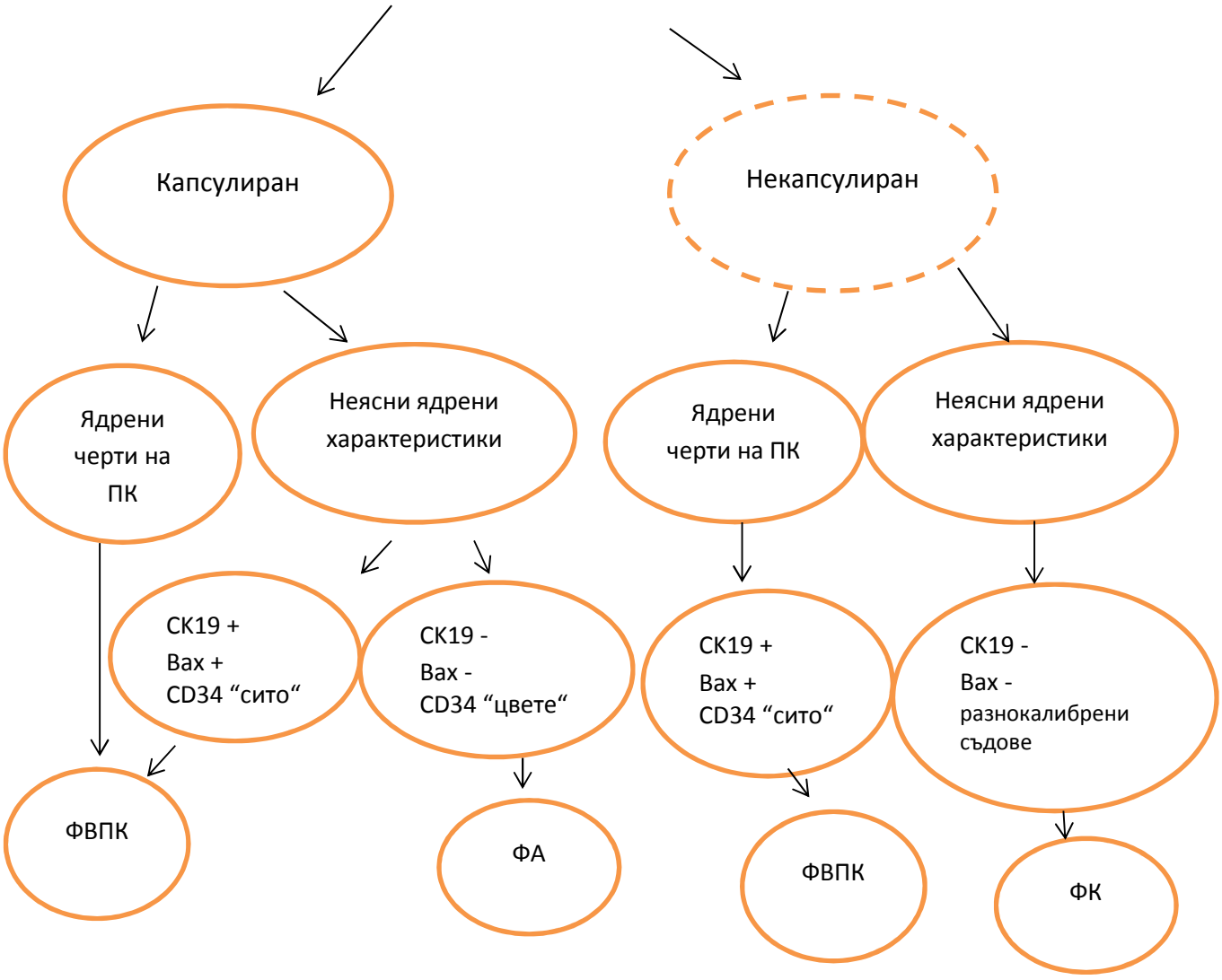
2. Оценена е диагностичната стойност на фиброзните промени и калцификати в туморната строма.

3. Доказана е потенциалната прогностична стойност на промените в стромата при тиреоидни карциноми.

4. Оценена е диагностичната стойност на CK19, микроваскуларната плътност и апоптозата при различни доброкачествени и малигнени неоплазми на шитовидната жлеза.

5. Създаден е диагностичен алгоритъм за тумори на щитовидната жлеза с фоликуларен строеж (Фигура 45).

