

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

**Studijní program: Biomedicína**

**Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka**



**MUDr. Jan Krátký**

**Tyreoidální autoimunita a elasticita tyreoidálních uzlů – vztah k jejich  
biologické povaze**

**Thyroid autoimmunity and thyroid nodule elasticity - relation to thyroid  
nodule biological nature**

**Dizertační práce**

**Školitel: doc. MUDr. Jan Jiskra, Ph.D**

**Školitel – konzultant: MUDr. Jindřich Lukáš, CSc.**

**Praha 2019**

## Obsah

1. Prohlášení o samostatném zpracování disertační práce .....	5
2. Identifikační záznam .....	6
3. Poděkování .....	7
4. Abstrakt .....	8
5. Abstract .....	9
6. Seznam použitých zkratk .....	10
7. Úvod .....	11
8. Tyreoidální malignity .....	13
8.1. Epidemiologie tyreoidálních malignit .....	13
8.2. Histopatologické typy tyreoidálních malignit .....	13
8.3. Diagnostika tyreoidálních karcinomů .....	16
8.4. Klasické B-mode sonografické rizikové faktory a jejich patofyziologický podklad .....	22
8.4.1. Velikost uzlu .....	22
8.4.2. Hypoechogenita a nepravidelný okraj uzlu .....	23
8.4.3. Kalcifikace .....	25
8.4.4. Vaskularizace uzlu .....	26
8.5. Molekulárně genetické pozadí tyreoidálního karcinomu .....	27
9. Elasticita tyreoidálních uzlů a možnosti jejího vyšetření (elastografie) .....	31
9.1. Elasticita nádorové tkáně .....	31
9.2. Elastografie .....	32
9.3. Analýza strain elastografie .....	34
9.4. Elastografie a tyreoidální uzly .....	35
10. Chronická lymfocytární tyreoiditida a tyreoidální karcinomy .....	37

10.1.	Chronická lymfocytární tyreoiditida a riziko karcinomu štítné žlázy .....	38
10.2.	Molekulárně-biologické pozadí vztahu PTC a CLT.....	39
11.	Cíle práce.....	41
12.	Hypotézy .....	42
13.	Metodika.....	43
13.1.	Výběr pacientů.....	43
13.1.1.	Skupina pacientů v práci “Vyšetření elasticity tyreoidálních uzlů” .....	43
13.1.1.	Skupina pacientů v práci Chronická lymfocytární tyreoiditida a riziko tyreoidálního karcinomu .....	44
13.2.	Ultrazvukové vyšetření a aspirační biopsie tenkou jehlou (FNAB).....	44
13.3.	Elastografie .....	45
13.3.1.	Kvalitativní hodnocení elasticity uzlu .....	46
13.3.2.	Semikvantitativní hodnocení elasticity uzlu (“strain ratio”) .....	47
13.4.	Hodnocení vztahu tyreoidální funkce a tyreoidálních autoprotilátek k riziku malignity uzlu.....	50
13.5.	Statistická analýza .....	50
14.	Vlastní výsledky.....	52
14.1.	Vyšetření elasticity tyreoidálních uzlů .....	52
14.2.	Chronická lymfocytární tyreoiditida a riziko tyreoidálního karcinomu .....	60
15.	Diskuze.....	68
15.1.	Elasticita tyreoidálních uzlů .....	68
15.2.	Chronická lymfocytární tyreoiditida a tyreoidální karcinom .....	72
15.3.	Vztah chronické lymfocytární tyreoiditidy k prognóze diferencovaného tyreoidálního karcinomu.....	75

16.	Závěr.....	77
17.	Literatura .....	79
18.	Seznam publikací autora .....	92
18.1.	Publikace s IF, které se zabývají problematikou dizertační práce.....	92
18.2.	Publikace s IF, které se nezabývají problematikou dizertační práce .....	92
18.3.	Publikace bez IF, které se zabývají problematikou dizertační práce.....	93

# **1. Prohlášení o samostatném zpracování disertační práce**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 21. 3. 2019

MUDr. Jan Krátký

## **2. Identifikační záznam**

KRÁTKÝ, Jan. Tyreoidální autoimunita a elasticita tyreoidálních uzlů – vztah k jejich biologické povaze. [Thyroid autoimmunity and thyroid nodule elasticity - relation to thyroid nodule biological nature]. Praha, 2018. 80 s., 0 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 3. interní klinika. Vedoucí práce Jiskra Jan

### 3. Poděkování

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu v biomedicíně na 3. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Poděkování patří především mému školiteli doc. MUDr. Janu Jiskrovi, Ph.D. za jeho vynikající odborné vedení v průběhu celého studia a všestrannou pomoc a podporu při tvorbě této dizertační práce. Dále bych rád poděkoval svému školiteli – konzultantovi MUDr. Jindřichu Lukášovi, CSc. za jeho pomoc a cenné připomínky během mého studia. V neposlední řadě bych chtěl rovněž poděkovat prof. MUDr. Štěpánu Svačinovi, DrSc., který mi jako přednosta III. interní kliniky 1. LF UK a VFN vytvořil optimální podmínky k postgraduálnímu studiu a také všem kolegům ze 3. interní kliniky, kteří mi předávali své cenné zkušenosti na poli klinické medicíny a vědeckého výzkumu.

## 4. Abstrakt

Tyreoidální uzly představují velmi častou patologii. S využitím moderních ultrazvukových přístrojů jejich prevalence dosahuje až 68 %. Nejzásadnějším úkolem je včasná detekce tyreoidálního karcinomu, který sice tvoří asi 5-15 % klinicky signifikantních uzlů, ale jeho incidence stále stoupá. Ani s využitím aspirační biopsie tenkou jehlou není vždy možné rozhodnout o biologické povaze uzlu. Velká část těchto pacientů je pak nucena podstoupit diagnostickou operaci štítné žlázy, která je spojena s riziky pro pacienta a zároveň s finančními náklady pro zdravotní systém. V posledních desetiletích je snaha o zlepšení neinvazivní diagnostiky biologické povahy tyreoidálních uzlů. Elasticita tyreoidálních uzlů stanovená pomocí elastografického vyšetření a přítomnost tyreoidální autoimunity patří mezi zkoumané rizikové parametry.

S využitím strain elastografie jsme v naší práci prokázali, že tyreoidální karcinomy mají signifikantně sníženou elasticitu v porovnání s benigními tyreoidálními uzly. Elastografie tyreoidálních uzlů může být využita jako vhodný doplněk konvenčního sonografického vyšetření. Kombinace obou vyšetření zvyšovala negativní prediktivní hodnotu v porovnání s konvenčním přístupem. Výsledky naší práce dále naznačují, že pro potřebu semikvantitativní analýzy elastografie tyreoidálních uzlů pomocí strain ratio, lze v případě absence normálního tyreoidálního parenchymu využít jako referenční oblast okolní krční svaly anebo průřez a. carotis communis.

Pozitivita antityreoidálních autoprotilátek (proti tyreoperoxidáze a tyreoglobulinu) byla v naší práci signifikantně asociovaná s maligní povahou uzlu. S využitím mnohočetné logistické regrese byla pozitivita protilátek proti tyreoperoxidáze identifikována jako nezávislý rizikový faktor tyreoidálního karcinomu. Naopak spontánní suprese TSH pod 0,5 mIU/l představovala protektivní faktor.

**Klíčová slova:** tyreoidální uzel, tyreoidální karcinom, elastografie, tyreoidální autoimunita



## 5. Abstract

Thyroid nodules represent a very common pathology. Using modern high-resolution ultrasound, nodules could be found in up to 68 % of patients. The most important task is the diagnosis of thyroid cancer which represents only about 5-15 % of nodules, however the incidence is still growing. Even with the use of a fine needle aspiration biopsy, it is not always possible to decide on the biological nature of the nodule. A significant proportion of such patients have to undergo thyroid surgery for diagnostic reason. Thyroid surgery is associated with risks to the patient and financial costs to the health-care system. In recent decades, the efforts to improve non-invasive diagnostics of thyroid nodules have been made. The thyroid elastography and thyroid autoimmunity are among the examined risk parameters.

Using real-time strain elastography, thyroid carcinomas elasticity has been significantly reduced compared to benign thyroid nodules in our group of patients. The elastography of thyroid nodules can be used as a suitable complement to conventional sonographic examination. In our work, the combination of both methods (conventional ultrasound and elastography) increased the negative predictive value compared to both methods individually. The results of our work further indicate that, in case of absence of normal thyroid parenchyma, the surrounding cervical muscles or the content of the carotid artery can be used as an alternative reference region for assessment of strain ratio.

The positivity of antithyroid antibodies (against thyroperoxidase or thyroglobulin) was significantly associated with the thyroid cancer. Using multiple logistic regression, the positivity of the anti-thyroperoxidase antibodies were identified as an independent risk factor for thyroid cancer. On the contrary, the spontaneous suppression of TSH below 0.5 mIU/l was a protective factor.

**Key words:** thyroid nodule, thyroid cancer, elastography, thyroid autoimmunity

## 6. Seznam použitých zkratek

anti-TPO	protilátky proti tyreoperoxydáze
anti-Tg	protilátky proti tyreoglobulinu
ATA	Americká tyreoidologická společnost
CLT	chronická lymfocytární tyreoiditida
DTC	diferencovaný karcinom štítné žlázy
ETA	Evropská tyreoidologická společnost
ft3	volný trijódtyronin
ft4	volný tyroxin
FNAB	aspirační biopsie tenkou jehlou
FTC	folikulární tyreoidální karcinom
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinázová signální kaskáda
MEN2	syndrom mnohočetné endokrinní neoplazie 2.typu
MTC	medulární karcinom štítné žlázy
NIFTP	neinvazivní folikulární neoplázie s jadernými změnami podobnými papilárnímu karcinomu
NPV	negativní prediktivní hodnota
PBs	psammoma bodies
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
PTC	papilární tyreoidální karcinom
SE	strain elastografie
SR	strain ratio
SR-ThyL	strain ratio – porovnání uzlu s tyreoidálním parenchymem longitudinálně
SR-ThyT	strain ratio – porovnání uzlu s tyreoidálním parenchymem transverzálně
SR-MusL	strain ratio – porovnání uzlu s krčními svaly longitudinálně
SR-MusT	strain ratio – porovnání uzlu s krčními svaly transverzálně
SR-CarT	strain ratio – porovnání uzlu s obsahem arterie carotis communis transverzálně
SWE	shear wave elastografie
TSH	tyreostimulační hormon

## 7. Úvod

Tyreoidální uzly jsou definovány jako jakékoliv ložisko s odlišnou strukturou od okolního parenchymu štítné žlázy. Diagnostikovány bývají většinou zcela náhodně při zobrazovacím vyšetření oblasti krku, které může být indikováno ze zcela jiné příčiny. V takovém případě lze použít výraz *incidentalom*, který značí náhodný nález klinicky zcela asymptomatického tyreoidálního uzlu. Tyreoidální uzly se vyskytují solitárně anebo mohou být mnohočetné v rámci polynodózní přestavby štítné žlázy. Jedná se o patologii s velmi vysokou prevalencí; zatímco palpačně hmatné uzly se v celosvětové populaci s dostatečným příjmem jódu vyskytují přibližně u 6 % žen a 1 % mužů (Vander J. B. et al., 1968), určité alespoň minimální uzlové nebo pseudocystické změny byly pomocí ultrazvuku zjištěny až u 68% populace (Guth S. et al., 2009). Při CT vyšetření nebo magnetické rezonanci se zaměřením na oblast krku se udává náhodný záchyt tyreoidálních uzlů přibližně u 15 % vyšetřených pacientů (Russ G. et al., 2014). Výskyt je častější u žen a stoupá s věkem. Díky vysoké rozlišovací schopnosti moderních sonografických přístrojů, které jsou schopny detekovat i léze menší než 1 mm a díky zcela rutinní dostupnosti sonografie a dalších zobrazovacích metod se nyní setkáváme se vzrůstajícím počtem pacientů odeslaných k endokrinologickému vyšetření pro nález tyreoidálního incidentalomu nebo pro uzlovou přestavbu štítné žlázy.

Tyreoidální uzly mohou být spojeny se specifickými riziky pro jejich nositele. Patří mezi ně především:

1. Syndromy z útlaku okolních struktur v oblasti krku, eventuálně mediastina při retrosternální strumě. Jedná se především o tlak a bolest v oblasti krku, dysfagie způsobené útlakem jícnu, eventuálně o dechové obtíže nebo dysfonii spojené s útlakem laryngu či trachey. Rychle progredující, většinou maligní struma může utlačovat krční žíly a vyvolat tak syndrom horní duté žíly nebo parézu nervus laryngeus recurens. Obecně jsou útlakové syndromy vzácným projevem tyreoidálních uzlů, vyskytují se pouze u velkých uzlů, objemných polynodózních strum a u rychle rostoucích maligních tumorů, které infiltruji okolní struktury.
2. Hypertyreóza – způsobená autonomní sekrecí tyreoidálních hormonů, nezávislé na stimulaci tyreostimulačním hormonem (TSH) – autonomní adenomy štítné žlázy anebo toxické polynodózní strumy.

### 3. Riziko malignity uzlu – primární tyreoidální karcinomy, lymfomy, eventuálně metastázy primárně netyreoidálních malignit (metastázy vzdálených solidních tumorů)

Diagnostika prvních dvou rizik je relativně snadná. K posouzení závažnosti obtíží spojených s lokální kompresí strumou využíváme klinické vyšetření (palpaci) a zobrazovací metody (především sonografií, eventuálně v případě retrosternální strumy CT, magnetickou rezonanci či scintigrafií). Tyreoidální funkce je dnes již snadno hodnotitelná podle laboratorních parametrů (především podle tyreostimulačního hormonu [TSH], volného tyroxinu [fT4] a eventuálně volného trijodtyroninu [fT3]). U pacientů s toxickým adenomem nebo toxickou polynodozní strumou bývá často přítomna pouze subklinická hypertyreóza, tj. suprese TSH v kombinaci s normální sérovou koncentrací volných tyreoidálních hormonů.

Naopak včasná diagnostika tyreoidálních malignit je komplikovanější. Dosud není známá přesná etiopatogeneze tyreoidálních karcinomů, a i když jsou známé některé rizikové faktory, nedokážeme vždy jednoznačně identifikovat uzly s maligním potenciálem. Navíc ani s pomocí cytologického vyšetření aspirátu získaného pomocí aspirační biopsie tenkou jehlou (FNAB – fine needle aspiration biopsy), která je metodou volby k vyšetření biologické povahy uzlu, není vždy možné jednoznačně rozhodnout o biologické povaze uzlu. Přibližně 20 – 25% cytologických vyšetření má nedagnostický anebo neurčitý výsledek (Bongiovanni M. et al., 2012). Pacientům s neurčitým cytologickým výsledkem bývá často doporučen chirurgický výkon k ověření definitivní histologické povahy uzlu. Riziko malignity je však u těchto pacientů relativně nízké (do 30 %) (Cibas E. S. et al., 2009) a s tím je spojen vysoký počet zbytečných chirurgických zákroků, které přináší perioperační riziko a finanční náklady. Nejasný je často i rozsah operačního výkonu.

V posledních letech se intenzivně studují nové rizikové faktory a hledají nové vyšetřovací možnosti, které by zlepšily současné možnosti neinvazivní preoperační diagnostiky tyreoidálních uzlů.

## **8. Tyreoidální malignity**

### **8.1. Epidemiologie tyreoidálních malignit**

Tyreoidální karcinomy jsou nejčastější endokrinologickou malignitou. Vyskytují se častěji u žen a jejich výskyt stoupá podobně jako obecně u všech tyreoidálních uzlů s věkem. Nejčastější histologickou variantou je papilární karcinom štítné žlázy (PTC), který představuje minimálně 84 % tyreoidálních malignit (Aschebrook-Kilfoy B. et al., 2011). Celkově tvoří maligní tumory asi 5-15 % klinicky relevantních tyreoidálních uzlů (Haugen B. R. et al., 2016). Tyreoidální karcinom se řadí mezi vzácná onemocnění, jeho incidence je i přes vysokou prevalenci tyreoidálních uzlů relativně nízká (7,7/100 000 nových případů ročně) (Aschebrook-Kilfoy B. et al., 2011). Například v roce 2015 bylo v České republice hlášeno 1143 nových případů TC (Vlcek P. et al.). Incidence tyreoidálního karcinomu v posledních desetiletích však rapidně stoupá. Tento trend se dobře ukazuje na americké populaci, kde se incidence nejčastější varianty, tedy PTC, téměř ztrojnásobila mezi roky 1973-2009 (Davies L. and Welch H. G., 2014). Vysvětlením mohou být lepší diagnostické možnosti tyreoidálních mikrokarcinomů. Díky snadné dostupnosti sonografického vyšetření štítné žlázy v kombinaci s lepší citlivostí moderních radiodiagnostických přístrojů, jsme schopni časně diagnostikovat i drobné mikrokarcinomy, které by se v minulosti nemusely klinicky vůbec manifestovat a díky své nízké růstové aktivitě by zůstaly po celý života pacienta nedignostikovány. Zdá se totiž, že PTC především v podobě mikrokarcinomu ve velikosti do 1 cm může mnoho let existovat ve štítné žláze pacienta, aniž by zásadně ovlivňoval jeho morbiditu, mortalitu anebo docházelo k progresi primárního ložiska. Tato skutečnost byla již experimentálně prokázána u starší populace nad 60 let (Ito Y. et al., 2014).

Je ale možné, že výskyt tyreoidálních karcinomů skutečně stoupá. Svoji roli mohou teoreticky hrát environmentální změny a další dosud neznámé rizikové faktory. Známé klinické rizikové faktory uvádím v tabulce č. 4

### **8.2. Histopatologické typy tyreoidálních malignit**

Histologické varianty tyreoidálních malignit podle klasifikace WHO z roku 2017 jsou uvedeny v tabulce 1. U hlavních podtypů tyreoidálního karcinomu je uvedena i relativní četnost.

V oblastech s dostatečným zásobením jódem tvoří drtivou většinu tyreoidálních karcinomů PTC, jehož různé histologické podtypy představuje téměř 85 % všech tyreoidálních malignit (Aschebrook-Kilfoy B. et al., 2011). Druhým nejčastějším, v dnešní době však méně frekventním maligním tumorem vycházejícím z folikulárních buněk štítné žlázy, je folikulární karcinom (FTC), který tvoří přibližně 10 % primárních tyreoidálních malignit.

V roce 2016 byla vyčleněna nová histopatologická jednotka – neinvazivní folikulární neoplázie s jadernými změnami podobnými papilárnímu karcinomu (NIFTP – noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features) (Nikiforov Y. E. et al., 2016). Jedná se o nádory, jejichž buňky obsahují jaderné změny typické pro PTC. Buňky však místo papil obvyklých pro PTC vytváří neoplastické folikuly (Chen K. T. and Rosai J., 1977). Tyto léze existují v invazivní a neinvazivní (opouzdřené) formě. Dříve byly i opouzdřené formy považovány za folikulární variantu PTC. Na základě dlouhodobého (minimálně desetiletého) sledování 109 pacientů s neinvazivní variantou, které ukázalo nulové riziko recidivy, bylo navrženo, aby tyto léze nebyly dále považovány za tyreoidální karcinom. Nově je tato léze pojmenována jako NIFTP (Nikiforov Y. E. et al., 2016). NIFTP lze považovat za ekvivalent carcinoma in situ.

Výrazně vzácnější je medulární karcinom, který je odvozen z C-buněk štítné žlázy a je většinou spojen s větší agresivitou v porovnání s tumory vycházejícími z folikulárních buněk. Vyskytuje se buď sporadicky, nebo familiárně, například ve formě syndromu mnohočetné endokrinní neoplazie 2. typu (MEN2). Medulární karcinom tvoří přibližně 2 % tyreoidálních malignit, jeho markerem je zvýšená hladina sérového kalcitoninu.

Ještě vzácnější jsou ostatní malignity (primární lymfom štítné žlázy, nízciferencovaný karcinom, anaplastický karcinom, sarkom anebo metastázy jiných tumorů), které dohromady tvoří zbývající 3 % tyreoidálních tumorů (Aschebrook-Kilfoy B. et al., 2011).

<b>Histologická varianta</b>	<b>Povaha</b>	<b>Procentuální zastoupení malignit</b>
<b>Folikulární adenom</b>	B	
<b>Hyalinizující trabekulární tumor</b>	N	
<b>Ostatní opouzdřené folikulární tumory</b>	N	
- neinvazivní folikulární neoplázie s jadernými změnami podobnými papilárnímu karcinomu (NIFTP)		
- folikulární tumor nejistého maligního potenciálu		
- dobře diferencovaný tumor nejistého maligního potenciálu		
<b>Papilární karcinom (PTC)</b>	M	84%
- klasická varianta PTC		
- folikulární varianta PTC		
- opouzdřená varianta PTC		
- papilární mikrokarcinom		
- onkocytární varianta PTC		
- PTC z vysokých buněk		
<b>Folikulární karcinom (FTC)</b>	M	10,4 %
- minimálně invazivní FTC		
- opouzdřený FTC s angioinvazí		
- široce invadující FTC		
<b>Medulární karcinom</b>	M	2,2 %
<b>Špatně diferencovaný a anaplastický karcinom</b>	M	1,3 %
<b>Ostatní maligní tumory celkem</b>	M	2,1 %
- karcinom ze skvamózních buněk		
- mucoepidermoidní karcinom		
- sklerotizující mukoepidermoidní karcinom s eosinofilií		
- mucinózní karcinom		
- ektopický thymom		
- intratyreoidální karcinom thymu		
- paragangliom a mesenchimální stromální tumor		
- hematologické tumory (lymfom, histiocytóza z Langerhansových buněk, follikulární dendritický sarkom)		
- germinální tumory (teratom)		
- sekundární tumory (metastázy)		

Tabulka 1: Histologická klasifikace tyreoidálních tumorů dle WHO, relativní zastoupení malignit dle (Aschebrook-Kilfoy B. et al., 2011) (B-benigní, M-maligní, N-nejistá povaha)

### 8.3. Diagnostika tyreoidálních karcinomů

Základní zobrazovací metodou k vyšetření štítné žlázy je sonografie. Její přednosti jsou: snadná dostupnost, dobrá přehlednost štítné žlázy vzhledem k její lokalizaci těsně pod kůží, neinvazivnost, absence radiační zátěže pro vyšetřujícího i pro pacienta a nízké náklady na vyšetření. Je-li při sonografii identifikován podezřelý uzel, metodou volby k určení biologické povahy uzlu je cytologické vyšetření materiálu získaného pomocí FNAB pod ultrazvukovou kontrolou. Dříve byly k biopsii indikovány všechny uzly se solidní složkou nad 1 cm. Od roku 2015 došlo k určitému upřesnění doporučení. Riziko malignity tyreoidálních uzlů je podle současných indikačních kritérií stratifikováno především na základě ultrazvukové charakteristiky uzlu, která se zdá podstatnější než samotná velikost uzlu. I benigní uzly mají totiž svůj růstový potenciál a jejich průměr může dosahovat větších rozměrů, než je tomu u malignit. Platná indikační kritéria pro FNAB podle aktuálních doporučení Americké tyreoidologické asociace (ATA) z roku 2015 jsou uvedeny v tabulce 3. Z těchto kritérií vyplývá, že riziko malignity zvyšují tyto sonografické charakteristiky: solidní uzel, hypoechogenita uzlu, přítomnost tkáňových kalcifikací, přerušované okrajové kalcifikace, nepravidelný okraj uzlu a větší předozadní rozměr uzlu v porovnání s jeho šířkou (Haugen B. R. et al., 2016). Na základě zhodnocení sonografického vzhledu je uzlu přiřazen stupeň, který odpovídá riziku malignity. FNAB je pak indikována na základě zhodnocení rizika a velikosti. Obdobným způsobem hodnotí riziko tyreoidálních uzlů i doporučení Evropské tyreoidologické společnosti (ETA), na základě ultrazvukového nálezu na štítné žláze rozděluje výsledek do 5 kategorií EU-TIRADS, které jsou uvedeny v tabulce 2 (Russ G. et al., 2017).

Z doporučení ATA i ETA vyplývá zajímavý fakt, že u uzlů do průměru 1 cm není nutné indikovat FNAB (Haugen B. R. et al., 2016). Toto doporučení je podloženo studií, která prokázala minimální mortalitu (4 z 8808, tj. 0,05 %) a riziko vzniku vzdálených metastáz (0,1 %) u pacientů s mikroPTC do 1 cm, pokud nebyly již iniciálně přítomny infiltrované lymfatické uzliny (Jeon M. J. et al., 2016).

Kromě zmíněných sonografických charakteristik jsou známé i některé anamnestické údaje, které zvyšují riziko malignity tyreoidálního uzlu. Bioptické vyšetření uzlu by mělo být minimálně zvaženo i u pacientů, kteří mají alespoň 1 rizikový faktor z tabulky 4, i když nesplňují sonografická indikační kritéria uvedená v tabulce 2. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je ozáření oblasti krku, hlavy a hrudníku ionizujícím zářením. Míru rizika ovlivňuje



dávka záření a věk, ve kterém ozáření nastalo. Nejrizikovější období je dětství a adolescence (Iglesias M. L. et al., 2017). Riziková jsou tedy především pacienti léčení zevní radioterapií pro dětské hematologické malignity, nebo tumory centrálního nervového systému.

Zvýšené sérové koncentrace kalcitoninu nad 100 pg/ml jsou diagnostické pro MTC. U pacientů se zvýšeným kalcitoninem nad tuto mez je vždy doporučováno operační řešení. To je doporučeno i profylakticky u dětí s geneticky prokázaným MEN2 syndromem. Problematický je postup u pacientů bez MEN 2 s mírně zvýšenou hladinou kalcitoninu (horní limit referenčního rozmezí až 100 pg/ml), mezi nimi mohou být jak pacienti s MTC, tak s prostou hyperplazií C-buněk.

<b>EU-TIRADS</b>	<b>Sonografický vzhled</b>	<b>Předpokládané riziko malignity</b>	<b>indikace k FNAB</b>
<b>EU-TIRADS 1</b>	uzel není patrný	0 %	-
<b>EU-TIRADS 2</b>	cysta nebo čistě spongiformní uzel	0 %	-
<b>EU-TIRADS 3</b>	isoechogenní či hyperechogenní uzel	2-4 %	> 20 mm
<b>EU-TIRADS 4</b>	mírně hypoechogenní uzel	6-17 %	> 15 mm
<b>EU-TIRADS 5</b>	alespoň jeden rizikový faktor: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Zřetelně hypoechogenní</li> <li>- Neoválný tvar</li> <li>- Nepravidelný okraj</li> <li>- Mikrokalcifikace</li> </ul>	26-87 %	> 10 mm

Tabulka 2: Stratifikace rizika a doporučení k indikaci biopsie tyreoidálních uzlů dle ETA, upraveno dle (Russ G. et al., 2017)

<b>Riziko malignity uzlu</b>	<b>Sonografický vzhled</b>	<b>Předpokládané riziko malignity</b>	<b>indikace k FNAB</b>
<b>Vysoké riziko</b>	solidní hypoechogenní uzly s jedním nebo více následujícími faktory: nepravidelný okraj uzlu, tkáňové mikrokalcifikace, přerušované okrajové calcifikace, extratyreoidální propagace, větší předozadní rozměr v porovnání se šířkou („vyšší než široké“)	70-90 %	> 1 cm
<b>Střední riziko</b>	solidní hypoechogenní uzly s pravidelným okrajem bez mikrokalcifikací, bez extratyreoidální propagace a uzly které nejsou „vyšší než široké“	10-20 %	> 1 cm
<b>Nízké riziko</b>	solidní isoechogenní nebo hyperechogenní uzly bez mikrokalcifikací, nepravidelných okrajů, bez extratyreoidální propagace a uzly které nejsou „vyšší než široké“	5-10 %	> 1,5 cm
<b>Velmi nízké riziko</b>	spongiformní nebo převážně cystické uzly bez dalších sonografických rizikových faktorů	<3 %	zvážit při > 2 cm
<b>Benigní</b>	cystické uzly bez solidní komponenty	<1 %	Neindikováno

Tabulka 3: Stratifikace rizika a indikace k bioptickému vyšetření tyreoidálních uzlů dle ATA, upraveno podle (Haugen B. R. et al., 2016)

---

## Anamnestické rizikové faktory malignity tyreoidálních uzlů

---

Anamnéza radiační expozice

Pozitivní rodinná anamnéza papilárního karcinomu

Předchozí hemityreoidektomie s nálezem karcinomu

Zvýšená fokální akumulace <sup>18</sup>FDG v oblasti uzlu při PET vyšetření

Zvýšená hladina kalcitoninu nad 100 pg/ml

Pacienti s MEN 2 syndromem, pozitivní rodinná anamnéza medulární karcinomu

Dysfonie, polykací obtíže, krční lymfadenopatie

---

Tabulka 4: Anamnestické rizikové faktory podle Cooper at al. 2009

<sup>18</sup>FDG – <sup>18</sup>fluorodeoxyglukóza, PET – pozitronová emisní tomografie, MEN – mnohočetná endokrinní neoplazie

Při již zmíněné velmi vysoké prevalenci tyreoidálních uzlů je zřejmé, že i při dodržení výše zmíněných, již mírnějších indikačních kritérií k FNAB, jde o velký počet pacientů, kteří ekonomicky i personálně zatěžují zdravotní systém. Problémem je i volba uzlů indikovaných k biopsii v terénu polynodozní přestavby štítné žlázy. Při velkém počtu uzlů není možné biopsovat všechny uzly a je třeba vybrat jen ty suspektní.

Navíc, pomocí cytologického vyšetření nedokážeme vždy jednoznačně rozhodnout o biologické povaze uzlu a jednoznačně doporučit další diagnosticko-terapeutický postup. K usnadnění hodnocení cytologických vzorků štítné žlázy se užívá – tzv. Bethesda klasifikace tyreoidálních cytopatologií (Cibas E. S. et al., 2009). Podle této klasifikace se od roku 2010 výsledky biopsií rozdělují do 6 tříd (Bethesda skóre I-VI, viz. tabulka 5). Tato klasifikace byla naposledy revidována v roce 2017 (Cibas E. S. and Ali S. Z., 2017). Z tabulky je dobře patrné, že pokud není nově vytvořená histologická jednotka – NIFTP považována za tyreoidální karcinom, je riziko malignity, odpovídající jednotlivým Bethesda kategoriím nižší v porovnání s obdobím před zavedením NIFTP.

<b>Bethesda klasifikace</b>	<b>Riziko malignity NIFTP = CA<sup>1</sup></b>	<b>Riziko malignity NIFTP ≠ CA<sup>1</sup></b>	<b>Zastoupení<sup>2</sup></b>
I, Nediagnostický vzorek	5-10 %	5-10 %	13 %
II. Benigní nález	0-3 %	0-3 %	59 %
III. Atypie nejistého významu nebo folikulární léze nejistého významu	10-30 %	6-18 %	9,9 %
IV. Podezření z folikulární neoplazie	25-40 %	10-40 %	10,1 %
V. Podezření z malignity	50-75 %	45-60 %	5,4 %
VI. Maligní	97-99 %	94-96 %	2,6 %

Tabulka 5: Bethesda klasifikace tyreoidálních cytopatologií

1 podle (Cibas E. S. and Ali S. Z., 2017), 2 podle (Bongiovanni M. et al., 2012)

NIFTP – neinvazivní folikulární neoplázie s jadernými změnami podobnými papilárnímu karcinomu, CA – karcinom

Zatímco uzly cytologicky klasifikované Bethesda V-VI jsou indikovány k operaci s následným histologickým ověřením, problematické je to u pacientů s nediagnostickým (Bethesda I) nebo nejednoznačným výsledkem biopsie (Bethesda III a IV). Chirurgické řešení u těchto pacientů (diagnostická operace – většinou unilaterální hemityroidektomie) přináší vysoký počet zbytečných chirurgických zákroků, které jsou spojeny s určitými operačními riziky a také představují nezanedbatelné finanční náklady.

Je-li indikováno chirurgické řešení, mohou nastat rozpaky ohledně rozsahu výkonu. Do nedávna byly preferovány především oboustranné výkony, tedy totální tyreoidektomie, která je však spojena s vyšším rizikem perioperačních a postoperačních komplikací (Hauch A. et al., 2014). Oboustranný výkon je spojen s delším trváním operačního výkonu, vyšším rizikem krvácení, a především s vyšším rizikem komplikací specifických pro operativu štítné žlázy – trvalá pooperační hypoparatyreóza a poranění nervus laryngeus recurrens. V poslední době se prosazuje konzervativnější postup, který se odráží i v aktuálních doporučeních. Není-li jiný důvod k oboustrannému výkonu (tyreotoxikóza, podezřelé uzly v kontralaterálním laloku, objemná struma s útlakem okolí) měl by být u benigních či cytologicky nejednoznačných uzlů preferován jednostranný výkon. Aktuální doporučení připouštějí jednostranný výkon jako dostatečný terapeutický postup u malých nízkorizikových diferencovaných PTC (do velikosti 2-4 cm) (Haugen B. R. et al., 2016). Problémem zůstává, jakým způsobem předoperačně

identifikovat nízkorizikové karcinomy, protože definitivní povahu uzlu a riziko eventuálního karcinomu lze stanovit až na základě histologického vyšetření tkáně.

V reakci na výše uvedené nejasnosti v souvislosti s diagnostikou tyreoidálních karcinomů, je v posledních letech vyvíjeno úsilí o zlepšení neinvazivní nebo minimálně invazivní preoperační diagnostiky tyreoidálních uzlů. Je snaha lépe popsat rizikové faktory tyreoidální onkogeneze a určit tak, jaké riziko přináší již známé, ale i nově popsané markery tyreoidálních malignit. Tabulka 6 ukazuje přehled některých potencionálně použitelných markerů. Při analýze potenciálně vhodných parametrů je třeba vycházet z patofyziologie tyreoidální onkogeneze. V tomto směru bylo opakovaně testováno vyšetření tuhosti tyreoidálních uzlů pomocí elastografie a dlouhodobě je také diskutován vztah mezi autoimunitními záněty štítné žlázy a rizikem vzniku tyreoidálního karcinomu. Těmito tématy jsem se zabýval během mého postgraduálního studia a jsou součástí této dizertační práce.

<b>Zobrazovací metody</b>	<b>Biochemické parametry</b>	<b>Molekulárně genetické markery</b>
Elastografie	anti-TPO	BRAF
PET	anti-Tg	RAS
Detekce mikrokalcifikací „micropure“	TSH	RET/PTC PAX8/PPAR-gamma
	Tg	TERT
	Cirkulující mRNA pro TSH receptor	mikro RNA

Tabulka 6: Potencionální markery diferencovaných tyreoidálních karcinomů

PET – pozitronová emisní tomografie, anti-TPO – protilátky proti tyreoidální peroxidáze, anti-Tg – protilátky proti tyreoglobulinu, TSH – tyreostimulační hormon, Tg – tyreoglobulin, BRAF – mutace genu BRAF, RAS – mutace genu RAS, RET/PTC – RET/PTC přeskupení. PAX8/PPAR-gamma - PAX8/PPAR-gamma přeskupení

## **8.4. Klasické B-mode sonografické rizikové faktory a jejich patofyziologický podklad**

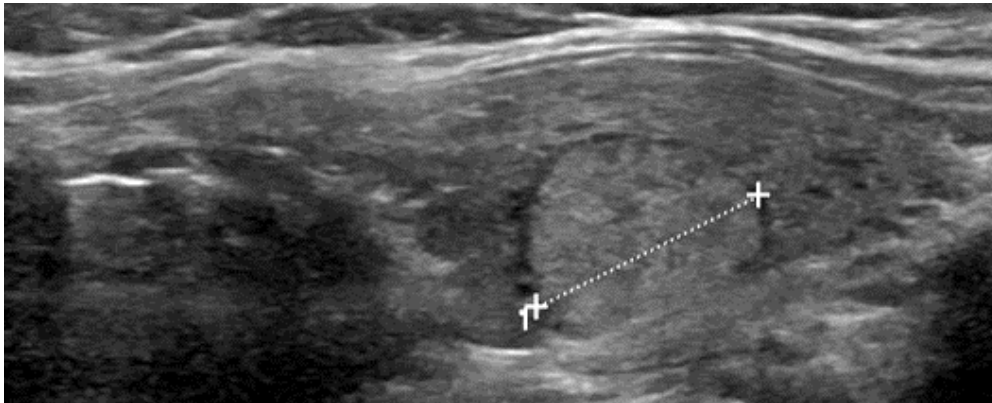
### *8.4.1. Velikost uzlu*

Samotná velikost uzlu je jako rizikový faktor sporná. Benigní adenomy, nebo uzly s převažující pseudocystickou složkou mohou dosahovat velkých (několikacentimetrových) rozměrů, také objemné retrosternálně rostoucí polynodozní strumy bývají často benigního charakteru. Naopak nízkorizikové diferencované tyreoidálního karcinomu (DTC) mohou mít pouze malý rozměr (řádově milimetry až jednotky centimetrů) a nemusí vykazovat signifikantní růstovou aktivitu. Například ve Finsku byly nalezeny drobné “okultní” papilární mikrokarcinomy jako náhodný nález až ve 35 % pitvaných štítných žlázách (Harach H. R. et al., 1985). Kamran et al. analyzovali 7348 tyreoidálních uzlů větších než 1 cm a zjistili, že riziko malignity je vyšší u uzlů nad 2 cm v porovnání s uzly o velikosti 1-2 cm. S velikostí uzlu rostl výskyt FTC, u PTC tomu tak nebylo (Kamran S. C. et al., 2013). Vysvětlením může být, že PTC může vznikat již v drobných lézích, zatímco folikulární karcinom vzniká malignizací původně benigního folikulárního adenomu, která je podmíněna jeho určitou minimální velikostí. Pro tuto teorii může svědčit i nález některých genetických mutací (RAS, PAX/PPAR gamma přesmyk), které jsou asociovány s vyšším rizikem malignity uzlu (především s FTC), i v benigních adenomech štítné žlázy (Cantara S. et al., 2010).

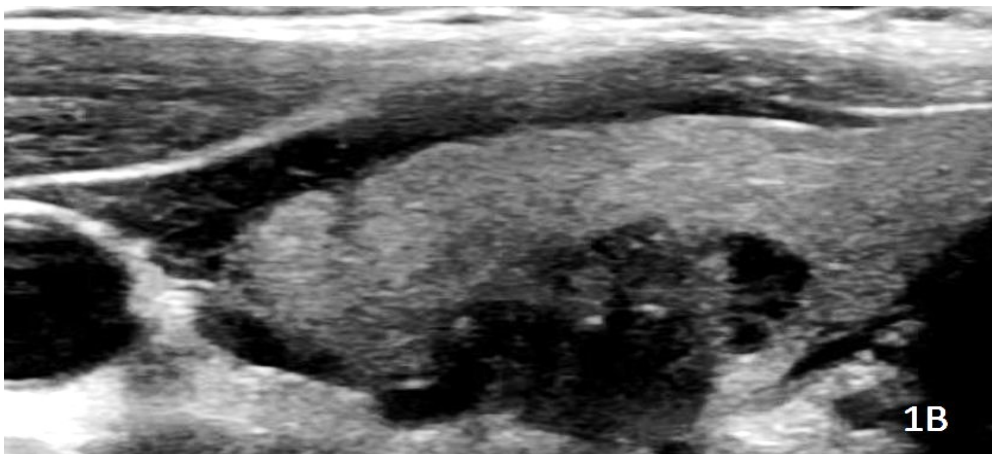
Fakt, že nízkorizikové mikroPTC především u starší populace často vykazují nízkou nebo dokonce žádnou růstovou aktivitu (Ito Y. et al., 2014) také podporuje nižší význam samotné velikosti uzlu. Výsledky citované práce Ito et al., kteří sledovali 1235 jedinců s mikroPTC do 1 cm, ukazují, že u pacientů nad 60 let bylo během 10letého sledování pouze 8 % riziko růstu primárního tumoru o více než 3 mm. Riziko vzniku metastáz v lokálních lymfatických uzlinách bylo během stejného období dokonce ještě nižší (3,8 %) (Ito Y. et al., 2014). Stejně tak Jeon et al. prokázali minimální tumorspecifickou mortalitu (0,05 %) a riziko vzniku vzdálených metastáz (0,1 %) u lézí do 1 cm (Jeon M. J. et al., 2016), pokud nebyly již iniciálně infiltrované lymfatické uzliny. Za klinicky relevantní uzly je tedy třeba považovat především ty s rozměrem nad 1 cm. Naopak uzly menší než 1 cm, u kterých není podezření na postižení uzlin nebo přítomnost metastáz lze bezpečně pouze sledovat. Na druhou stranu, v případě PTC, u kterého se můžou vyskytnout i velmi pozdní recidivy, může být i 10leté sledování nedostatečné (Amoako-Tuffour Y. et al., 2017).

#### 8.4.2. Hypoechogenita a nepravidelný okraj uzlu

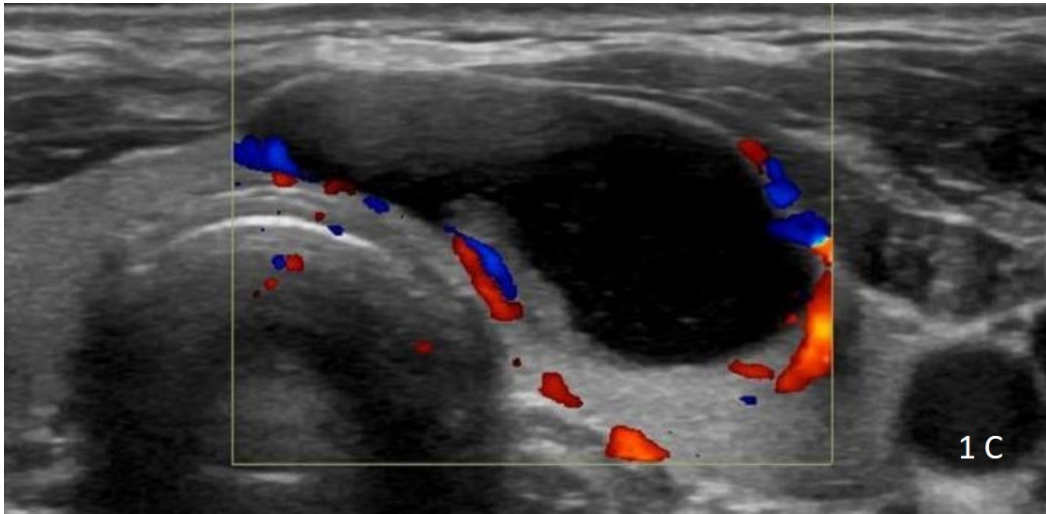
PTC se typicky zobrazuje při sonografickém vyšetření jako nepravidelný, hypoechogenní uzel s nerovným okrajem. Nepravidelný tvar je podmíněn nerovnoměrnou proliferací buněk tumoru. Hypoechogenita může být dána absencí klasického folikulárního uspořádání tkáně PTC, které je typické pro zdravou tyreoidální tkáň. Solidnější struktura PTC tedy obsahuje méně akustických rozhraní, které je potřeba pro odraz ultrazvukové vlny zpět směrem k sonografické sondě. Naopak velmi nízké riziko mají uzly s dominantní cystickou složkou, které jsou vzhledem k obsahu tekutiny silně hypoechogenní až anechogenní. Podobně uzly s četnými dutinkami, tzv. spongiformní uzly, jsou považovány za velmi nízké rizikové (Haugen B. R. et al., 2016). Příklady solidního hypoechogenního uzlu, cystoidního uzlu a spongiformního uzlu jsou uvedeny na následujícím obrázku č. 1.