Тумор с фоликуларен строеж



Фигура 45. Диагностичен алгоритъм за тумори на щитовидната желза с фоликуларен строеж.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации:

1. **D. Malinova**, M. Tzaneva. Angiogenesis and CK19 expression in papillary thyroid carcinoma. Trakia Journal of Sciences, Vol. 13, Suppl. 2, 2015, 147-150.
2. **D. Malinova**, N. Stefanova, S. Spasova, M Siderova. Bcl-2 and bax expression in papillary thyroid carcinoma. Наука и младост, Сборник с научни съобщения от конкурсни сесии 2016 г, 305-308.
3. **Доротея Малинова**, Мира Сидерова. Морфологична характеристика на туморите на щитовидна жлеза. Медпост, Ендокринология, брой 22 март/април 2017: 50- 53.

Участия в научни форуми и срещи:

1. D. Malinova, M. Tzaneva. Angiogenesis and CK19 expression in papillary thyroid carcinoma, Юбилейната научна конференция "20 години Тракийски университет", 19 май 2015 г, гр. Стара Загора.

2. D. Malinova, N. Stefanova, S. Spasova. Bcl-2 and bax expression in papillary thyroid carcinoma, Конкурс Наука и младост 12-14 май, 2016 година, град Пловдив.

3. Д-р К. Маринова, **д-р Д. Малинова**. „Заболеваемост от тиреоиден карцином'' Варненски ендокринни дни, ноември 2014 г.

Изказвам сърдечни благодарности на:

- *Научния си ръководител проф. д-р Мария Цанева, за ценните идеи, напътствия и търпение по време на разработването на дисертационния труд.*
- *На проф. д-р Петър Генев, за това, че ме насочи към патологията на щитовидната жлеза и за вярата в професионалните ми качества.*
- *На проф. Радина Иванова, за полезните съвети по оформянето на дисертационния труд.*
- *На доц. Екатерина Софтова, проф. Кирил Христозов и доц. Мира Сидерова за подкрепата и колегиалното отношение.*
- *На колегите ми лекари от клиниката по Обща и клинична патология за отзивчивостта и безусловната подкрепа, както и на Велина Кеновска – лаборант в клиниката, изработил препаратите.*
- *На Валентина Великова за помощта при статистическата обработка на данните.*
- *На семейството и приятелите ми за безусловната подкрепа, обич и разбиране.*

Thesis abstract

Doroteya Vasileva Malinova

Accurate diagnosis of thyroid tumors is critical to treatment. It requires knowledge of the specific morphological features of each thyroid neoplasm, as well as appropriate diagnostic criteria.

Identification of new molecular biomarkers in thyroid carcinoma in combination with morphological characteristics ensures improvement of diagnostic accuracy and prognosis in patients.

The aim of this study is to investigate the diagnostic and prognostic value of morphological characteristics and immunohistochemical expression of cytoskeleton protein CK19, vascular endothelial marker CD34, proapoptotic Bax protein and anti-apoptotic Bcl-2 protein in benign and malignant thyroid tumors.

In the present study, we included three groups of patients: 607 non-selected patients with non-tumor and tumor thyroid diseases; 122 selected patients with benign and malignant thyroid tumors; 75 selected patients for immunohistochemical analysis: 65 patients with and 10 without thyroid tumors. Tumors were diagnosed according to the latest 2017 WHO (World Health Organization) classification. The obtained results were statistically processed.

We have obtained the following results: Chronic lymphocytic thyroiditis correlates with small size of carcinomas and lack of regional lymph nodes metastasis. Fibrotic changes and calcifications in the stroma are associated with metastasis in regional lymph nodes. Thyroid tumors differ morphologically as well as immunophenotypically. The most common thyroid carcinoma, papillary carcinoma, has an immunohistochemical profile, which is different from other histological variants regarding CK19, Bax and MVD (microvascular density). The established immunophenotype may be considered in the differential diagnosis of thyroid neoplasms and the better prognosis in these patients may at least partially be associated with the immunophenotype. Oncocytes in Hashimoto’s thyroiditis differ immunophenotypically from neoplastic cells in oncocytic neoplasms and resemble tumor cells in papillary carcinoma. Thyroid neoplasms show different levels of expression of apoptotic proteins: Bax and Bcl-2. New research is needed to determine the impact of these and other proteins involved in cell death.

Original scientific contributions: Complex morphological and immunohistochemical evaluation of tumor and non-tumor thyroid diseases was conducted. A comparative and summary analysis of the processes of apoptosis, vascularization and expression of CK19 in benign and malignant neoplasms of the thyroid gland was performed.

Applied scientific contributions: The relationship between morphological changes in the adjacent to the tumor tissue and thyroid carcinoma has been confirmed. The diagnostic value of fibrotic changes and calcifications in the tumor stroma has been assessed. The potential prognostic value of stromal changes in thyroid carcinomas has been demonstrated. The diagnostic value of CK19, microvascular density and apoptosis in various benign and malignant neoplasms of the thyroid gland was evaluated. A diagnostic algorithm for tumors with follicular growth pattern was developed based on the expression of CK19, Bax and MVD.