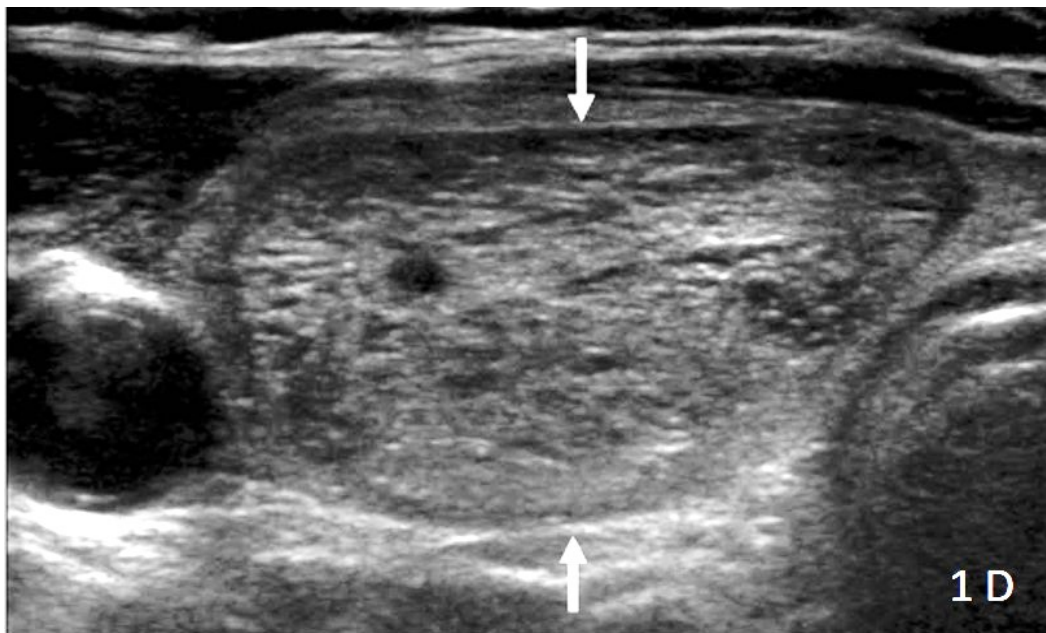
Obr. 1 A Isoechogenní uzel, sonograficky nízké riziko, cytologie (Bethesda II) (archiv autora)



Obr. 1 B Papilární karcinom štítné žlázy – silně hypoechogenní uzel, nepravidelného tvaru (archiv autora)



Obr. 1 C Pseudocysta v přechodu levého laloku do isthmu– oválná anechogenní bez perfúze (archiv autora)



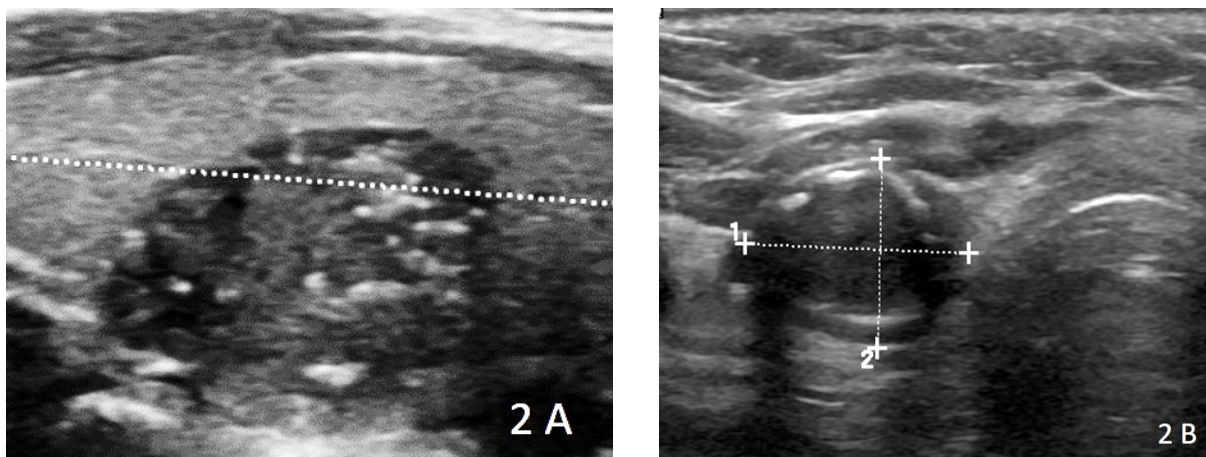
Obr. 1 D Spongiformní uzel štítné žlázy – velmi nízké riziko (archiv autora)



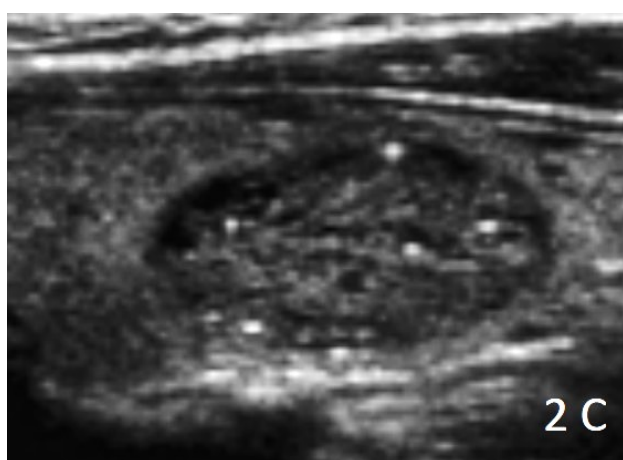
### 8.4.3. Kalcifikace

Přítomnost kalcifikací je spojena s vyšším rizikem malignity uzlu, nezávisle na jejich vzhledu (Reading C. C. et al., 2005, Taki S. et al., 2004). Rozlišujeme makrokalcifikace ( $> 2$  mm), které se zobrazují jako hyperechogenní ložiska s akustickým stínem a mikrokalcifikace ( $\leq 2$  mm), drobná hyperechogenní ložiska bez akustického stínu. Makrokalcifikace vznikají precipitací solí vápníku, nejčastěji v místě hemoragií, vyskytují se jak v benigních, tak i v maligních lézích. Drobné mikrokalcifikace jsou více specifické pro maligní uzly, především pro PTC, jejich etiologie však není přesně známá. Histologicky jsou mikrokalcifikace tzv. „psammoma bodies“ (PBs). Název je odvozen od řeckého slova „psammos“ – písek. Podrobné histologické studie PTC ukázaly ztenčení bazální membrány cév ve stopce neoplastické papily, doprovázené trombózou cévy, nekrózou tumorózních buněk a produkcí kolagenu (Das D. K., 2009, Johannessen J. V. and Sobrinho-Simoes M., 1980). PBs tedy spíše vznikají nekrózou nádorových buněk a lokální fibroprodukcí než jako produkt dystrofické kalcifikace. Zdá se, že PBS mohou tvořit určitou bariéru v růstu a šíření nádoru (Das D. K., 2009). To potvrzuje i častější výskyt mikrokalcifikací v menších, neinvazivních PTC s velikostí do 2 cm (Shi C. et al., 2012). Při využití citlivých sonografických přístrojů mohou být mikrokalcifikace snadno zaměněny buď s denzními koloidními agregacemi anebo s lokální fibrózou v případě chronické lymfocytární tyreoiditidy. Ty však nejsou spojeny s vyšším rizikem malignity. Naopak za rizikové se podle nových doporučení ATA považují i přerušované okrajové kalcifikace, které so podobně jako mikrokalcifikace často vykytují v PTC (Haugen B. R. et al., 2016). Přítomnost okrajových kalcifikací může komplikovat bioptické vyšetření uzlu, z důvodu obtížného pronikání tenké jehly skrz kalcifikovaný obvod uzlu.

Zda přítomnost makroklacifikací zvyšuje riziko malignity uzlu není zcela jednoznačně vyřešeno, nicméně většina současných doporučení odborných společností je mezi rizikové sonografické faktory neřadí (Nabhan F. and Ringel M. D., 2017) . Na obrázku 2 jsou uvedeny příklady rizikových kalcifikací, tedy mikrokalcifikací a okrajových kalcifikací, a naopak nerizikových koloidních agregací.



Obr. 2 A mikrokalcifikace v papilárním karcinomu štítné žlázy, obr. 2 B okrajová kalcifikace



Obr. 2 C koloidní agregace (archiv autora)

#### 8.4.4. Vaskularizace uzlu

V minulosti byla mezi konvenční sonografické rizikové faktory tyreoidálního uzlu řazena i zvýšená (chaotická) centrální vaskularizace uzlu při dopplerovském vyšetření. Angiogeneze hraje důležitou roli v růstu a proliferaci nádorů. Akslen et al. prokázali 3,14krát vyšší hustotu kapilár a drobných cév v PTC v porovnání s normální okolní tkání štítné žlázy, nicméně zvýšená vaskularizace nádorů nebyla v jejich práci spojena s horší prognózou pacienta (Akslen L. A. and Livolsi V. A., 2000). Práce autorů Liang et al. naopak ukazuje na možnou asociaci mezi denzitou cév a invazivitou PTC. Podle této studie byla nejnižší hustota lymfatických a drobných cév u mikroPTC ( $\leq 1$  cm), zvýšená v nádorech  $> 1$  cm a nejvyšší v případě metastatického PTC, analogicky v závislosti na velikosti a invazivitě PTC stoupala i exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru C (VGEF-C) (Liang Q. C. et al., 2006).

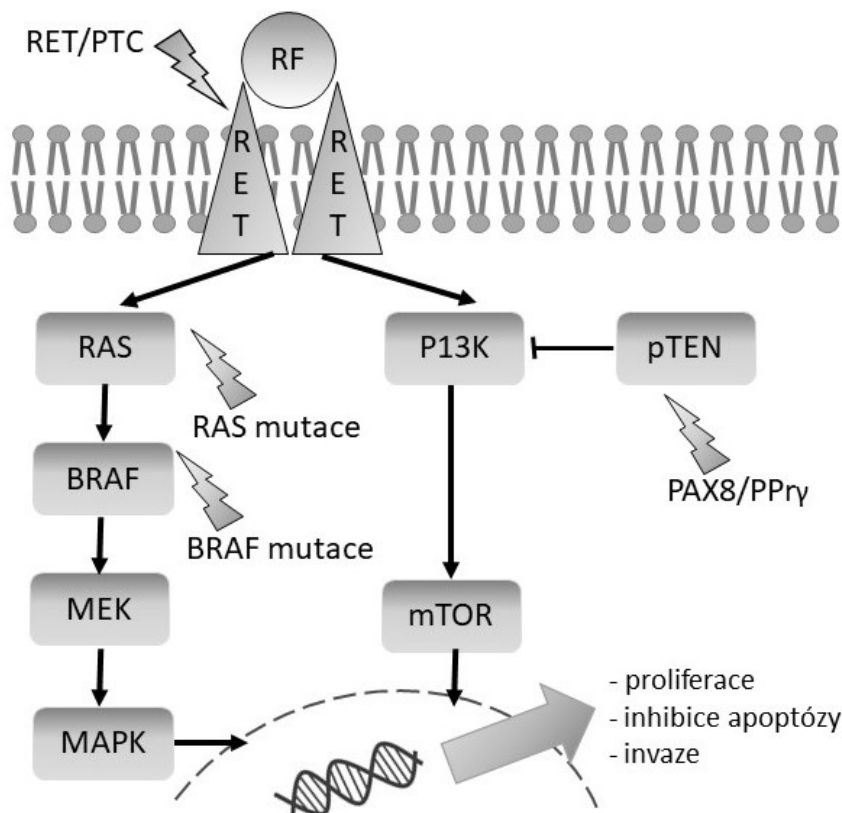
Zvýšená neovaskularizace v PTC je způsobena nerovnováhou mezi proangiogenními a protiangiogenními faktory. Tanaka et al. analyzovali expresi pro- a protiangiogenních faktorů a jejich receptorů v 75 PTC a zjistili, že exprese VEGF silně pozitivně korelovala s ostatními proangiogenními faktory (VEGF-C, Angiopoietin-2 a Tie-2) a míra jejich exprese byla spojena se zvýšenou mikrovaskulární denzitou. Naopak, exprese trombospondinu-1 (antiangiogenní faktor) negativně korelovala se stupněm invazivity tumoru (Tanaka K. et al., 2002).

Současná vysoce citlivá ultrazvuková zařízení však mohou detekovat Dopplerovské signály i u benigních uzlů. Odlišit pravidelnou vaskularizaci benigních uzlů od zvýšené chaotické vaskularizace karcinomů může být obtížné. Centrální zvýšená vaskularizace uzlů již v novějších doporučeních není považována za rizikový faktor malignity (Haugen B. R. et al., 2016).

### **8.5. Molekulárně genetické pozadí tyreoidálního karcinomu**

Mutace genů regulujících buněčný cyklus, proliferaci a apoptózu buněk mají zásadní roli v tyreoidální onkogenezi. V případě tyreoidálního karcinomu jsou nejčastěji alterovány geny vedoucí k aktivaci MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy) signální dráhy (viz. obr. 3). (Nikiforova M. N. and Nikiforov Y. E., 2008). Aktivace této dráhy má za následek změnu genetické exprese v jádře tyreocytu a vede ke zvýšené proliferaci, invazivitě a útlumu apoptózy buněk a může vést k tvorbě metastáz. Bodové mutace jsou v případě DTC nejčastěji nacházeny v BRAF genu nebo skupině RAS genů. Mezi další časté mutace asociované s tyreoidálními malignitami patří: translokace genů RET/PTC a PAX8/PPRγ.

Protoonkogen BRAF kóduje cytoplazmatickou serin-treoninovou kinázu, která je za normálních okolností aktivována RAS-GTP komplexem a dále spouští celou signalizační kaskádu. Aktivační mutace tohoto genu v tyreocytech je vysoce specifická pro tyreoidální karcinom. Konkrétně, průkaz nejčastější bodové mutace BRAF V600E, která vede k trvalé fosforylační aktivitě proteinu BRAF nezávisle na vazbě proteinu RAS, je spojen s téměř 100 % rizikem tyreoidálního karcinomu, především PTC (Cantara S. et al., 2010, Nikiforov Y. E. et al., 2011). BRAF V600E pozitivní karcinomy jsou také asociovány s agresivnější variantou PTC a častějším výskytem postižení regionálních lymfatických uzlin (Lin K. L. et al., 2010, Niemeier L. A. et al., 2012).



Obr. 3 Schéma MAPK signální kaskády (archiv autora, upraveno dle Nikiforov et al., 2011)  
 RF – růstový faktor, RET – rodina protoonkogenů RAS, BRAF – protoonkogen BRAF, MEK a MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy, ERK – mitogenem aktivovaná proteinkináza, P13K – fosfatidilinositol bisfosfát kináza, mTOR – mammalian target of Rapamycin, pTEN – fosfatázový a tensinový homolog

Dalším genem zapojeným do výše zmíněné kaskády je proto-onkogen RET, lokalizovaný na chromozómu 10, kódující membránový receptor s tyrozin-kinázovou aktivitou, který po navázání ligandu aktivuje mimo jiné MAPK signalizační kaskádu (obrázek 3). Ve 20–70 % PTC je možné prokázat fúzi genu RET s jiným genem (RET/PTC). Výsledný chimérický protein má trvalou fosforylační aktivitu, která není závislá na navázání ligandu na receptor. Existuje nejméně 13 variant RET/PTC, které se od sebe liší genem, se kterým je proto-onkogen RET fúzován (Romei C. and Elisei R., 2012). Na rozdíl od bodové mutace BRAF se RET/PTC nachází i u benigních tyreoidálních lézí (Guerra A. et al., 2011). RET/PTC pozitivní benigní uzly však mohou být spojeny s větší růstovou aktivitou (Marotta V. et al., 2011). Mutace genů kódujících rodinu proteinů RAS představují další součást MAPK signální kaskády, která bývá alterována v DTC. Nejčastěji jsou nacházeny bodové mutace v genu K-

RAS, které však také nejsou specifické pouze pro karcinomy a vyskytují se i u benigních folikulárních adenomů (FTA) (Cantara S. et al., 2010). Nicméně se zdá, že přítomnost mutace RAS v FTA může zvýšit riziko pozdější progresy k FTC. Změny na molekulární úrovni jsou totiž pravděpodobně odlišné v kancerogenezi u FTC a PTC. U PTC se předpokládá spíše přímý vznik od stadia mikrokarcinomu, zatímco FTC se pravděpodobně vyvíjí z již existujícího FTA (Farid N. R. et al., 1994). Tento vývoj je podmíněn vznikem dalších mutací, samotná bodová mutace RAS tedy s vysokou pravděpodobností pro vznik tyreoidálního karcinomu nestačí.

Transkripcí a translací fúzního genu PAX8/PPRgamma vzniká protein, který se vyskytuje především ve FTC (v 30–50 %), eventuálně ve folikulární variantě PTC. Byly popsány i případy FTA s nálezem fúzního proteinu PAX8/PPR gama. (Nikiforova M. N. et al., 2002, Raman P. and Koenig R. J., 2014). Přesný mechanismus působení tohoto fúzního proteinu není znám, ale předpokládá se, že způsobuje zvýšenou expresi dalších transkripčních faktorů (Raman P. and Koenig R. J., 2014).

Mimo popsané geny jsou v souvislosti s diagnostikou tyreoidálního karcinomu testovány další geny. Patří k nim například TERT gen, který kóduje část telomerázy, zodpovědné za prodlužování teloméru, tj. terminálních částí chromozomů. Průkaz mutace promotoru genu TERT je asociován s vyšší agresivitou tumoru a je často nacházen i ve špatně diferencovaných a anaplastických tumorech tyreoidálního původu. BRAF V600E spolu s TERT mutací působí synergicky a zvyšují riziko agresivity PTC (Liu R. and Xing M., 2016).

Zařazení genetické analýzy cytologických vzorků získaných pomocí FNAB se zdálo jako slibná cesta ke zpřesnění rizika cytologicky nejednoznačných vzorků. Zpočátku se testovaly především více zmíněné mutace, ukázalo se však, že sami o sobě nemají zatím dostatečný přínos, a to z těchto důvodů:

- 1) Stanovování izolovaných mutací má nízkou senzitivitu, a především nízkou negativní prediktivní hodnotu a nehodí se tedy k vyloučení malignity.
- 2) Nejčastější mutace (BRAF a RET/PTC) jsou typické především pro PTC. Diagnóza PTC je většinou možná na základě FNAB a ultrazvuku. Pro FTC, který se častěji vyskytuje v cytologicky nejednoznačných vzorcích (Bethesda III a IV) však tyto mutace nemají dostatečnou senzitivitu.

- 3) Nelze je rutinně vyšetřit zpětně ze suchých nátěrů na sklíčku. K provedení genetické analýzy je potřebný odběr do specifického média při FNAB, který se neprovádí rutinně při každém bioptickém vyšetření.

V reakci nato byly v poslední době vyvinuty různé komerční klasifikátory, které testují expresi většího počtu genů (až 167 - Afirma) pomocí analýzy exprese mRNA eventuálně mikroRNA. Tyto klasifikátory mají velmi dobrou negativní prediktivní hodnotu (až 94 % - Thyroseq v2) za cenu relativně nízké pozitivní prediktivní hodnoty. Celkově využití těchto analyzátorů v případě neurčitěho cytologického výsledku (především Bethesda III, IV) snižovalo počet nutných operací (Haugen B. R. et al., 2016). Podle recentních dat může být alespoň v prostředí amerického zdravotnictví i nákladově efektivní. (Vargas-Salas S. et al., 2018).

Izolované stanovení BRAF mutace lze připustit v následujících případech (Jiskra J., 2016):

- 1) Rozhodnutí rozsahu výkonu (totální tyreoidektomie vs. hemityreoidektomie) a eventuální disekce lymfatických uzlin v centrálním kompartmentu v případě positivity BRAF mutace u uzlů s Bethesda V a VI cytologií.
- 2) Odlišení PTC a NIFTP. Nato však neexistuje dostatek dat.
- 3) Rozhodnutí o indikaci hemityreoidektomie vs. aktivní sonografické sledování u starších a polymorbidních pacientů s mikrokarcinomy.

## **9. Elasticita tyreoidálních uzlů a možnosti jejího vyšetření (elastografie)**

### **9.1. Elasticita nádorové tkáně**

Růst buněk tumorů je odlišný od růstu normální zdravé tyreoidální tkáně, což může ovlivňovat mechanické vlastnosti nádorové tkáně. Předpokládá se, že většina maligních tumorů má v porovnání s benigními tkáněmi nižší elasticitu. Na nižší elasticitě maligních tumorů se kromě vyšší denzity maligních buněk a nekontrolované nepravidelné proliferace může podílet i vyšší tlak intersticiální tekutiny, který byl pozorován ve mnoha lidských malignitách a může dosahovat až 60 mmHg (Heldin C. H. et al., 2004).

Mechanismus zvýšeného intersticiálního tlaku není přesně znám. Vysvětlením může být zvýšená propustnost cév zásobujících tumor, díky které lokálně uniká větší množství plazmatických proteinů do extracelulární matrix. Proteiny jsou navíc často neefektivně drénovány infiltrovanými lymfatickými cestami. Díky vyšší koncentraci proteinů lokálně stoupá onkotický tlak a do intersticia tumoru je nasávána tekutina. Fyzikálně je tekutina nestlačitelná, a proto při jejím nadbytku v intersticiu klesá elasticita tkáně tumoru.

Na „netěsnosti“ nádorových cév se může podílet lokální nadprodukce VEGF (Vascular endothelial growth factor) a cytokinů z aktivovaných imunitních buněk, které infiltrují stroma tumoru (Heldin C. H. et al., 2004). VEGF je za normálních okolností syntetizován v reakci na hypoxii při neadekvátní perfúzi tkáně, lokálně pak stimuluje neoangiogenezi a zvyšuje propustnost cév. Existují práce, které ukazují, že v maligních tumorech štítné žlázy je pozorována vyšší produkce VEGF v porovnání s benigními tyreoidálními uzly (Soh E. Y. et al., 1997).

Na snížené elasticitě maligních tumorů se může dále podílet hustší síť kolagenních vláken a zvýšený počet fibroblastů v extracelulární matrix (Heldin C. H. et al., 2004). Ke zvýšené tuhosti tyreoidálních karcinomů mohou přispívat i tkáňové makrokalifikace i mikrokalifikace a okrajové kalifikace, které jsou typické pro některé karcinomy štítné žlázy a jsou považovány za rizikový sonografický parametr tyreoidálních uzlů. Faktory přispívající ke snížené elasticitě tumorózní tkáně jsou shrnuty v tabulce 7.

Snížená elasticita tyreoidálních uzlů se tedy nabízí jako další marker malignity a její vyšetření pomocí (sono)elastografie by mohlo rozšířit současné neinvazivní diagnostické možnosti tyreoidálních uzlů.

---

### **Faktory snižující elasticitu tumorózní tkáně**

---

Vyšší denzita tumorózních buněk

Zvýšený tlak tekutiny v intersticiu tumoru

Kalcifikace (mikrokalcifikace, makrokalcifikace, okrajové kalcifikace)

Hustší síť kolagenních vláken a fibroblastů

---

Tabulka 7: Faktory snižující elasticitu tumorózní tkáně

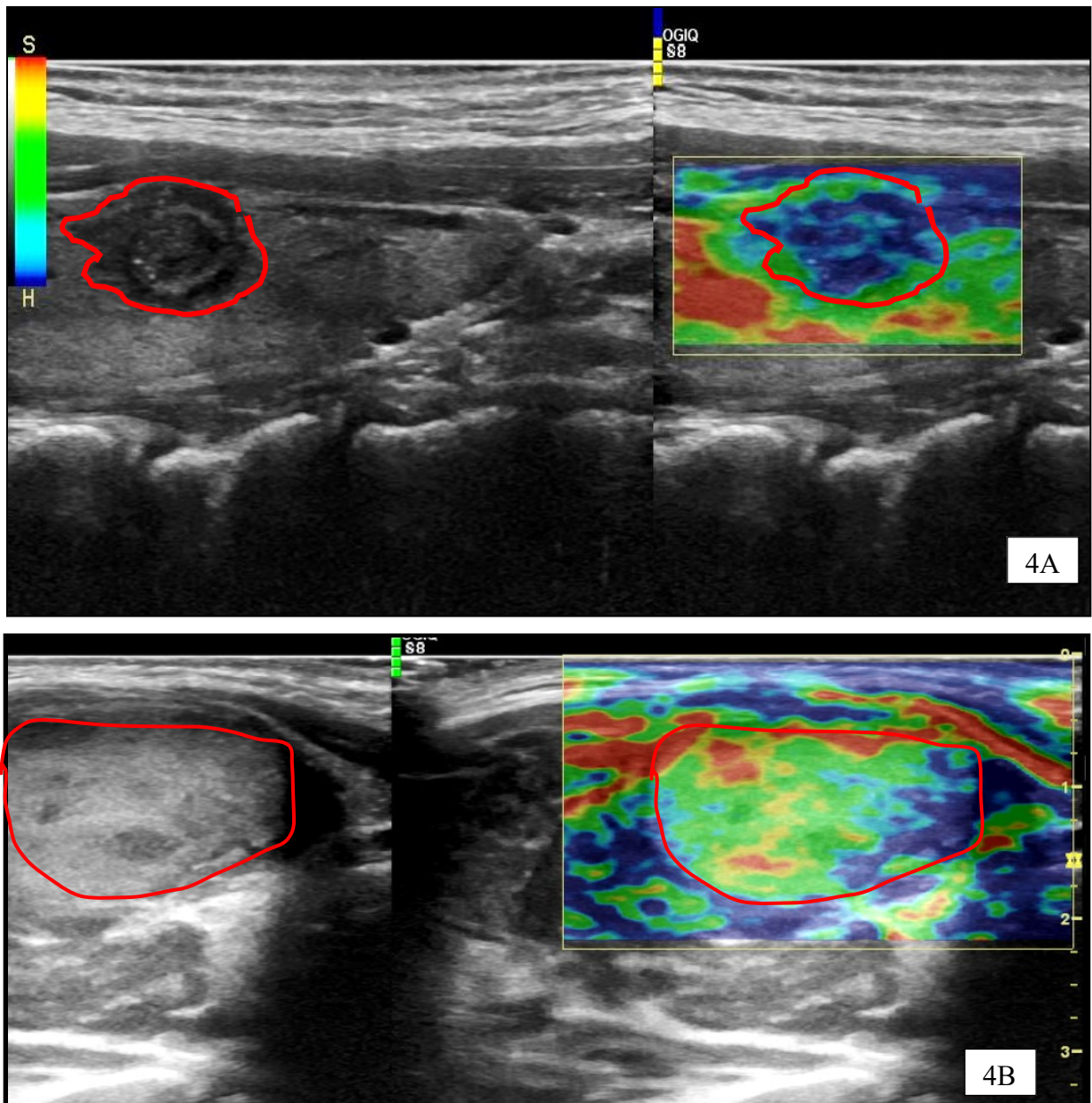
## **9.2. Elastografie**

Elastografii poprvé představil již v roce 1991 Ophir (Ophir J. et al., 1991). Jedná se o modalitu sonografického vyšetření, která umožňuje stanovit elasticitu vyšetřované tkáně a zobrazit ji v reálném čase spolu s klasickým B-mode sonografickým obrazem. Zpočátku byla elastografie využívána především v diferenciální diagnostice ložiskových lézí prsu, v posledních dvou desetiletích je experimentálně využívána i v diagnostice tyreoidálních uzlů a difuzního jaterního postižení (steatohepatitida, fibróza, cirhóza)

Rozlišujeme dva různé principy sonoelastografie - strain elastografii (SE) a shear wave elastografie (SWE) – elastografie rázovou vlnou. SE je rozšířenější a jejím výstupem je tzv. elastogram – mapa s relativním rozložením elasticity nad vyšetřovanou oblastí. K zobrazení se používá barevná škála doplněná o klasický B-mode sonografický snímek. Příklady elastogramů PTC a benigního tyreoidálního uzlu jsou na uvedeny na obrázku 4. Princip SE je založen na snímání deformace vyšetřované tkáně pomocí tkáňového dopplera při působení zevního tlaku. Jako zdroj tlaku se nejčastěji používá rytmické stlačování tkáně sonografickou sondou. Měkké, elastické tkáně se více komprimují a jejich částice se při působení tlaku pohybují rychleji v porovnání s tuhými tkáněmi. Rychlost pohybu jednotlivých částecek tkáně je měřena pomocí



tkáňového dopplera a následně softwarově převedena do barevné mapy (Ophir J. et al., 1991). Výsledkem vyšetření tedy není konkrétní kvantitativní hodnota, ale pouze informace o relativním rozložení „strain“ (napětí) nad vyšetřovanou oblastí.



Obrázek 4 (archiv autora):

A Elastogram histologicky potvrzeného papilárního karcinomu; nad oblastí uzlu je patrná oblast s převahou modré barvy, která odpovídá relativně tuhé tkáni proti okolí

B Elastogram histologicky verifikovaného benigního koloidního uzlu; nad oblastí uzlu převažuje zelená, žlutá a červená barva, která odpovídá relativně měkčí tkáni proti okolí

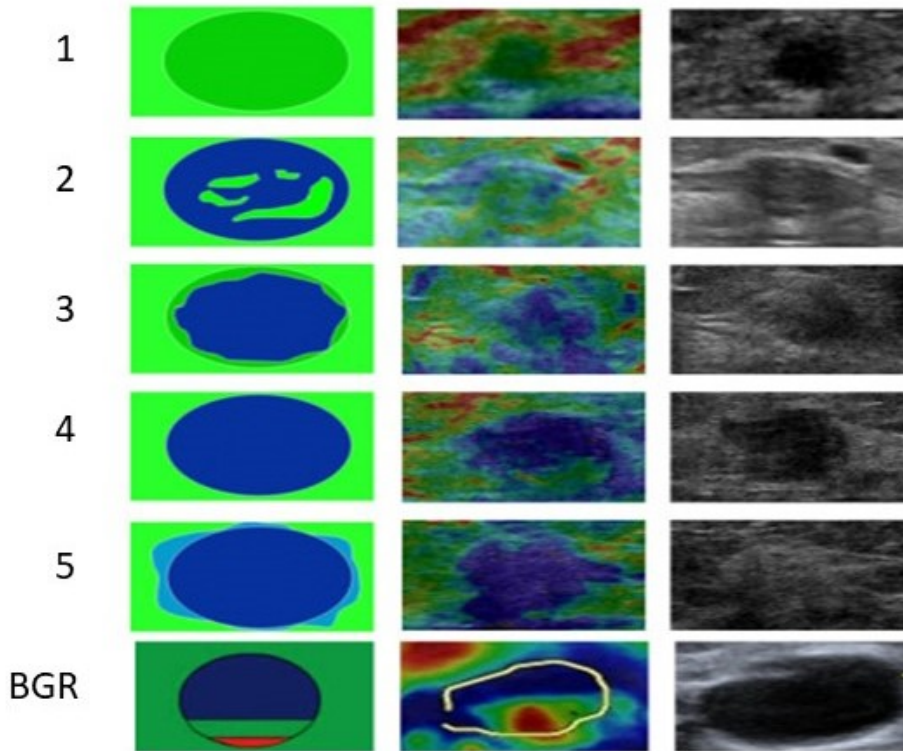
Méně rozšířená metoda SWE může na rozdíl od SE přímo kvantifikovat elasticitu tkáně v každém vyšetřovaném bodě. Výstupem je tzv. Youngův modul pružnosti v tlaku (jednotka kPa) – veličina charakterizující o kolik se tkáň relativně zkrátí (deformuje) při působení tlaku. Tlak je v případě SWE generován pomocí vysokoenergetického ultrazvukového vlnění, vyslaného z ultrazvukové sondy. Jeho působením vzniká v tkáni rázová vlna, která se šíří v rovině kolmé na směr primárního vlnění. Druhá mocnina rychlosti šíření této rázové vlny je přímo úměrná Youngově modulu pružnosti. Pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku lze rázovou vlnu vizualizovat a analýzou její rychlosti je možné přesně definovat elasticitu v každém místě vyšetřované tkáně (Bercoff J. et al., 2004).

### 9.3. Analýza strain elastografie

Výstupem strain-elastografického vyšetření je elastogram, který je možné hodnotit kvalitativně nebo semikvantitativně. Princip kvalitativního hodnocení je založen na vizuálním posouzení rozložení elasticity vyšetřované oblasti v porovnání s okolím. V případě elastografie tyreoidálních uzlů porovnáváme rozložení barev nad vyšetřovaným uzlem a porovnáváme ho s okolní tkání štítné žlázy. Tento způsob hodnocení strain-elastografie může být snadno ovlivněn subjektivním pohledem vyšetřujícího a postrádá standardizaci. K usnadnění klinického, a především experimentálního hodnocení SE byly vyvinuty různé skórovací systémy, které jsou založeny na odhadu zastoupení elastické a neelastické („tuhé“) části uzlu a porovnání. Celý princip je stále založen pouze na subjektivním pohledu vyšetřujícího, ale přináší již určitou míru standardizace.

Jedním z prvních používaných skórovacích systémů. tzv. „Tsukuba“ skóre je ukázáno na obrázku 5. Tsukuba klasifikace rozděluje uzly podle elasticity do 5 stupňů. Skóre 4 a 5 (uzly které se jeví celé jako tuhé) je považováno za suspektní (Itoh A. et al., 2006). Mimo 5 základních skóre je uveden tzv. BGR fenomén (podle barev blue-green-red), který je typický pro (pseudo)cystické léze vyplněné tekutinou. Tekutina se jako nestlačitelná hmota jeví jako tuhá a způsobuje falešně pozitivní výsledek.

Další užívané klasifikační skóre jsou podle (Rago T. et al., 2007) a (Asteria C. et al., 2008), liší se v počtu stupňů a v rozložení elasticity, základní princip hodnocení je však stejný.



Obr 5. Tsukuba skóre k hodnocení strain elastografie (Itoh A. et al., 2006)

Přesnější, semikvantitativní metodou je výpočet tzv. „strain ratio“. Jedná se o poměr relativních elasticit dvou definovaných oblastí. Moderní elastografické přístroje dokáží strain ratio spočítat automaticky po vyznačení oblasti zájmu a kontrolní oblasti. V elastografii tyreoidálních uzlů se jako referenční oblast využívá okolní normální tyreoidální tkáň. Tento způsob hodnocení je sice časově náročnější a není ho možné provést u každého pacienta, ale některé studie ukazují, že má lepší výpovědní hodnotu než skórovací systémy (Razavi S. A. et al., 2013). Strain ratio redukuje interpersonální i intrapersonální variabilitu, nedokáže ji však zcela eliminovat, protože výsledek lze ovlivnit nesprávně zvolenou referenční oblastí nebo nadměrnou silou vyvinutou při rytmickém stlačování krku. Správně zvolená referenční oblast má být lokalizovaná ve stejné a má mít přibližně stejnou velikost a tvar hloubce jako vyšetřovaný uzel.

#### 9.4. Elastografie a tyreoidální uzly

Vyšetření elasticity pomocí elastografie je posledních 15 let využíváno i v diagnostice tyreoidálních uzlů. První literární zmínky týkající se elastografie štítné žlázy v České republice jsou již z roku 2005 (Kybic J. and Smutek D., 2005). Výsledky dosud prezentovaných studií potvrzují, že maligní tyreoidální uzly jsou většinou méně elastické v porovnání s benigními

uzly. Meta-analýza publikovaná v roce 2013, která zahrnovala celkem 3531 uzlů, ukazuje, že elastografie štítné žlázy má lepší senzitivitu i specificitu v porovnání s konvenčními sonografickými rizikovými faktory (Razavi S. A. et al., 2013). Lepších diagnostických výsledků bylo dosaženo při využití strain ratio v porovnání s elastografickým skóre (Razavi S. A. et al., 2013). Limitací strain ratio je však absence normální tyreoidální tkáně u objemných uzlů, v polynodozně přestavěných štítných žlázách a u istmické lokalizace uzlu. Objevují se však práce, které přínos elastografie zpochybňují. Výsledky práce Moon et al. ukazují na nižší výtěžnost elastografie v porovnání s konvenční sonografií (Moon H. J. et al., 2012). Také v turecké práci Unluturk et al. poukazují na nízkou senzitivitu a NPV elastografie, která byla horší než v případě konvenční sonografie. (Unluturk U. et al., 2012).

Problémem jsou i uzly v terénu autoimunitní tyreoiditidy. Zánětlivé změny, apoptóza tyreocytů, edém, zvýšená perfúze a především fibrotizace štítné žlázy snižují elasticitu tyreoidálního parenchymu a uzel se pak jeví falešně elastičtější, než by byl v porovnání s normální tyreoidální tkání bez zánětlivého postižení (Sahin M. et al., 2014).

Přestože je využití elastografie v tyreoidologii zatím převážně experimentální a výsledky nejsou zcela jednoznačné, vyšetření elasticity tyreoidálních uzlů se již objevuje v posledních aktualizacích doporučení některých odborných společností. Doporučení Americké asociace klinických endokrinologů (AACE/ACE-AME) z roku 2016 považují sníženou elasticitu za další rizikový faktor a řadí ji na úroveň ostatních konvenčních sonografických rizikových faktorů (Gharib H. et al., 2016). Dle doporučení ATA z roku 2015 může elastografie pomoci rozhodnout o dalším postupu u selektované skupiny pacientů, například s nejednoznačným cytologickým výsledkem, v žádném případě však nemá nahradit klasickou sonografií (Haugen B. R. et al., 2016) Také evropská doporučení (ETA) zmiňují elastografii jako možnou doplňkovou metodu v diagnostice tyreoidálních uzlů, která nemá nahradit klasickou sonografií, ale může jí díky vysoké negativní prediktivní hodnotě doplnit. Doporučení ETA také uvádí hlavní limitace elastografie štítné žlázy, mezi které patří (Russ G. et al., 2017):

- velikost uzlu (>30 mm nebo <5 mm)
- uzly s makrokalifikacemi
- cystické uzly
- uzly lokalizované v hluboko dorzálně anebo istmicky lokalizované uzly
- absence normálního okolního parenchymu

## 10. Chronická lymfocytární tyreoiditida a tyreoidální karcinomy

Štítná žláza patří mezi nejčastěji postižené orgány autoimunitním onemocněním (Jacobson D. L. et al., 1997). Prevalence chronické lymfocytární tyreoiditidy (CLT) se odhaduje kolem 5-10%, přičemž ženy jsou postiženy asi 5-8x častěji než muži a riziko onemocnění stoupá podobně jako u tyreoidálního karcinomu s věkem (McLeod D. S. and Cooper D. S., 2012). Pro CLT je typická infiltrace štítné žlázy zánětlivými buňkami – především T-lymfocyty, degradace folikulárních buněk, které jsou nahrazovány zánětlivými buňkami a fibrózou. Tyto změny vedou často k poruše tyreoidální funkce. CLT je v oblastech s dostatečným zásobením jódem nejčastější příčinou hypotyreózy. CLT bývá spojena s pozitivitou antityreoidálních autoprotilátek (proti tyreoidální peroxidáze [anti-TPO] a tyreoglobulinu [anti-Tg]). Typické jsou i sonografické změny – nehomogenní textura štítné žlázy se sníženou echogenitou a živější perfúzí tyreoidální tkáně. Může být přítomna struma anebo naopak v pozdějších fázích onemocnění atrofie štítné žlázy.

V rozsáhlé populační studii NHANES III, která zahrnovala více než 17 200 probandů, byla v americké populaci zjištěna prevalence pozitivních anti-TPO 11,3 % u anti-Tg se prevalence pohybovala kolem 10,4 %. Pozitivita protilátek byla častější u žen a prevalence rostla spolu se stoupajícím věkem (Hollowell J. G. et al., 2002)

Je známé, že dlouhodobá iritace tkáně chronickým zánětem, produkce volných kyslíkových radikálů a celkové i lokální imunologické změny v terénu zánětu mohou být spojeny s buněčnými atypii, které zvyšují riziko kancerogeneze. Tento vztah byl již prokázán u některých lidských malignit (např. kolorektální karcinom v terénu idiopatických střevních zánětů, hepatocelulární karcinom v terénu chronické virové hepatitidy B a C, karcinom děložního čípku v souvislosti s infekcí lidským papillomavirem, karcinom žaludku u pacientů s *Helicobacter* pozitivní gastritidou, karcinom jícnu u pacientů s Barrettovým jícnem) (Balkwill F. and Mantovani A., 2001). Souvislost mezi autoimunitním zánětem a karcinomy štítné žlázy však zatím není plně objasněna. Jde o opakovaně diskutovanou problematiku, na kterou se liší názory.

## 10.1. Chronická lymfocytární tyreoiditida a riziko karcinomu štítné žlázy

Souvislost mezi tyreoidálními karcinomy a CLT poprvé popsal Dailey již v roce 1955, který na základě častých histopatologických nálezů tyreoidálních tumorů s okolní lymfocytární infiltrací vyslovil podezření o možné kauzální souvislosti mezi CLT a tyreoidálními karcinomy (Dailey M. E. et al., 1955). Rozsáhlá meta-analýza od Lee et al. publikovaná v roce 2013, která zahrnovala celkem 10 648 PTC, prokázala signifikantní asociaci mezi PTC a histologickým nálezem CLT. Z celkového počtu 37 studií zařazených do této meta-analýzy 11 porovnávalo výskyt CLT u PTC a u benigních tyreoidálních uzlů. CLT byla prokázána u 40,5 % PTC v porovnání s 21 % v případě benigních tyreoidálních lézí (OR 2.8;  $P < 0.001$ ) (Lee J. H. et al., 2013). Podobně Liu et al. našli ve studii s 6432 pacienty s tyreoidálními uzly výrazně vyšší incidenci PTC u histologicky prokázané CLT v porovnání s pacienty bez CLT (44 % vs. 22 %) (Liu X. et al., 2014). Také poměrně rozsáhlá práce z endokrinologického centra v Hradci Králové, která zahrnovala celkem 4979 pacientů prokázala signifikantní histologickou koincidence PTC a CLT, avšak maligní nebo suspektní cytologický výsledek vzorku z FNAB nebyl asociován s CLT (Gabalec F. et al., 2016). Výsledky recentní dánské meta-analýzy z roku 2017 ukazují vyšší relativní riziko PTC u pacientů s CLT (OR 1,4;  $P = 0,016$ ), také vzácný primární tyreoidální lymfom se v této meta-analýze častěji vyskytoval u pacientů s CLT, u kterých bylo relativní riziko 9,7x vyšší v porovnání s pacienty bez CLT. Ostatní tyreoidální malignity nebyly asociovány s CLT (Resende de Paiva C. et al., 2017). Tyto výsledky sice ukazují častou koincidence obou onemocnění, při absenci rozsáhlých prospektivních studií však nelze považovat CLT za jednoznačný rizikový faktor tyreoidální kancerogeneze. Lymfocytární infiltraci v okolí tumoru lze totiž také vysvětlit jako přirozenou imunitní reakci organismu na přítomnost nádorových buněk (Shu S. et al., 1997). Navíc kromě histologické koincidence sdílejí obě onemocnění i některé rizikové faktory. PTC se obdobně jako CLT častěji vyskytuje u žen, v souvislosti s expozicí ionizujícímu záření a v oblastech s dostatečným příjmem jódu (Cunha L. L. et al., 2011).

Vztah mezi tyreoidálními autoprotiátky a rizikem PTC také není jasný. Některé práce našly asociaci mezi pozitivním titrem anti-Tg a výskytem PTC (Azizi G. et al., 2014, Kim E. S. et al., 2010). Naopak pozitivita anti-TPO ve výše uvedených studiích nekorelovala s rizikem malignity uzlu. V jiné práci Fiore et al. neprokázali asociaci mezi pozitivitou antityreoidálních protilátek a cytologickým nebo histologickým nálezem PTC, a to i přesto, že histologický

průkaz lymfocytární infiltrace v okolí uzlu byl v jejich studii výrazně asociována s diagnózou PTC (Fiore E. et al., 2009b).

Na druhou stranu je třeba uvést, že pozitivní antityreoidální protilátky (anti-TPO nebo anti-Tg) nebo sonografické známky tyreoiditidy se vyskytují nejméně u 10-12 % populace (Hollowell J. G. et al., 2002), přesto se u naprosté většiny těchto osob PTC nevyvine. Zvýšenou incidenci PTC u CLT lze také vysvětlit vyšším zachytem indolentních PTC, protože pacienti s CLT jsou pravidelně sonograficky kontrolováni. Mohou tak být zachyceny i drobné PTC, které by jinak unikly diagnóze.

Zajímavé je, že CLT může u pacientů s DTC štítné žlázy hrát i protektivní roli. U pacientů s DTC v terénu CLT byly nalezeny méně lokálně invazivní formy tumorů, nižší výskyt invaze přes tyreoidální pouzdro, infiltrace lymfatických uzlin a delší interval bez relapsu onemocnění (Lee J. H. et al., 2013). Nabízí se vysvětlení, že buňky DTC exprimují obdobné povrchové antigeny jako zdravé folikulární buňky a mohou být destruovány podobnými imunologickými mechanismy jako normální tyreocyty v případě CLT. Antityreoidální autoimunita může tímto mechanismem bránit progresi onemocnění.

## **10.2. Molekulárně-biologické pozadí vztahu PTC a CLT**

V buňkách DTC se nejčastěji nachází mutace v signální kaskádě RET/RAS/BRAF. Z pohledu CLT a tyreoidálních karcinomů je zajímavý především RET/PTC přesmyk. Produktem takto mutovaného genu je trvale aktivní receptor spřažený s tyrosinkinázou. Tato mutace je častější u tyreoidálních karcinomů v terénu CLT, zároveň byla nalezena i v některých benigních tyreocytech v CLT (Muzza M. et al., 2010). Častější výskyt RET/PTC přesmyku v tyreoidálních karcinomech v terénu CLT lze vysvětlit různými hypotetickými mechanismy (Cunha L. L. et al., 2011, Guarino V. et al., 2010):

- 1) Chronický zánět působí jako zdroj reaktivních kyslíkových radikálů a dalších mutagenních faktorů, které poškozují DNA a zvyšují pravděpodobnost náhodného vytvoření RET/PTC přesmyku.
- 2) Přítomnost RET/PTC přesmyku může být zdrojem dalších prozánětlivých transkripčních faktorů, které vedou k okolní zánětlivé reakci

3) Cytokiny produkované zánětem prodlužují přežívání tyreocytů s náhodným výskytem RET/PTC přesmyku, a tím umožňují vznik dalších mutací, které mohou způsobit rezistenci k apoptóze a umožnit tak maligní transformaci tyreocytů

Podle první a třetí hypotézy by CLT působila jako rizikový faktor rozvoje tyreoidálního tumoru, a to buď přímým mutagenním účinkem anebo mechanismem navození imunologické tolerance. Tyto hypotetické modely týkající se RET/PTC přeskupení lze analogicky užít i na jiné mutace, které jsou asociovány s tyreoidálními karcinomy.



## 11. Cíle práce

Cíle naší práce byly dva:

- 1) Ověřit, zda u tyreoidálních karcinomů dochází ke změnám mechanických vlastností nádorové tkáně, a tím ke změně jejich elasticity. K tomuto účelu jsme použili real-time strain elastografii. Elasticitu tyreoidálních uzlů jsme stanovili kvalitativně pomocí šestistupňového Tsukuba skóre a semikvantitvě pomocí strain ratio. Jako referenční oblast pro strain ratio sloužila nejen okolní tyreoidální tkáň, ale i krční svaly a a. carotis communis. Pokud by se tkáň v okolí štítné žlázy ukázala jako vhodná referenční oblast pro elastografii tyreoidálních uzlů, umožnilo by to vyšetření i uzlů, které byly dosud nevyšetřitelné, eventuálně vyšetřitelné s výraznými limitacemi. Jde především o objemné uzly, u kterých v okolí chybí normální tyreoidální tkáň, dále o polynodozně přestavěné štítné žlázy a o uzly v terénu CLT. Pokusím se ověřit přínos elastografie tyreoidálních uzlů ve vyšetřovacím algoritmu jejich biologické povahy.
- 2) Zjistit, zda je biologická povaha tyreoidálních uzlů asociována s markery autoimunitní tyreoiditidy (anti-Tg, anti-TPO, sonografické známky autoimunitní tyreoiditidy) a s markery tyreoidální hormonální funkce (TSH).

## 12. Hypotézy

- 1) Snížená elasticita tyreoidálních uzlů v porovnání s okolní tyreoidální tkání a s okolními anatomickými strukturami v oblasti krku (a. carotis communis, krční svaly) je asociována s vyšším rizikem tyreoidální malignity
- 2) Přítomnost tyreoidálních autoprotilátek, sonografických markerů chronické lymfocytární tyreoiditidy a snížená tyreoidální funkce jsou asociovány s vyšším rizikem malignity tyreoidálního uzlu.

## 13. Metodika

### 13.1. Výběr pacientů

Osoby, na kterých jsme prováděli sběr dat za účelem mé práce, byli rekrutováni z pacientů, kteří byli odesláni k provedení FNAB do ultrazvukové laboratoře 3. interní kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Indikace FNAB vycházela z aktuálně platných doporučení odborných endokrinologických společností. Pacienti udělili souhlas s provedením FNAB dle standardů 3. interní kliniky. K hodnocení elasticity tyreoidálních uzlů pomocí sonoelastografie byl od roku 2012 do roku 2014 u každého pacienta před provedením FNAB uložen do sonografického přístroje klasický sonografický B Mode obrázek, elastogram a smyčka k pozdější analýze strain ratio. K analýze tyreoidálních protilátek a markerů tyreoidální autoimunity byla použita i starší data získaná na pacientech podstupujících FNAB již od roku 2006.

Všichni pacienti s primárním TC, zařazení do naší práce byli po operaci štítné žlázy s následnou histologickou verifikací tyreoidální malignity. Kontrolní skupiny pro obě práce byly tvořeny pacienty s histologicky potvrzenými benigními tyreoidálními lézemi a pacienty s benigním cytologickým nálezem, u kterých nedošlo k sonografické progresi uzlu minimálně po dobu 1 roku.

#### *13.1.1. Skupina pacientů v práci "Vyšetření elasticity tyreoidálních uzlů"*

Celkem bylo mezi roky 2012 a 2014 pomocí strain elastografie vyšetřeno 275 pacientů s 310 tyreoidálními uzly. Mezi nimi bylo identifikováno 22 (7,1 %) primárních tyreoidálních karcinomů (21 PTC a 1 FTC), kteří tvořili sledovanou skupinu. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno celkem 39 pacientů, 27 z nich podstoupilo operaci štítné žlázy a bylo histologicky ověřeno, zbylých 12 pacientů mělo benigní cytologický nále (Bethesda II kategorie) a alespoň 1 rok stabilní ultrazvukový nále. 214 pacientů nebylo analyzováno, protože u nich ve sledované době nebylo možno rozhodnout o biologické povaze uzlu (tj. Bethesda kategorie I, III, IV bez histologického ověření, nebo nebylo slněno kritérium 1 roku bez sonografické progresi).

### *13.1.1. Skupina pacientů v práci Chronická lymfocytární tyreoiditida a riziko tyreoidálního karcinomu*

Retrospektivně jsme analyzovali výsledky od 2571 pacientů s 2955 provedenými FNAB v letech 2006-2014. Celkově bylo nalezeno 113 prokázaných malignit, z nich bylo 14 vyřazeno z další analýzy, protože se nejednalo o primární tyreoidální malignity (6 tyreoidálních lymfomů a 8 vzdálených metastáz) a dalších 8 pacientů bylo vyřazeno z důvodu chybějících ostatních dat. Do studie bylo zařazeno celkem 91 pacientů s histologicky verifikovaným primárním TC (79 PTC, 10 FTC, 1 špatně diferencovaný karcinom a 1 medulární karcinom).

Ke každému pacientovi s TC byli náhodně vybráni dva pacienti stejného pohlaví a stejného věku, kteří splňovali všechna následující kritéria:

- 1) přítomnost uzlu s benigní cytologií (Bethesda II)
- 2) přítomnost uzlu s benigní histologií nebo se sonograficky stabilním nálezem po dobu alespoň jednoho roku sledování, tj. uzly nesplňovaly kritéria progresu dle ATA (zvětšení alespoň ve 2 rozměrech o 30%, min o 2 mm a/nebo zvětšení objemu alespoň o 50 %)
- 3) dostupný výsledek sonografie štítné žlázy před FNAB, dostupné biochemické parametry před FNAB (TSH, anti-TPO).

Celkem kontrolní skupinu tvořilo 182 pacientů (50 s histologicky verifikovanými benigními uzly a 132 se sonograficky stabilními uzly s benigní cytologií).

### **13.2. Ultrazvukové vyšetření a aspirační biopsie tenkou jehlou (FNAB)**

Konvenční sonografie štítné žlázy byla prováděna lineární sondou s frekvencí 10 MHz. Během vyšetření leželi pacienti v poloze na zádech a u každého pacienta byl uložen k pozdější analýze podélný i transverzální B mode obrázek sledovaného uzlu i obou laloků štítné žlázy, navíc byl uložen i snímek v dopplerovském modu k hodnocení vaskularizace štítné žlázy a tyreoidálního uzlu.

Konvenční sonografie tyreoidálních uzlů byla zaměřena na přítomnost klasických rizikových faktorů TC, tj. hypoechogenita uzlu, nepravidelný okraj uzlu, větší předozadní než transverzální

rozměr uzlu a přítomnost tkáňových mikrokalcifikací nebo okrajových calcifikací. Uzly nebyly hodnoceny s využitím současných sonografických klasifikací (ATA, EU-TIRADS), protože tyto klasifikace nebyly v době sběru a publikace dat dostupné.

V okolním tyreoidálním parenchymu byla sonograficky hodnocena přítomnost změn typických pro CLT, tj. nehomogenní, hypoechogenní parenchym, event. se zvýšenou vaskularizací žlázy.

Celkový objem štítné žlázy byl získán součtem objemů obou tyreoidálních laloků, jejichž objem byl vypočten podle vzorce:

$$V_1(\text{ml}) = a \times b \times c \times 0,479$$

Vzorec pro výpočet objemu tyreoidálního laloku

$V_1$  – objem laloku v ml; a – transverzální rozměr laloku v cm; b – předozadní rozměr laloku v cm; c – longitudinální rozměr laloku v cm

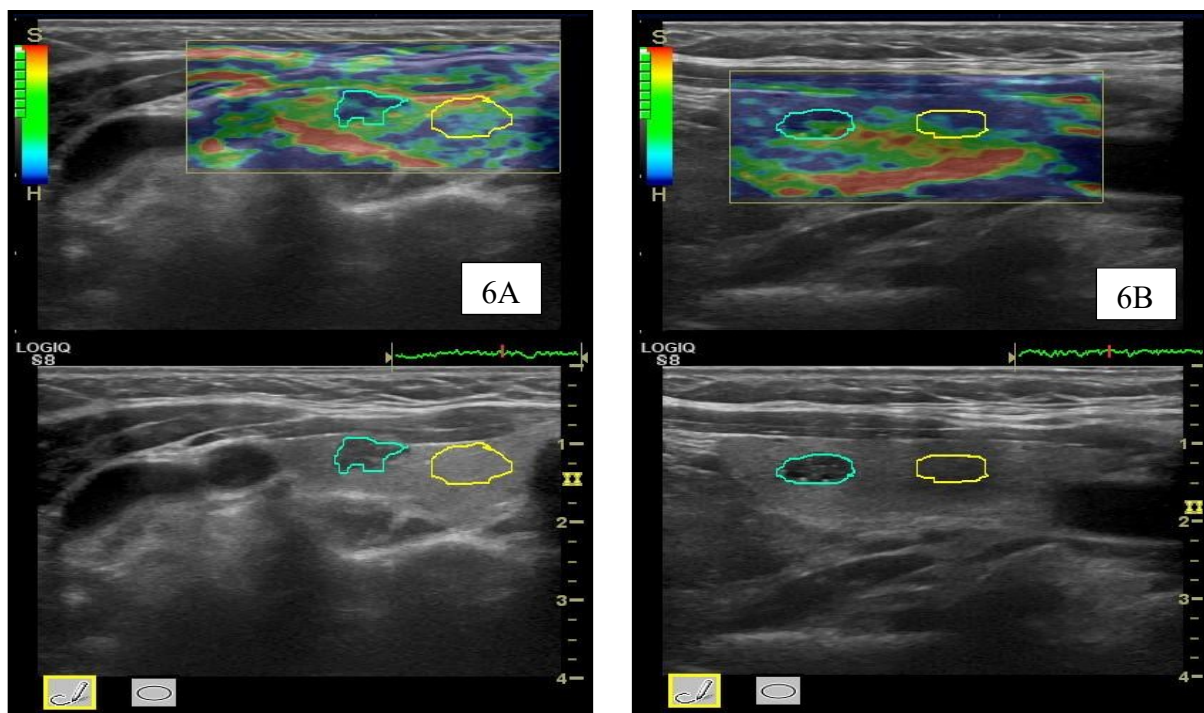
FNAB tyreoidálních uzlů byla provedena vždy v návaznosti na předchozí sonografické a elastografické vyšetření, aby nedocházelo ke zkreslení sonografického a elastografického obrazu uzlu. FNAB probíhala vždy pod přímou sonografickou kontrolou. Standardně byly z každého uzlu odebrány 2 vzorky tenkou jehlou, ze získaného materiálu byl vytvořen nátěr, který se nechal zaschnout na podložním sklíčku. Získané cytologické nátěry byly hodnoceny patologií z Patologického ústavu 1.lékařské fakulty s dlouholetou zkušeností v tyreoidální cytopatologii. K hodnocení výsledku byla použita výše zmíněná Bethesda klasifikace.

### **13.3. Elastografie**

Vyšetření elasticity tyreoidálních uzlů bylo prováděno v sonografické laboratoři 3. interní kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze s využitím přístroje GE LogiQ s integrovaným modulem pro strain elastografii. Tento přístroj umožňuje i semikvantitativní hodnocení elasticity pomocí stanovení strain ratio. Abychom předešli možnému zkreslení elasticity uzlu regresivními změnami způsobenými punkcí, podstoupili všichni pacienti elastografické vyšetření bezprostředně před provedením FNAB. Vyšetření elasticity bylo spojeno i s konvenčním ultrazvukem. Spolu s klasickým B mode sonografickým obrázkem byly vždy uloženy k následné analýze dvě pětisekundové elastografické smyčky (v transverzální a podélné rovině uzlu). Jako zdroj tlaku potřebného k SE sloužila pravidelná

rytmická komprese krku pomocí sonografické sondy. Použitý elastografický přístroj je vybaven indikátorem, který ukazuje správně provedenou kompresi. Pro další analýzu byly použity pouze ty části uložené smyčky, kde indikátor svítil zeleně.

Bylo-li to z anatomického hlediska možné, vyšetřovaná oblast zahrnovala kromě vyšetřovaného uzlu i okolní tkáň štítné žlázy, okolní krční svaly a v transverzální rovině navíc i průřez a. carotis communis. Tyto tkáně byly v následné analýze použity ke stanovení strain ratio jako alternativní kontrolní oblast. Příklady elastogramů levého laloku štítné žlázy v obou rovinách jsou uvedeny na obrázku 6.



Obrázek 6: Příklad transverzálního (6A) a podélného (6B) elastogramu tyreoidálního uzlu. Elasticita je kódována pomocí barevné škály od červené (nejelastičtější tkáň) po modrou (nejtužší tkáň) (archiv autora)

### 13.3.1. Kvalitativní hodnocení elasticity uzlu

V prvním kroku byla elasticita uzlu hodnocena kvalitativně s využitím výše uvedeného šestistupňového skórovacího systému Tsukuba (obrázek 3) (1 – celá plocha uzlu je elastická, 2

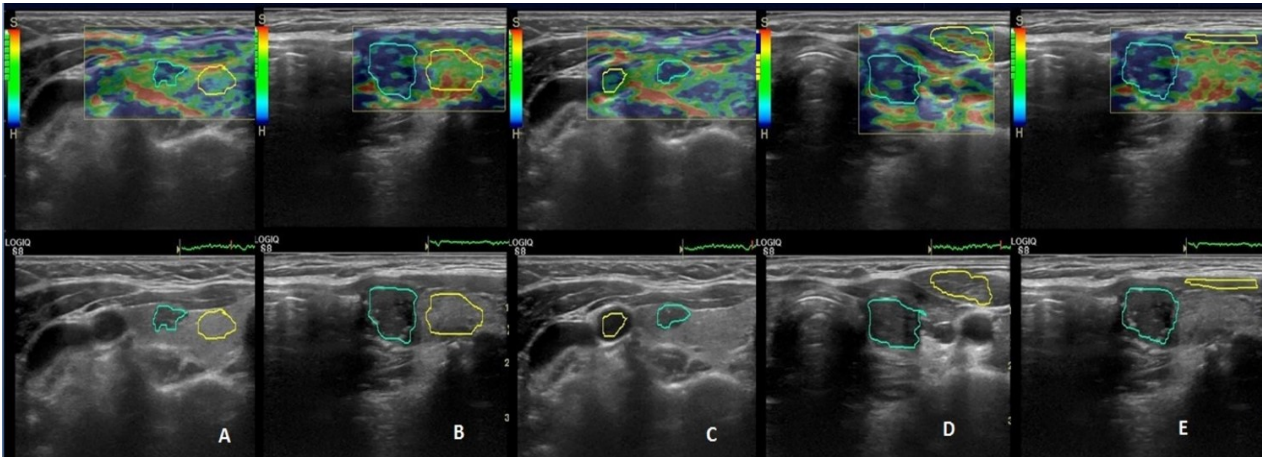
– většina plochy uzlu je elastická, 3 – elasticita v periferních částech uzlu, 4 – celý uzel se jeví jako tuhý, 5 – celý uzel a pozadí uzlu se jeví jako tuhé, BGR – typický fenomén pro cystické léze). Skóre bylo stanoveno nezávisle v obou rovinách. Za nízkorizikové uzly byly považovány ty, které získaly skóre 1, 2, 3 a BGR. Naopak za rizikové jsme považovali uzly s elastografickým skórem 4 a 5. U uzlů s pseudocystickou složkou, které však nespádaly díky solidní složce do kategorie BGR, jsme hodnotili pouze solidní složku.

### *13.3.2. Semikvantitativní hodnocení elasticity uzlu (“strain ratio”)*

Z výsledků některých starších prací vyplývala lepší vypovídající hodnota SR v porovnání s hodnocením založeným na skórovacích systémech (Razavi S. A. et al., 2013). Přístroj GE LogiQ, který jsme využívali k elastografickému vyšetření, je vybaven softwarem umožňujícím automatický výpočet SR mezi dvěma definovanými oblastmi. Za oblast zájmu jsme zvolili vyšetřovaný tyreoidální uzel. Jako kontrolní oblast jsme použili nejen okolní tyreoidální parenchym (v podélné rovině [SR-ThyL], v transverzální rovině [SR-ThyT]), ale i okolní krční svaly (infrahyoidní svaly v podélné rovině [SR-MusL] a musculus sternokleidomastoideus v příčné rovině [SR-MusT]) a průřez a. carotis communis v transverzální rovině [SR-CarT]). A. carotis communis vyplněná krví jako nestlačitelnou tekutinou se může zdát kontroverzní jako kontrolní oblast pro elastografické vyšetření, nicméně byla již v minulosti úspěšně použita v práci Zhang et al. (Zhang Y. H. et al., 2012), kteří zvolili obsah karotické tepny jako referenční oblast pro vyšetřování elasticity arteriální stěny. Navíc jsme tento přístup předem otestovali u 12 jedinců se zdravou štítnou žlázou, u kterých jsme stanovili SR mezi normálním tyreoidálním parenchymem a průřezem a. carotis communis. Získané výsledky byly velice konzistentní (střední hodnota  $0,3 \pm 0,074$ ). Obdobného výsledku jsme dosáhli i při porovnání normálního tyreoidálního parenchymu s infrahyoidními svaly (střední hodnota  $0,41 \pm 0,067$ )

Příklady všech oblastí, které byly použity pro výpočet SR, jsou uvedeny na obrázku 7. Pokud to bylo možné, byla kontrolní oblast umístěna do stejné hloubky a měla podobnou velikost a tvar jako vyšetřovaný uzel. V případě SR-MusL nebylo kvůli anatomickým podmínkám možné umístit kontrolní svalovou oblast ve stejné hloubce jako uzel. Tvar a velikost obou srovnávaných oblastí byly také odlišné. V případě uzlu s cystickou částí byla elasticita hodnocena pouze nad solidní částí uzlu. Konečná hodnota SR pro každou srovnávanou oblast byla vypočtena jako průměr 5 hodnot SR během 5sekundové smyčky. Během vyšetření a

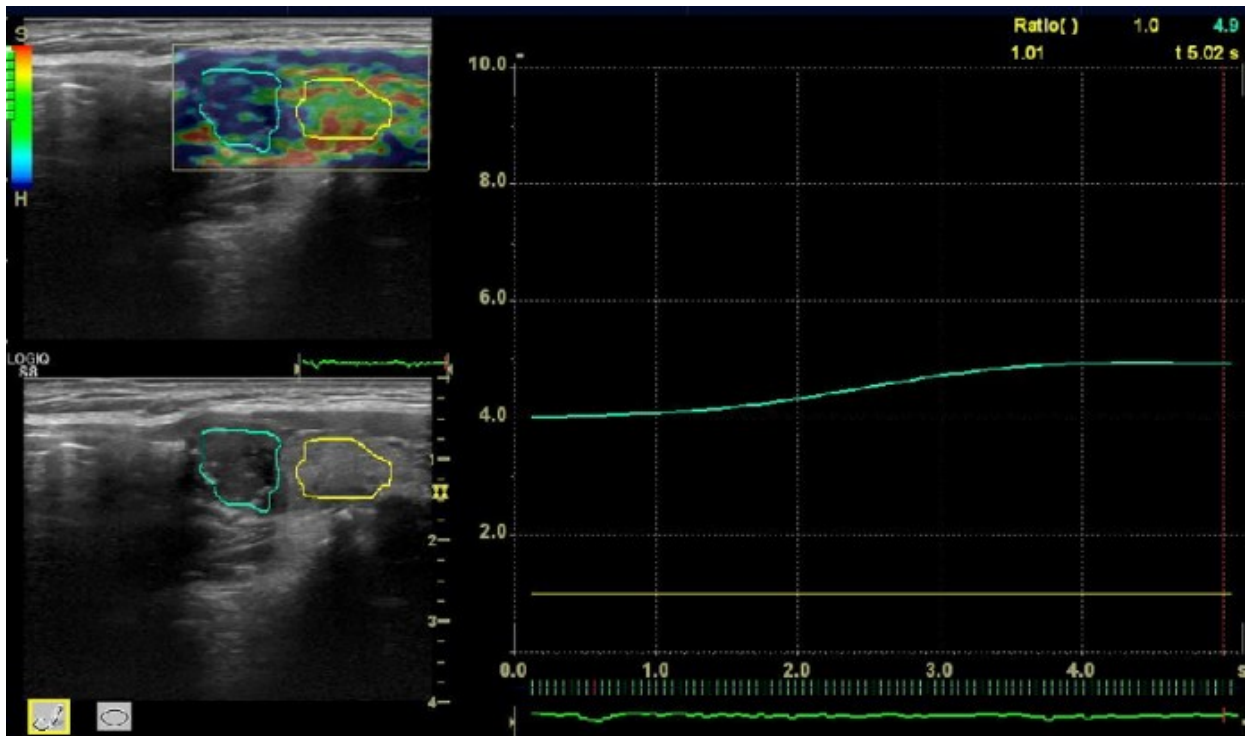
analýzy SR neznal operátor histologický ani cytologický výsledek uzlu. Elastogramy a analýza SR maligních a benigních uzlů štítné žlázy jsou znázorněny na obrázcích 8 a 9.



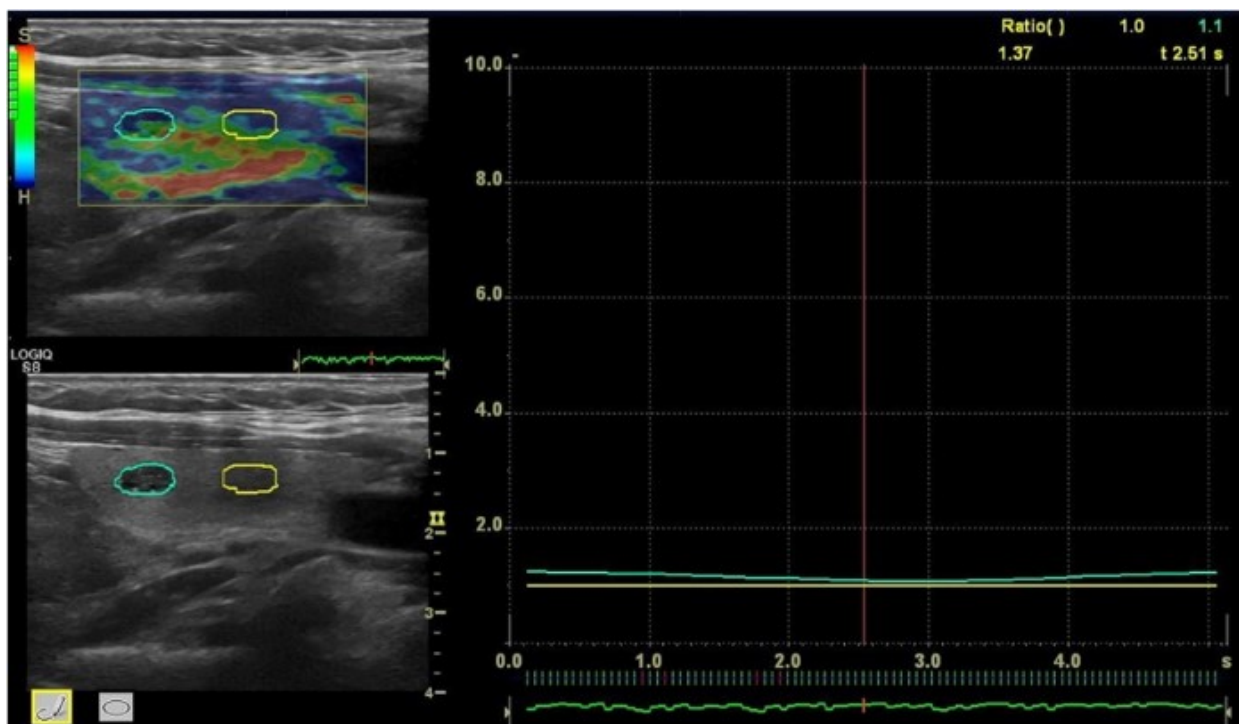
Obrázek 7 Příklady všech referenčních oblastí využitých k výpočtu strain ratio (SR) (archiv autora)

- A) porovnání uzlu s tyreoidálním parenchymem transverzálně (SR-ThyT)
- B) porovnání uzlu s tyreoidálním parenchymem longitudinálně (SR-ThyL)
- C) porovnání uzlu s průřezem a. carotis communis transverzálně (SR-CarT)
- D) porovnání uzlu s krčními svaly transverzálně (SR-MusT)
- E) porovnání uzlu s krčními svaly longitudinálně (SR-MusL)





Obrázek 8: Strain ratio (SR) papilárního karcinomu v porovnání s tyreoidálním parenchymem v longitudinální rovině (SR=4,9) (archiv autora)



Obrázek. 9: Strain ratio (SR) benigního tyreoidálního uzlu v porovnání s tyreoidálním parenchymem v longitudinální rovině (SR=1,1) (archiv autora)

### **13.4. Hodnocení vztahu tyreoidální funkce a tyreoidálních autoprotilátek k riziku malignity uzlu**

K hodnocení tyreoidální funkce jsme vyhledali nejbližší laboratorní výsledek předcházející biopsii štítné žlázy, hodnotili jsme hladinu TSH. Za normální hodnoty TSH jsme považovali rozmezí 0,5-5,0 mIU/l. Většina pacientů byla testována biochemickou laboratoří Všeobecné fakultní nemocnice. Volné tyreoidální hormony nebyly při retrospektivním hodnocení u většiny pacientů dostupné, a proto byly z analýzy vypuštěny. Do studie nebyli zařazeni žádní pacienti s centrální poruchou tyreotropní osy. Spolu s tyreoidální funkcí jsme hodnotili i to, zda pacienti užívali v období odběru (tj. před FNAB) terapii levotyroxinem.

Výsledky antityreoidálních protilátek (anti-TPO a anti-Tg) byly dostupné z různých laboratoří, které měly odlišné normy, proto jsme hodnotily pouze pozitivitu a negativitu jednotlivých protilátek. Do logistické regresní analýzy nebyla použita data týkající se anti-Tg z důvodu chybějících dat u některých pacientů, protože vyšetření anti-Tg není při pozitivních anti-TPO rutinně doporučováno (Demers L. M. and Spencer C. A., 2003).

### **13.5. Statistická analýza**

#### *Porovnání četností a absolutních hodnot*

K porovnání četností přítomnosti kvalitativních proměnných (přítomnost rizikového elastografického skóre, pozitivita anti-TPO, pozitivita anti-Tg, sonografický nálezy tyreoiditidy, přítomnost léčby levotyroxinem) jsme použili Chí-kvadrát test. Hodnoty byly vyjádřeny v procentech. Protože žádná kvantitativní proměnná neměla normální rozložení byly porovnány s využitím Mann-Whitney testu (TSH, objem štítné žlázy, SR-ThyL, SRThyT, SR-MusL, SR-MusT and SR-CarT) a byly vyjádřeny jako medián a interkvartilové rozpětí. Hodnota  $P < 0,05$  byla považována za statisticky signifikantní.

K vyhledání nezávislého prediktoru malignity jsme použili mnohočetnou logistickou regresi. Abychom eliminovali možný vliv léčby levotyroxinem, použili jsme tři odlišné modely (všichni pacienti dohromady, pouze neléčení pacienti a pouze léčení pacienti).

### *Analýza senzitivity*

Vypočítali jsme senzitivitu, specificitu, pozitivní prediktivní hodnotu (PPV) a negativní prediktivní hodnotu (NPV) pro klasické ultrazvukové rizikové faktory, pro elastografické skóre a pro všechny jednotlivé SR. Prahová hodnota, od které je v naší studii považováno jednotlivé SR za rizikové, byla vypočítána s pomocí Youdenova indexu.

## 14. Vlastní výsledky

### 14.1. Vyšetření elasticity tyreoidálních uzlů

#### Cíl práce:

Prokázat, že změny probíhající v primárních tyreoidálních karcinomech v průběhu jejich geneze a růstu jsou spojeny se změnou mechanických vlastností tkáně, které vedou ke změnám elasticity nádorové tkáně v porovnání s benigními uzly. Snížená elasticita tkáně TC zjištěná pomocí strain elastografie by mohla být jedním z nástrojů ke zlepšení neinvazivní diagnostiky tyreoidálních uzlů.

Elasticita tyreoidálních uzlů byla v práci hodnocena pomocí šestistupňového skórovacího systému a pomocí SR. S využitím SR byla porovnána relativní elasticita uzlů nejen s okolní tyreoidální tkání, ale i s krčními svaly a průřezem a. carotis communis. Tyto alternativní kontrolní oblasti byly použity s cílem umožnit stanovení SR i u pacientů, u kterých není v okolí uzlu přítomna normální tyreoidální tkáň (tj. objemné uzly, polynodozní strumy, uzly v terénu tyreoiditidy).

#### Výsledky:

##### *Porovnání četnosti a absolutních hodnot sledovaných parametrů*

Z pohledu klasických rizikových faktorů byla v této práci signifikantně asociována s maligní povahou tyreoidálního uzlu přítomnost nepravidelného okraje uzlu (16/22 [73 %] vs., 12/39 [31 %],  $p = 0,003$ ), přítomnost mikrokalcifikací (14/22 [64 %] vs., 6/39 [15 %],  $p < 0,001$ ) a přítomnost alespoň jednoho ze sledovaných konvenčních rizikových faktorů (18/22 [82 %] vs., 22/39 [56 %],  $p = 0,045$ ).

S využitím SE byly TC signifikantně tužší v porovnání s benigními uzly, rizikové elastografické skóre (4 nebo 5) bylo nalezeno u 67 % pacientů v podélném rozměru a 62 % pacientů v transverzálním rozměru, v případě benigních uzlů pouze u 11 % v podélné rovině a 21 % v transverzální rovině ( $p < 0,001$ ;  $p = 0,004$ ).

SR bylo u TC signifikantně vyšší v porovnání s benigními uzly ve všech případech kromě SR-ThyT (medián 1,69 vs. 1,3  $p = 0,1$ ). V případě ostatních referenčních oblastí rozdíl dosahoval statistické významnosti: SR-ThL (2,21 vs. 1,21  $p = 0,001$ ), SR-MusL (1,61 vs. 0,93  $P=0,007$ ), SR-MusT (1,9 vs. 0,76  $P=0,001$ ) SR-CarT (0,86 vs. 0,54  $P <0,001$ ). Výsledky jsou podrobně uvedeny v tabulce 2 následující publikace.

#### *Analýza senzitivity*

NPV elastografického skóre byla podobná jako u konvenčních sonografických faktorů (83 % vs. 81 % - alespoň 1 pozitivní rizikový sonografický faktor). Podobný výsledek byl i s využitím SR-ThyL. Nejvyšší NPV izolovanou metodou bylo dosaženo s využitím SR-CarT a SR-MusL (89 % a 92 %). Kombinací SR-MusL a konvenčního ultrazvuku stoupla NPV dokonce na 100 %. V izolované skupině pacientů s CLT byla vypočtená NPV u SR-MusL 100 % v porovnání s SR-ThyL (67 %) a elastografickým skóre (75 %). Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 4 v příloženém článku.

#### **Závěr:**

Tato práce podobně jako jiné předchozí studie ukazují, že tyreoidální onkogeneze je spojena se změnou mechanických vlastností tkáně, které způsobují, že TC se při elastografickém vyšetření jeví jako tužší v porovnání s benigními uzly.

SE tak má potenciál vylepšit neinvazivní diagnostiku tyreoidálních uzlů. S kombinovaným využitím SR a konvenčních sonografických faktorů jsme dosáhli až 100 % NPV, využití alternativních kontrolních oblastí pro stanovení SR (krční svaly, a. carotis communis) se zdá být vhodné v případech, kdy není dostupný vhodný okolní parenchym (CLT, polynodozní strumy, objemné uzly).

Článek byl publikován v časopise *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* s IF=1,685. Kompletní článek v anglickém jazyce je přiložen na následujících stránkách.

# Neck Muscles and Content of Carotid Artery as Reference Tissue for Strain Ratio – a Novel Approach to Improve the Diagnostic Performance of Thyroid Elastography?

Authors

J. Kratky<sup>1</sup>, H. Vitkova<sup>1</sup>, J. Bartakova<sup>1</sup>, J. Lukas<sup>2</sup>, J. Jiskra<sup>1</sup>

Affiliations

<sup>1</sup>Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague<sup>2</sup>Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, Na Homolce Hospital, Prague, and Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Charles University, Pilsen, Czech Republic**Key words**

- thyroid nodules
- thyroid cancer
- fine needle aspiration biopsy
- thyroid ultrasound
- elastography
- strain ratio

**Abstract**

Measurement of thyroid nodule stiffness by strain elastography already showed promising results. The aim of our study was to evaluate the diagnostic performance of elastography in predicting thyroid cancer by determination of strain ratio comparing nodule stiffness with thyroid tissue and surrounding neck tissues as well (carotid artery, neck muscles). Totally, 310 thyroid nodules in 275 patients were examined by conventional ultrasound and elastography prior to aspiration biopsy. 22(7.1%) thyroid carcinomas were histologically confirmed and included in the study. 39 benign nodules (27 confirmed by histology and 12 with benign cytology and at least 2 years stable ultrasound finding) formed control group. Elastography was evaluated qualitatively using 6-grade score and strain ratio to surrounding thyroid tissue, carotid artery and

neck muscles was determined. High-risk elastographic score (4,5) was more frequent in carcinomas (67%) compared with benign nodules (11%,  $p < 0.001$ ). Significant differences in distribution of strain were found in all studied parameters except comparison with thyroid tissue in transversal dimension. Strain ratio comparing the stiffness with neck muscles had a higher negative predictive value than elastographic score and conventional ultrasound (92 vs. 83 and 82% respectively). Moreover, the combination of ultrasound and strain ratio to neck muscles increased sensitivity and negative predictive value to 100%. Our results suggest, that strain ratio to neck muscles in combination with ultrasound seems to have good sensitivity and negative predictive value for predicting thyroid cancer and may be beneficial in cases when comparison to surrounding thyroid tissue is problematic (Hashimoto thyroiditis, multinodular goiter, large nodule).

received 13.08.2015  
 first decision 07.11.2015  
 accepted 08.12.2015

**Bibliography**

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1569359>  
 Exp Clin Endocrinol Diabetes 2016; 124: 192–197  
 © J. A. Barth Verlag in Georg Thieme Verlag KG Stuttgart - New York  
 ISSN 0947-7349

**Correspondence****J. Kratky**

3. interni klinika 1LF a VFN  
 U Nemocnice 1  
 12808 Praha 2  
 Czech republic  
 Tel.: +420/605/437 132  
 jan.kratky@vfn.cz

**Introduction**

Thyroid nodules are a very frequent pathologic condition among the common population. Management of patients with thyroid nodules represents one of the main tasks for outpatient endocrinologists. With increasing resolution of modern ultrasound (US) equipment it is possible to identify thyroid nodules in up to 76% [1,2], while only 5–15% of them are malignant [3]. The most common is papillary thyroid carcinoma (PTC) which represents 87% of thyroid malignancies [4]. The current method of choice for preoperative diagnosis of thyroid nodules is the US guided fine needle aspiration biopsy (FNAB). As the vast majority of FNABs of nodules referred to biopsy on the basis of current US criteria for suspicious lesions (>1 cm in size or marked hypoechoogenicity or irregular and microlobulated margin or present of microcalcifications or taller than wide shape) [3] yield benign, undeter-

mined or non-diagnostic results (85–95%) [5], an urgent need of more reliable non-invasive US diagnostic procedures arose in the last years. Nodule stiffness measurement using strain elastography (SE) has already shown promising results [6]. Recently, high negative predictive value (NPV) of SE for thyroid malignancy (99.1, 97.2 and 97% respectively) was found [7–9]. Most studies have shown better sensitivity and negative predictive value of SE in comparison with conventional US [10,11]. However, not all published results were consistent [12]. Moreover, elastography has several limitations, one of the most important being the fact that SE provides only the information about the relative distribution of strain in the examined area by comparing it with surrounding tissue. Therefore, the results may be biased in cases of absence of normal surrounding thyroid tissue (Hashimoto thyroiditis, multinodular goitre, thyroid lobe filled with a large nodule etc.). The aim of the study was to

evaluate the diagnostic performance of SE in the prediction of thyroid cancer by assessing the strain ratio (SR) using the comparison of thyroid nodules not only with the surrounding thyroid tissue but also with other surrounding neck tissues (neck muscles and content of common carotid artery). To our knowledge our study is the first one to test such unconventional SE approach. It is a pilot study, which tests the only available and theoretically usable neck tissues as a reference for thyroid elastography.

## Subjects and Methods



### Patients

The study was performed in the Department of Ultrasound of the Third Department of Medicine of General University Hospital and First Medical Faculty of Charles University in Prague. It was designed as a retrospective non-randomized cross-sectional study. The study protocol was approved by the Ethics Review Board of General University Hospital. Due to the retrospective character of the study a written informed consent was not required. All subjects included in the study gave oral informed consent to all study procedures.

From August 2012 to July 2014 conventional US and SE was performed in 275 patients with 310 thyroid nodules prior to FNAB. Among them 22 (7.1%) nodules (in 16 females and 6 males) with malignant or suspicious FNAB results (Bethesda III, IV, V or VI) were histologically confirmed as carcinomas (21 papillary thyroid carcinomas and 1 follicular thyroid carcinoma) and included in the study. Other 39 nodules in 31 females and 8 males formed a control group of benign lesions: 27 were confirmed by histology and 12 had benign cytology (Bethesda II) with at least 2 years of stable thyroid US finding. Patients with FNAB results belonging to Bethesda I, III and IV classes without histological confirmation and the rest of patients with Bethesda II class not meeting the criteria of 2 years of stable US finding were excluded from the analysis.

### Thyroid ultrasound and thyroid elastography

Thyroid US and SE were performed by 2 examiners (endocrinologists) with 15, respectively 5 years of experience with thyroid US and 3 years of experience with thyroid elastography.

The GE LogiQ US device with SE module was used for the examination. Each patient was scanned lying in the supine position. Using 10MHz linear ultrasound probe 2 B mode images (transversal and longitudinal), one in Doppler mode (longitudinal) and two 5-s loops (in the longitudinal and transversal dimension of the nodule) with B mode and elastogram (color coded map of elasticity overlying the B mode image) of every nodules were performed and recorded for further analysis. Tissue compression was achieved by rhythmic manual pressure applied by the probe during the SE examination. Only the part of the elastography loop, in which the green indicator of correct pressure was flashing, was used for analysis. Each transversal elastogram of the nodule contained nodule region, surrounding thyroid tissue, surrounding neck muscles and the common carotid artery. The longitudinal elastogram contained the nodule, surrounding thyroid tissue and surrounding neck muscles.

### Conventional B-mode ultrasound

The commonly used conventional US risk factors of malignant nodules (microcalcifications, marked hypoechogenicity, taller

than wide shape and irregular or microlobulated margin) were recorded in real time. For the purpose of our study, nodules with at least one of the above mentioned risk factor were considered as suspicious.

### Real-time qualitative strain elastography (elastographic score)

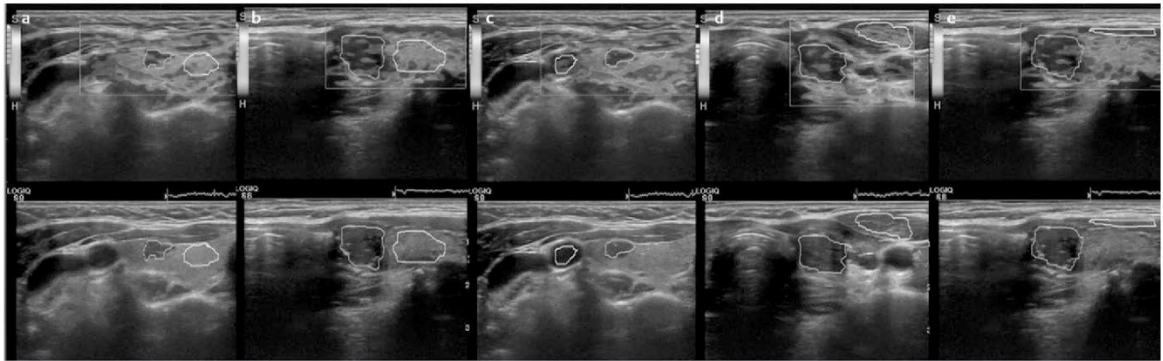
Nodule elasticity was evaluated qualitatively and 6grade Tsukuba score [13] was recorded in real time (1 – strain over the whole area of the nodule, 2 – strain over the most part of nodule, 3 – strain in the periphery of nodule, 4 – no strain over the nodule, 5 – no strain over the nodule and behind the nodule, and BGR with typical blue-green-red phenomenon, occurring in the cystic lesions). Both transversal and longitudinal score were evaluated. Afterward, the records were reviewed and the nodules with Tsukuba score 1, 2, 3 and BGR were assigned as low-risk for malignancy (probably benign) and score 4 and 5 as high-risk for malignancy (probably malign).

### Semi-quantitative elastography, strain ratio (SR)

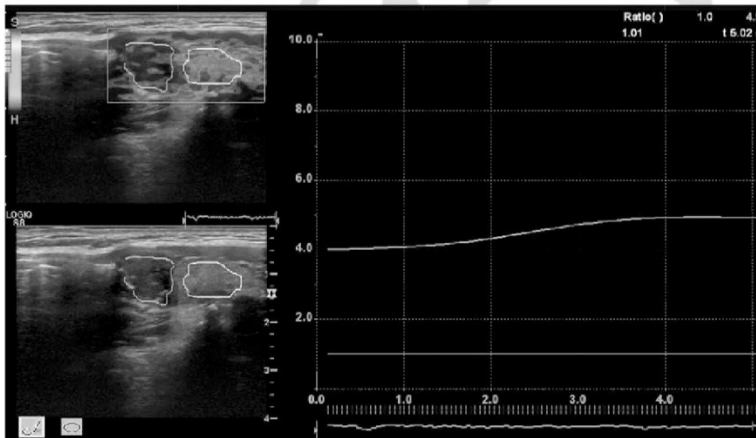
For the purpose of semi-quantitative analysis the saved loops with B mode and elastogram were reviewed and SR was calculated. The SR comparing the strain of the nodule with selected region of interest (ROI) is automatically calculated by the US machine software. We compared: 1) the strain of the nodule and surrounding normal thyroid tissue both in longitudinal (SR-ThyL) and transversal (SR-ThyT) dimension; 2) the strain of the nodule with the neck muscles (infrahyoid muscles in longitudinal [SR-MusL] and sternocleidomastoid muscle in transversal [SR-MusT] dimension); and 3) strain of the nodule with the content of carotid artery in transversal dimension (SR-CarT). The content of common carotid artery has been already used as a reference area for elastography of carotid arterial wall by Zhan et al. [14] Examples of all areas used to calculate SR are shown in **Fig. 1**. If possible, the control region was placed into the same depth and had a similar size and shape as the nodule. In case of the nodule containing a cystic part, its stiffness was evaluated only above the solid part. The final SR for each compared region was calculated as an average of 5 SR values during a 5-s loop. During the SR analysis, the operator did not know the histological result of the nodule. Elastograms and analysis of SR of malignant and benign thyroid nodules are shown in **Fig. 2,3**, respectively.

### Statistical analysis

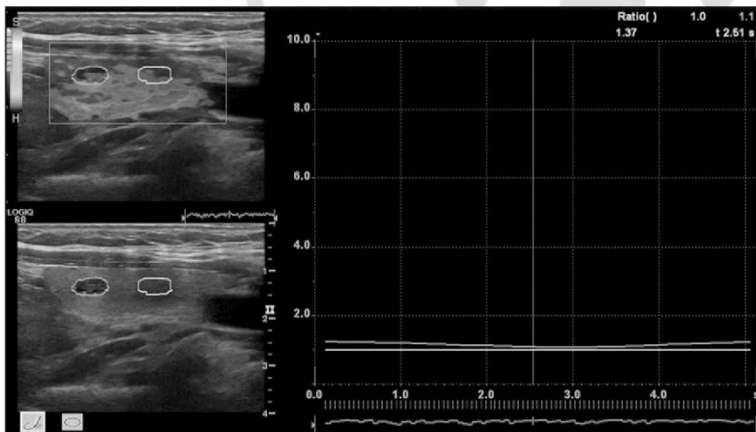
We used Chi-quadrat test and Fisher's exact test to compare the rates of low-risk and high-risk elastographic score between malignant and benign thyroid nodules and Mann-Whitney test to compare medians of SR-ThyL, SRThyT, SR-MusL, SR-MusT and SR-CarT between malignant and benign thyroid nodules. We calculated the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of conventional US risk factors, low-risk and high-risk elastographic score and of the each SR. Logistic regression and the Youden index were used to calculate the cut-off level of each SR for suspicion of malignancy. The P value <0.05 was considered as statistically significant.



**Fig. 1** Examples of all reference areas used to calculate strain ratio (SR) a SR compared to thyroid tissue in transversal dimension (SR-ThyT) b SR compared to thyroid tissue in longitudinal dimension (SR-ThyL) c SR compared to carotid artery (SR-CarT) d SR compared to neck muscles in transversal dimension (SR-MusT). E: SR compared to neck muscles in longitudinal dimension (SR-MusL).



**Fig. 2** Strain ratio of papillary thyroid carcinoma (4.9) – comparison to thyroid tissue in longitudinal dimension.



**Fig. 3** Strain ratio of benign thyroid nodule (1.1) – comparison to thyroid tissue in longitudinal dimension.

## Results

Baseline clinical parameters of analyzed patients are presented in **Table 1**. There were no significant differences between the study and the control group in gender, age, thyreotropin (TSH) serum level, free-thyroxine serum level (FT4), thyroid volume and prevalence of positive antibodies to thyroid peroxidase

(antiTPO). Conventional US characteristics of the examined nodules are listed in **Table 2**. In our study, irregular or microlobulated margin of the nodule and the presence of calcifications were significantly associated with thyroid malignancy ( $p=0.003$  and  $p<0.001$ ), while hypoechoogenicity and taller than wide shape of the nodule were not.



**Table 1** Basic clinical and biochemical parameters. TSH – thyroid stimulating hormone serum level, fT4 – free thyroxin serum level, antiTPO – antibodies to thyroid peroxidase (cut-off for positivity was 60 kIU/l).

	Carcinomas	Controls	P
Number	22	39	
Gender (male:female)	6:16	8:31	0.55
Age <sup>1</sup>	49.2 ± 16.36	54.3 ± 15.9	0.24
TSH (mIU/l) <sup>2</sup>	2.14 (0.69–3.19)	1.32 (0.70–1.76)	0.17
fT4 (pmol/l) <sup>1</sup>	14.5 ± 3.45	15.4 ± 2.1	0.26
Positive antiTPO <sup>3</sup>	10/18 (55.6%)	10/30 (33.3%)	0.11
Thyroid volume (ml) <sup>2</sup>	13.1 (8.8–15.5)	13.2 (9.5–18.5)	0.31

<sup>1</sup> expressed as mean ± standard deviation

<sup>2</sup> expressed as median (interquartile range)

<sup>3</sup> due to the retrospective character of study, antiTPO was not available in all the subjects

**Table 2** Distribution of conventional ultrasound risk factors and elastographic score in both groups. Expressed as number (%), ES: elastographic Tsukuba score.

	Carcinomas	Benign nodules	P
Marked hypoechoigenity	11/22 (50%)	13/39 (33%)	0.27
Presence of calcification	14/22 (64%)	6/39 (15%)	<0.001
Irregular or microlobulated margin	16/22 (73%)	12/39 (31%)	0.003
Central vascularisation	13/22 (59%)	22/39 (56%)	1.00
Taller than wide shape	4/22 (18%)	4/39 (10%)	0.387
At least 1 ultrasound risk factor <sup>1</sup>	18/22 (82%)	22/39 (56%)	0.045
High risk longitudinal ES (4 or 5) <sup>2</sup>	13/21 (62%)	8/38 (21%)	0.004
High risk transversal ES (4 or 5) <sup>3</sup>	14/21 (67%)	4/37 (11%)	<0.001

<sup>1</sup> positivity of one of following: marked hypoechoigenity, presence of calcification, irregular or microlobulated margin, taller than wide shape

<sup>2</sup> one carcinoma and one benign nodule were excluded from analysis due to the low quality of longitudinal elastogram

<sup>3</sup> 2 carcinomas and one benign nodule were excluded from analysis due to the low quality of transversal elastogram

Using SE, thyroid carcinomas were stiffer in comparison to benign nodules. High-risk elastographic score (4 or 5) was found in 67 and 62% of malignant nodules in transversal and longitudinal dimension respectively, while only in 11 and 21% of benign nodules ( $p < 0.001$  and  $0.004$  respectively) (Table 2).

The mean SR values of carcinomas and benign nodules are listed in Table 3. We found significant differences in the distribution of SRs between benign nodules and carcinomas in all the evaluated parameters (SR-ThyL, SR-MusL, SR-MusT and SR-CarT), except of SR-ThyT (Table 3). Using the Youden index we estimated the ideal cut-off for malignancy for each SR in our study group (Table 3).

Sensitivity, specificity, PPV and NPV of conventional ultrasound, elastographic score, SRs and combination of conventional ultrasound with SR-MusL are listed in Table 4. The NPV of elastographic score was similar to conventional ultrasound (83% for ES transversal dimension, 79% for ES longitudinal dimension, vs. 81% for conventional US), however the specificity and PPV of elastographic score was superior to conventional US (i.e. the presence of at least one conventional risk factor) The specificity of transversal ES was 89%, while reaching only 46% in conventional US (Table 4). Using conventional US 56% (22/39) of benign nodules were falsely classified as suspicious, however high-risk elastographic score (4 or 5) was found only in 11% (transversal) respectively 21% (longitudinal) of the benign nodules.

**Table 3** Mean values of strain ratio and estimated cut-offs for malignancy for different reference surrounding tissues.

	Carcinoma	Control	Cut off	P
SR-ThyL	2.21 ± 1.28	1.21 ± 0.82	1.8	0.001
SR-ThyT	1.69 ± 0.77	1.30 ± 0.84	1.1	0.100
SR-MusL	1.61 ± 1.15	0.93 ± 0.67	0.8	0.007
SR-MusT	1.9 ± 1.01	0.76 ± 0.48	0.9	0.001
SR-CarT	0.86 ± 0.37	0.54 ± 0.17	0.6	<0.001

SR-ThyL: strain ratio to thyroid tissue in longitudinal dimension, expressed as mean ± standard deviation, SR-ThyT: strain ratio to thyroid tissue in transversal dimension, expressed as mean ± standard deviation, SR-MusL: strain ratio to neck muscles in longitudinal dimension, expressed as mean ± standard deviation, SR-MusT: strain ratio to neck muscles in transversal dimension, expressed as mean ± standard deviation, SR-CarT: strain ratio to carotid artery, expressed as mean ± standard deviation.

**Table 4** Sensitivity specificity, positive and negative predictive value of conventional ultrasound, elastographic score and strain ratio.

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
At least 1 conventional US risk factor	82%	44%	45%	81%
ES transversal	67%	89%	78%	83%
ES longitudinal	62%	79%	62%	79%
SR-ThyL	53%	94%	83%	77%
SR-ThyT	75%	61%	56%	79%
SR-MusL	91%	59%	58%	92%
SR-MusT	62%	83%	68%	78%
SR-CarT	85%	66%	59%	89%
Conventional US + SR-MusL	100%	33%	46%	100%

ES: elastographic score, SR-ThyL: strain ratio to thyroid tissue in longitudinal dimension, SR-ThyT: strain ratio to thyroid tissue in transversal dimension, SR-MusL: strain ratio to neck muscles in longitudinal dimension, SR-MusT: strain ratio to neck muscles in transversal dimension, SR-CarT: strain ratio to carotid artery, US: ultrasound.

Furthermore, SR comparing nodules stiffness with surrounding thyroid tissue (SR-ThyL and SR-ThyT) had similar sensitivity and NPV compared with ES and conventional US (Table 4). However, the best results were achieved using the comparison with carotid artery (SR-CarT) and neck muscles (SR-MusL) (sensitivity 85 and 91%, NPV 89 and 92% respectively). Moreover, the combination of SR-MusL and conventional US risk factors (marked hypoechoigenity, presence of calcifications, irregular or microlobulated margin) increased the sensitivity and NPV in our group of patients to 100%, i.e. all the carcinomas were tested positive with at least one of these methods.

Finally, we separately evaluated the subgroup of patient with Hashimoto thyroiditis (i.e. subjects with positive antiTPO). This group contained 10 patients with thyroid carcinoma and 10 patients with benign lesion. Comparing all the previously described methods in patients with Hashimoto thyroiditis, the highest NPV was achieved by SR-MusL (100%), while NPV of elastographic score and SR-ThyL tissue were lower (75 and 67% respectively).

## Discussion

Thyroid nodules are a very frequent pathology, with constantly increasing incidence, which places a significant burden upon the healthcare system in terms of raising costs for diagnostic proce-

dures as well as increased workload for health professionals (endocrinologists, pathologists, radiological assistants). When analyzing samples from autopsies, the nodules could be found in up to the 76% of thyroid glands [1]. According to the current guidelines all nodules larger than 1 cm or all nodules with suspicious ultrasound finding (hypoechoic nodules, nodules with irregular or lobulated margins, taller than wide shape of the nodule and nodules with microcalcifications) are indicated for biopsy. The current method of choice is the ultrasound guided fine needle aspiration biopsy (FNAB). Since 2008, the Bethesda cytological classification is mostly used for the evaluation of specimens obtained by FNAB. Up to 33% of cytological samples (Bethesda I – nondiagnostic, Bethesda III – atypia/follicular lesion of undetermined significance, Bethesda IV – follicular neoplasm/suspicion for a follicular neoplasm) are not neither benign nor malignant [5]. If the biopsy is repeatedly undetermined or nondiagnostic, surgery with histological confirmation is recommended, though the risk of malignancy is still quite low (1–4% in Bethesda I, 5–15% in Bethesda III and 15–30% in Bethesda IV) [15], only slightly higher than the general risk of malignancy for thyroid nodules. Thus, most of these patients undergo the surgery “unnecessarily”. This, together with the high number of the patients indicated for FNAB has led in the recent years to efforts for developing new and better noninvasive diagnostic methods.

According to the results of many previous studies thyroid carcinomas seem to be stiffer than benign nodules when assessed via SE. Our data support this idea; we found significant difference in stiffness between benign and malignant nodules, using different analyzing methods of SE (Table 2,3). Unfortunately, not all the published results are consistent [12] and SE has several limitations. Qualitative analysis, which uses different scoring systems, may be influenced by the subjective view of the examiner. A potential way to minimize this influence seems to be using the SR [16], which represents a rate between the strain of 2 predefined areas. The results of meta-analysis by Razavi et al. supported this idea and proved that SR has a better sensitivity compared with the elasticity score (89 vs. 82%) [17]. However, significant limitations of SR include situation with lack of normal surrounding thyroid tissue (Hashimoto's thyroiditis, multinodular goiter or thyroid lobe fulfilled with a large nodule) and situations disabling simultaneous projection of thyroid nodule and surrounding thyroid tissue due to anatomical circumstances.

In our study group, we did not find a better sensitivity and NPV of SR-ThyL and SR-ThyT, compared with ES (ES: sensitivity 62%, NPV 79%; SR-ThyL: sensitivity 53%, NPV 77%; SR-ThyT: sensitivity 75%, NPV 79%). This might be possibly explained by the high frequency of Hashimoto thyroiditis in our study group (56% among thyroid carcinomas and 33% among controls), which could have biased the results. Inflammatory changes in Hashimoto thyroiditis reduce the elasticity in the surrounding thyroid tissue [18] and thus influence the SR. From this point of view our results suggest that a possible solution of this limitation could be to compare the nodule stiffness with the surrounding tissues on the neck. We found a better sensitivity and NPV for SR-MusL and SR-CarT, compared with elastographic score and SR-Thy (SR-MusL: sensitivity 91%, NPV 92%; SR-CarT: sensitivity 85%, NPV 89%, vs. SR-ThyL: sensitivity 53%, NPV 77%). Moreover, when analyzing data in patients with Hashimoto thyroiditis separately, we found 100% NPV for SR-MusL.

Additionally, the best results with 100% NPV were achieved by the combination of SE and conventional US (Table 4). Therefore, we believe that SE should be seen rather as a complementary method to conventional US, which improves its diagnostic performance, but should not replace it.

We found significant differences in the distribution of SRs between benign nodules and carcinomas in all the evaluated SR (SR-ThyL, SR-MusL, SR-MusT and SR-CarT), except of SR-ThyT. Therefore, the SR-ThyT seems to be less appropriate dimension for thyroid SR. Possible explanation is that compression of tissues located medially on the neck (thyroid nodule and surrounding normal thyroid tissue) may be biased by close presence of trachea and thyroid cartilage. In the cases of SR-CarT and SRMus-T dimensions the US probe is placed more laterally and therefore may give better and more constant results.

Our study has several limitations, mainly a small number of included subjects and use of common carotid artery and thin infrahyoid muscles as a reference region for assessment of SR. Content of common carotid artery as a reference region may be controversial due to the lack of strain in blood, though common carotid artery and the neck muscles seem to be the only available structures around the thyroid gland. Content of common carotid artery has been already successful used as a reference area for carotid arterial wall elasticity by Zhang et al. [14]; authors achieved consistent results in this study. Moreover, prior to thyroid nodules analysis, we tried to test this method on 12 patients with normal thyroid parenchyma and we acquired consistent results of SR-CarT (mean value  $0.3 \pm 0.074$ ). Similarly use of subcutaneous infrahyoid muscles as a reference area for SR may be connected with measurements error, due to its thin diameters. However, we tested this approach by setting SR comparing elasticity of infrahyoid muscles with the normal thyroid parenchyma. Like in case of common carotid artery, the results were consistent (mean value  $0.41 \pm 0.067$ ). The proportion of SRs between normal thyroid tissue, benign nodules and thyroid carcinomas are similar in both methods SR-CarT and SR-MUSL (1.0:1.8:2.9 vs. 1.0:2.2: 3.9)

It was a pilot proof-of-concept study, therefore, its results and their applicability will need to be verified in prospective trials on larger patient populations. Furthermore, better standardization of the investigation procedure and setting of individual examiner-specific cut-offs for each reference tissue will be required.

## Conclusion

Our results confirm that SE has the potential to improve the non-invasive diagnostic procedure for thyroid nodules. In our study, SR to neck muscles in combination with conventional US showed good sensitivity and NPV for predicting of thyroid cancer and may be favorable in cases when the comparison with surrounding thyroid tissue is problematic (Hashimoto thyroiditis, multinodular goiter, large nodule).

## Acknowledgement

This study was supported by the research project Prvok P25/LF1/2.

**Conflict of interest:** None.

## References

- 1 Vanderpump MP. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 2011; 99: 39–51
- 2 Ferraz C, Eszlinger M, Paschke R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 96: 2016–2026
- 3 Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR *et al*. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167–1214
- 4 Kamran SC, Marqusee E, Kim MI *et al*. Thyroid nodule size and prediction of cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 564–570
- 5 Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC *et al*. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol* 2012; 56: 333–339
- 6 Bojunga J, Herrmann E, Meyer G *et al*. Real-time elastography for the differentiation of benign and malignant thyroid nodules: a meta-analysis. *Thyroid* 2010; 20: 1145–1150
- 7 Mehrotra P, McQueen A, Kolla S *et al*. Does elastography reduce the need for thyroid FNAs? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 78: 942–949
- 8 Azizi G, Keller J, Lewis M *et al*. Performance of elastography for the evaluation of thyroid nodules: a prospective study. *Thyroid* 2013; 23: 734–740
- 9 Veer V, Puttagunta S. The role of elastography in evaluating thyroid nodules: a literature review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015; 272: 1845–1855
- 10 Trimboli P, Guglielmi R, Monti S *et al*. Ultrasound sensitivity for thyroid malignancy is increased by real-time elastography: a prospective multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 4524–4530
- 11 Shweel M, Mansour E. Diagnostic performance of combined elastosonography scoring and high-resolution ultrasonography for the differentiation of benign and malignant thyroid nodules. *Eur J Radiol* 2013; 82: 995–1001
- 12 Unlütürk U, Erdoğan MF, Demir O *et al*. Ultrasound elastography is not superior to grayscale ultrasound in predicting malignancy in thyroid nodules. *Thyroid* 2012; 22: 1031–1038
- 13 Itoh A, Ueno E, Tohno E *et al*. Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. *Radiology* 2006; 239: 341–350
- 14 Zhang YH, Gao Y, Su BL. Assessment of carotid arterial wall elasticity in type 2 Diabetes Mellitus Patients with microalbuminuria by real-time ultrasound elastography. *Int J Endocrinol* 2012 340974
- 15 Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Definitions, criteria and explanatory notes. New York: Springer; 2010
- 16 Cantisani V, Grazhdani H, Ricci P *et al*. Q-elastosonography of solid thyroid nodules: assessment of diagnostic efficacy and interobserver variability in a large patient cohort. *Eur Radiol* 2014; 24: 143–150
- 17 Razavi SA, Haddock TA, Sadigh G *et al*. Comparative effectiveness of elastographic and B-mode ultrasound criteria for diagnostic discrimination of thyroid nodules: a meta-analysis. *AJR Am J Roentgenol* 2013; 200: 1317–1326
- 18 Şahin M, Çakal E, Özbek M *et al*. Elastography in the differential diagnosis of thyroid nodules in Hashimoto thyroiditis. *Med Oncol* 2014; 31: 97

## 14.2. Chronická lymfocytární tyreoiditida a riziko tyreoidálního karcinomu

### Cíl práce:

Cílem této práce bylo prokázat, zda současná přítomnost CLT zvyšuje riziko maligní biologické povahy tyreoidálního uzlu. Přítomnost CLT byla posuzována podle positivity antityreoidálních autoprotilátek (anti-TPO a anti-Tg) a podle sonografického nálezu. Zároveň jsme zkoumali vliv tyreoidální funkce udávané pomocí hladiny TSH na biologickou povahu uzlu.

### Výsledky:

Celkem byla analyzována data od 2571 pacientů, kteří podstoupili FNAB tyreoidálního uzlu. Z této skupiny bylo vybráno 91 pacientů s primárním tyreoidálním karcinomem, kontrolní skupinu tvořilo 182 pacientů s benigními tyreoidálními uzly. Pozitivita anti-TPO a anti-Tg byla v této práci asociována s tyreoidálním karcinomem (pozitivita anti-TPO ve 44 % karcinomů vs. 27 % u benigních uzlů,  $p = 0,005$ ; pozitivita anti-Tg ve 35 % karcinomů vs. 21 % u benigních uzlů,  $p = 0,018$ ). Pacienti s tyreoidálními karcinomy měli signifikantně vyšší TSH (medián 1,88 mIU/l u karcinomů, vs. 1,21 u benigních uzlů,  $P < 0,001$ ). Pozitivita anti-TPO byla s využitím mnohočetné logistické regrese indentifikována jako nezávislý rizikový faktor tyreoidálního karcinomu (OR 2,21,  $p = 0,018$ ). Ve skupině pacientů, kteří nebyli léčeni levotyroxinem, byla spontánní suprese TSH pod 0,5 mIU/l protektivním faktorem přítomnosti tyreoidálního karcinomu (OR 0,3;  $p = 0,01$ ). Naopak suprese TSH, dosažená pomocí terapie levotyroxinem nebyla asociována s biologickou povahou tyreoidálního uzlu (OR 1,09,  $p = 0,914$ ). Sonografické známky tyreoiditidy se také vyskytovaly častěji u tyreoidálních karcinomů. Rozdíl však nedosahoval statistické významnosti (35 % u karcinomů, vs. 27 % u benigních uzlů,  $p = 0,16$ ). Celkový objem štítné žlázy nekoreloval s biologickou povahou uzlů. ( $p = 0,55$ ).

### Závěr:

V této práci byla přítomnost CLT (diagnostikovaná dle positivity tyreoidálních autoprotilátek) asociována s maligní biologickou povahou uzlu. Na základě tohoto výsledku však nelze CLT považovat za rizikový faktor vzniku TC. Vzhledem k tomu, že se jednalo o průřezovou studii, není možné určit, zda byly protilátky pozitivní již před vznikem tyreoidálního karcinomu, anebo zda se jednalo o součást reaktivní zánětlivé reakce v přítomnosti tyreoidálního karcinomu. Lze

však sužovat, že pacienti s tyreoidálními uzly, kteří mají pozitivní anti-TPO nebo anti-Tg zasluhují větší pozornost, především pokud mají vyšší normální nebo zvýšené hladiny TSH.

Článek byl publikován v časopise International Journal of Endocrinology s IF= 2,36. Kompletní článek v anglickém jazyce je přiložen na následujících stránkách.

## Research Article

# Positive Antithyroid Antibodies and Nonsuppressed TSH Are Associated with Thyroid Cancer: A Retrospective Cross-Sectional Study

Jan Krátký<sup>1</sup>,<sup>ORCID</sup> Jana Ježková,<sup>1</sup> Mikuláš Kosák,<sup>1</sup> Hana Vítková,<sup>1</sup> Jana Bartáková,<sup>1</sup> Miloš Mráz,<sup>2</sup> Jindřich Lukáš,<sup>3</sup> Zdenka Límanová,<sup>1</sup> and Jan Jiskra<sup>1</sup><sup>ORCID</sup>

<sup>1</sup>3rd Department of Medicine-Department of Endocrinology and Metabolism, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2, Czech Republic

<sup>2</sup>Dialectology Center, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Videňská 1958, 140 21 Praha 4, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of ENT, Surgery of Head and Neck, Na Homolce Hospital, Roentgenova 2/37, 150 00 Praha 5, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jan Krátký; [jan.kratky@vfn.cz](mailto:jan.kratky@vfn.cz)

Received 12 February 2018; Accepted 9 May 2018; Published 6 September 2018

Academic Editor: Christian-Heinz Anderwald

Copyright © 2018 Jan Krátký et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The relationship between Hashimoto's thyroiditis (HT) and thyroid cancer (TC) is a controversial topic; it remains unclear if HT acts as a risk factor of TC. The aim of our study was to compare the presence of HT and thyroid function in patients with TC and benign nodules. We analyzed 2571 patients after fine needle aspiration biopsy of thyroid nodule. Totally, 91 patients with primary TC and 182 sex- and age-matched controls were included. Positive antithyroid peroxidase (anti-TPO) and antithyroglobulin (anti-Tg) antibodies were associated with TC (anti-TPO 44% in TC vs. 27% in controls,  $P = 0.005$ , anti-TG 35% in TC group vs. 21% in controls,  $P = 0.018$ ), and the TC group had significantly higher TSH (median 1.88 mIU/l vs. 1.21 mIU/l,  $P < 0.001$ ). Using multiple logistic regression, positive anti-TPO was identified as an independent risk factor (OR 2.21,  $P = 0.018$ ), while spontaneously suppressed TSH  $< 0.5$  mIU/l was a protective factor (OR 0.3,  $P = 0.01$ ) against TC. In conclusion, nodules in subjects with positive antithyroid antibodies could be considered to have a higher risk of malignancy. However, based on our results, it is not possible to declare that TC is triggered by HT.

## 1. Introduction

Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine malignancy. Although it is still a rare disease, its incidence is growing rapidly in the last years, with approximately 14.3 new cases per 100,000 per year [1]. The most frequent histomorphological type is papillary thyroid cancer (PTC), which represents 84% of thyroid malignancies [2]. Despite extensive research, TC pathogenesis remains largely unclear with the relationship between TC and Hashimoto thyroiditis (HT) being a frequently discussed issue. HT is one of the most common autoimmune diseases, with an estimated frequency of 5–10% and with females affected 5x more likely than males are [3]. HT is characterized by T-lymphocyte infiltration of the thyroid gland, destruction of thyroid follicles, and their replacement by fibrotic tissue. The presence

of antithyroid autoantibodies [against thyroid peroxidase (anti-TPO) or against thyroglobulin (anti-Tg)] and the typical thyroid ultrasound morphology (nonhomogeneous and hypoechoic ultrasound pattern of thyroid tissue, with increased vascularization) are the diagnostic markers of HT. HT is the most common cause of hypothyroidism in iodine-sufficient areas [4].

The link between chronic inflammation and development of malignant tumors has been already proven in a number of human tumors, e.g., colorectal cancer and inflammatory bowel disease, hepatocellular carcinoma and chronic B and C hepatitis, cervical cancer, and HPV infection [5]. The possible relationship between HT and differentiated thyroid cancer has been first described by Dailey et al. in 1955 who observed frequent inflammatory cell infiltration surrounding thyroid cancer in thyroid histological samples

[6]. Since that time, many papers with inconsistent results have been published. Some authors consider preexisting HT or the presence of antithyroid antibodies as a risk factor for developing TC [7–11], whereas others do not [12, 13].

The aim of this study was to compare the prevalence of antithyroid antibodies, thyroid dysfunction, and thyroid texture and volume measured by ultrasound in patients with TC and benign nodules (controls) recruited from subjects undergoing fine needle aspiration biopsy (FNAB) of thyroid nodules in our outpatient departments. We also analyzed available data for thyroid cancer-specific mortality and recurrence of TC.

## 2. Methods

**2.1. Patients.** We retrospectively analyzed the results of all patients who underwent FNAB of thyroid nodules from 2006 to 2014 in 3 different outpatient departments in Prague and the Central Bohemian Region of the Czech Republic with sufficient iodine supply. The analysis included a total of 2571 patients with 2955 FNABs. Most of the patients (72%) were followed up at the 3rd Medical Department-Department of Endocrinology and Metabolism First Faculty of Medicine, Charles University, in Prague. It was designed as a retrospective nonrandomized cross-sectional study.

Among subjects recommended for thyroid surgery, we identified individuals with histologically verified primary TC and included them into our study. For each patient with TC, we randomly selected two benign age- and sex-matched individuals who formed the control group. To be included in the control group, the patient had to meet following criteria: (1) benign cytology (Bethesda II), (2) benign histology or no significant progression or suspicious character of the nodule during at least one year of ultrasound follow-up, (3) available thyroid ultrasound and thyroid biochemical parameters (thyroid-stimulating hormone (TSH), anti-TPO, and anti-Tg) before thyroid biopsy. Furthermore, we analyzed the medical history of enrolled subjects for levothyroxine therapy. We did not distinguish what the primary goal of levothyroxine therapy was (substitution of hypothyroidism or suppression therapy).

**2.2. FNAB and Thyroid Ultrasound.** Thyroid ultrasounds and FNABs were performed by two endocrinologists with at least 10 years of experience with thyroid ultrasound and biopsy. The decision to perform a FNAB was based on current guidelines for thyroid nodule diagnosis, and the procedure was guided by ultrasound. The cytopathology results were classified using the Bethesda reporting system [14]. The samples obtained prior to the introduction of Bethesda classifications were reclassified for the purpose of this study.

Hypochoic and nonhomogeneous thyroid texture was considered a positive ultrasound finding of HT. The total thyroid volume was calculated as a sum of both thyroid lobes. The volume of each lobe was calculated by multiplying its 3 dimensions and factor 0.479.

All subjects included in the study gave informed consent with FNAB in agreement with standards of the departments.

Due to the retrospective character of the study, no additional informed consent was required.

**2.3. Statistical Analysis.** Positivity of anti-TPO and anti-Tg, presence of ultrasound signs of HT, and levothyroxine therapy were expressed in percent, and the chi-square test was used to compare statistical significance between malignant and benign thyroid nodules. TSH and thyroid volume were expressed in median (interquartile range), and the Mann–Whitney test was used to compare statistical significance between both study groups.  $P$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

Furthermore, multiple logistic regression was performed to identify independent predictors of thyroid malignancy. Three different models were used with a primary analysis of all study subjects together followed by a subsequent separate analysis of patients with and without levothyroxine therapy. Anti-Tg was not used for multivariate logistic regression because of missing data in some malignant patients.

## 3. Results

We analyzed data from 2571 patients with 2955 FNABs of thyroid nodules. Table 1 shows the distribution of the thyroid cytology findings according to the Bethesda classification. In total, we found 113 malignancies. Among them, 22 were excluded from the analysis (6 thyroid lymphomas, 8 metastases, and 8 primary TC due to missing other data). Finally, we included 91 patients with primary TC (79 PTCs, 10 follicular thyroid cancers (FTC), 1 medullary thyroid cancer (MTC), and 1 poorly differentiated thyroid cancer) and available thyroid biochemical parameters and ultrasound into the study.

The randomly chosen control group contained 182 consecutive sex and age-matched patients with benign (Bethesda II) cytology result (50 with benign thyroid nodule histology and 132 with ultrasound-stable nodule). Baseline parameters (age, gender) of both groups are listed in Table 2.

We found a significant association between the positivity of both antithyroid antibodies (anti-TPO and anti-TG) and thyroid malignancy (positivity of anti-TPO 44% in TC group vs. 27% in patients with benign nodules,  $P = 0.005$ , positivity of anti-TG 35% in TC group vs. 21% in patients with benign nodules,  $P = 0.018$ ) (Table 2). The group with TC had significantly higher TSH levels compared to the benign group (median 1.88 mIU/l vs. 1.21 mIU/l,  $P < 0.001$ ). Ultrasound signs of Hashimoto's thyroiditis were also more common in the TC group, but the difference did not reach statistical significance (35% vs. 27%,  $P = 0.16$ ). Overall, 49% (45/91) patients with TC had at least one positive marker of HT (anti-TPO, anti-Tg, or ultrasound signs of HT) in comparison with 41% (75/182) in benign controls. Thyroid volume and levothyroxine therapy did not significantly differ between patients with malignant and benign subjects. All results are shown in Table 2.

**3.1. Results of Multiple Logistic Regression Analysis.** The results of multivariate logistic regression analysis are shown in Table 3. Positive anti-TPO was independently associated with 2.21 times increased risk of TC compared to the

TABLE 1: The distribution of Bethesda score among 2955 fine needle aspiration biopsies.

Bethesda score	I	II	III	IV	V	VI
Number of biopsies	339 (11.5%)	2253 (75.2%)	214 (7.2%)	49 (1.7%)	60 (2.0%)	37 (1.4%)

TABLE 2: Characteristics of patients with thyroid cancer and benign nodules. Thyroid hormone therapy, positivity of anti-TPO and anti-Tg, ultrasound signs of Hashimoto's thyroiditis, TSH &lt;0.5 mIU/l, TSH &gt;5 mIU/l, TV &gt;75, and percentile and thyroid volume &lt; 25. Percentiles are expressed in percent.

	Malignant	Benign	P
Age	57 (41–66)	57 (41–66)	0.95
Gender (M:F)	20:71	40:142	1
Levothyroxine therapy	21/91 (23%)	47/182 (26%)	0.72
Thyroid volume (ml)	13.8 (9.5–19.5)	12.7 (9–18.5)	0.55
TSH (mIU/l)	1.88 (0.92–2.93)	1.21 (0.59–1.87)	<0.001
Positivity of anti-TPO	40/91 (44%)	49/182 (27%)	0.005
Positivity of anti-Tg <sup>1</sup>	27/78 (35%)	36/174 (21%)	0.018
Ultrasound signs of Hashimoto's thyroiditis	32/91 (35%)	49/182 (27%)	0.16
TSH under 0.5 (mIU/l)	11/91 (12%)	40/182 (22%)	0.029
TSH over 5 (mIU/l)	5/91 (5.5%)	7/182 (3.8%)	0.53
Thyroid volume > 75. percentile (18 ml)	24/85 (28%)	48/175 (27%)	0.78
Thyroid volume < 25. percentile (9 ml)	21/85 (25%)	39/175 (22%)	0.66

TSH and thyroid volume are expressed in median (interquartile range). TSH: thyroid-stimulating hormone; anti-TPO: antibodies against thyroid peroxidase; anti-Tg: antibodies against thyroglobulin. <sup>1</sup>17 malignant patients were excluded from anti-Tg analysis due to missing anti-Tg results.

TABLE 3: Results of multivariate analysis.

	All patients		Without levothyroxine therapy		With levothyroxine therapy	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Positive anti-TPO	2.21 (1.14–4.28)	0.018	2.28 (1.01–5.12)	0.047	1.91 (0.59–6.21)	0.281
Ultrasound signs of Hashimoto's thyroiditis	1.13 (0.57–2.24)	0.74	1.30 (0.55–3.06)	0.552	0.86 (0.25–2.91)	0.810
Levothyroxine therapy	0.69 (0.36–1.33)	0.27	—	—	—	—
TSH <0.5 mIU/l	0.41 (0.19–0.88)	0.02	0.30 (0.12–0.75)	0.010	1.09 (0.23–5.16)	0.914
Thyroid volume > 75th percentile (18 ml)	1.21 (0.65–2.24)	0.56	1.51 (0.77–2.96)	0.234	0.30 (0.03–2.72)	0.282

TSH: thyroid-stimulating hormone; anti-TPO: antibodies against thyroid peroxidase; anti-Tg: antithyroglobulin antibody. Antibodies against thyroglobulin were excluded from the multivariate regression analysis due to missing data.

patients with anti-TPO within the normal limits. On the contrary, patients with TSH levels under the normal range (<0.5 mIU/l) had 2.4 times lower risk of TC. Similar results were obtained when excluding subjects treated with levothyroxine from the analysis (2.28 times increased risk of TC for positive anti-TPO and 3.3 times reduced risk of TC for TSH <0.5 mIU/l). In the subgroup of patients treated with levothyroxine, neither positive anti-TPO nor TSH <0.5 mIU/l were associated with malignancy. The risk of thyroid nodule malignancy was slightly rising with increasing levels of TSH (OR 1.249 (1.028–1.517,  $P=0.025$ )) and thyroid volume (OR 1.037 (1.009–1.066,  $P=0.009$ )).

**3.2. Recurrence of Thyroid Cancer and Thyroid Carcinoma-Specific Mortality.** The follow-up data were available in 73

patients with TC. The median of follow-up was 63 months. Totally, we found 2 cases (2.7%) of TC-specific death. Both were in elderly patients (81 and 83 years old) with primary advanced disease with distant metastasis. One of them had positive antithyroid antibodies. In two additional patients, the local neck recurrence was treated by additional surgery and radioiodine. Both had negative antithyroid antibodies. In total, 94.5% of patients with TC were disease-free during the follow-up after initial treatment (surgery with or without radioiodine ablation).

#### 4. Discussion

The overall risk of malignancy among patients with thyroid nodules undergoing FNAB reached 4.4% in our study,



which is to a small extent lower than the value posted in the latest guidelines of the American Thyroid Association for thyroid nodules (7–15%) [15]. The most likely explanation is that in our department we more often performed FNAB in lesions smaller than 1 cm and/or in lesions with less suspicious appearance. This could be supported by a slightly different distribution of cytological findings within the Bethesda classification system in our study, with a somewhat higher prevalence of Bethesda II (benign) category and lower prevalence of Bethesda III–VI as compared to the meta-analysis of Bongiovanni et al. (75.2% vs. 59.3%) [16].

Our results suggest that patients with elevated antithyroid antibodies may have a higher risk of thyroid nodule malignancy. Analogically to previous studies [7, 10] we found positive anti-Tg more frequently in patients with TC (35%) compared to those with benign nodules (21%). Unlike the above-mentioned studies, in our study also positive anti-TPO was significantly associated with malignant nodules (44% vs. 27%). Moreover, using multivariate logistic regression, positive anti-TPO was identified as an independent predictor of thyroid nodule malignancy increasing the risk 2.28 times compared to anti-TPO-negative patients.

In contrast, HT diagnosed according to the ultrasound criteria was not associated with TC. We observed only a non-significant trend towards higher prevalence of an HT ultrasound pattern in patients with TC. An important role is certainly played by the fact that the subjective view of the examiner only assesses the ultrasound character of thyroiditis. Another explanation might be that the presence of tumor cells could cause only local inflammatory reaction with the thyroid-specific antibody production, but without typical ultrasound signs. This idea is also supported by the finding that 13 of our 91 patients with TC showed positivity of at least one of antithyroid antibodies and normal ultrasound of the rest of thyroid parenchyma; however, only 2 of 91 patients with TC had ultrasound changes with negative antibodies. The reactive peripheral lymphocytic infiltration had been described as an immune response in many other human tumors [17]. Moreover, the typical ultrasound pattern of HT probably depends on disease duration, e.g. may be fully developed in long-lasting HT while could be absent in early stage of disease.

Both diseases—PTC as the most common form of TC and HT—share some clinical and genetic features. PTC, similar to HT, occurs more frequently in women, in connection with exposure to ionizing radiation and in areas with sufficient iodine intake [18]. Similarly, RET/PTC rearrangement, which results in a permanently active receptor with tyrosine kinase activity, is associated with PTC, more frequently on the background of HT [19]. Moreover, RET/PTC rearrangement has also been found in benign lesions, particularly HT. One hypothesis is that the inflammatory microenvironment of HT may increase the risk of RET/PTC rearrangement, which finally with other DNA changes can lead to the development of thyroid malignancy [19]. Unfortunately, due to the retrospective character of the study, we were not able to evaluate RET/PTC rearrangement in TC tissue samples to confirm this hypothesis.

The relationship between Grave's disease and TC is also unclear, and there is not enough data in the literature for this topic. However, there are some literature data suggesting that the presence of the thyroid nodule in Grave's patients is associated with a higher risk of malignancy [20] and high levels of activating anti-TSH receptor antibodies may stimulate tumor cells similarly to elevated TSH levels, thereby increasing tumor growth, invasiveness, and aggressiveness [21]. Long-term treatment with thyrostatic drugs is considered as a risk factor for the development of TC.

Considering the above-mentioned facts, patients with thyroid nodules and positive antithyroid antibodies deserve a more attentive approach. This includes, e.g., FNAB in smaller lesions (<1 cm) or considering surgery in case of indeterminate (Bethesda III/IV) cytology. Moreover, in this context, it is only secondary whether HT is a risk factor for developing TC or the more frequent positivity of antithyroid antibodies in patients with TC is caused solely by the local immune response.

Similarly to Boelaert et al., we found a positive association between TSH levels and risk of TC [22], suggesting that the higher TSH levels in patients with HT could be one of the mechanisms of TC genesis. According to the logistic regression, the risk of thyroid malignancy was slightly growing with increasing TSH and thyroid volume. Chronic TSH stimulation of the thyroid may thus lead to the growth of the whole gland and increase the risk of malignancy. However, the association of thyroid volume and malignancy was very weak and probably did not have clinical significance. Interestingly, patients with TSH levels under the normal range (<0.5 mIU/l) had 2.4 times lower risk of TC (OR 0.41). However, this lower risk was observed only in the subgroup of patients who were not taking thyroxine, e.g., with spontaneous TSH suppression. On the other hand, artificial TSH suppression, achieved by thyroxine-containing pills, was not associated with a lower risk of malign nodules. Similarly, Fiore et al. observed more frequent TSH suppression below the low normal range in patients with benign nodules compared to those with PTC [23]. The fact that this protective effect of TSH suppression was not observed in patients treated by levothyroxine could be also explained by malignant nodules having primarily more suspicious ultrasound features which could possibly lead to more frequent initiation of levothyroxine treatment.

During the follow-up (median 63 months), 2 cases of regional recurrence were observed, both in patients without HT. This finding was consistent with literature that coincidence of HT is associated with a lower risk of TC recurrence [9].

Our study has several limitations. Although we analyzed data from a relatively high number of patients (2571), only 91 patients with primary TC were included into the analysis. Moreover, only 27% of benign controls had benign histology. All others were considered as benign upon the ultrasound and cytology criteria. Due to the retrospective character of the study, we were unable to decide, whether thyroid autoimmunity is the cause or the consequence of the more frequent occurrence of TC.

Another limitation was a potential selection bias due to the fact that most of our patients were recruited from an endocrine outpatient department with high frequency of hypothyroidism. This is also the reason for such a high prevalence of HT in our patients (anti-TPO positivity 44% in malignant nodules vs. 27% in benign nodules).

## 5. Conclusion

In our study, we found higher prevalence of positive antithyroid antibodies in patients with TC compared to those with benign nodules. Positive anti-TPO was identified as an independent factor of thyroid nodule malignancy. Patients with benign nodules had significantly lower TSH levels compared to those with primary TC, and spontaneous TSH suppression was identified as an independent protective factor. Although based on our results it is not possible to conclude that TC is routinely triggered by HT, subjects with positive antithyroid antibodies and thyroid nodules deserve a more intense diagnostic and follow-up approach, particularly when having TSH in the upper part of normal range or elevated.

## Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This study was supported by the research project Progres Q25.

## References

- [1] L. Davies and H. G. Welch, "Current thyroid cancer trends in the United States," *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, vol. 140, no. 4, pp. 317–322, 2014.
- [2] B. Aschebrook-Kilfoy, M. H. Ward, M. M. Sabra, and S. S. Devesa, "Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992–2006," *Thyroid*, vol. 21, no. 2, pp. 125–134, 2011.
- [3] D. S. A. McLeod and D. S. Cooper, "The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity," *Endocrine*, vol. 42, no. 2, pp. 252–265, 2012.
- [4] M. P. J. Vanderpump and W. M. G. Tunbridge, "Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism," *Thyroid*, vol. 12, no. 10, pp. 839–847, 2002.
- [5] F. Balkwill and A. Mantovani, "Inflammation and cancer: back to Virchow?," *The Lancet*, vol. 357, no. 9255, pp. 539–545, 2001.
- [6] M. E. Dailey, S. Lindsay, and R. Skahen, "Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland," *Archives of Surgery*, vol. 70, no. 2, pp. 291–297, 1955.
- [7] E. S. Kim, D. J. Lim, K. H. Baek et al., "Thyroglobulin antibody is associated with increased cancer risk in thyroid nodules," *Thyroid*, vol. 20, no. 8, pp. 885–891, 2010.
- [8] L. Zhang, H. Li, Q. H. Ji et al., "The clinical features of papillary thyroid cancer in Hashimoto's thyroiditis patients from an area with a high prevalence of Hashimoto's disease," *BMC Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 610, 2012.
- [9] J. H. Lee, Y. Kim, J. W. Choi, and Y. S. Kim, "The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis," *European Journal of Endocrinology*, vol. 168, no. 3, pp. 343–349, 2013.
- [10] G. Azizi, J. M. Keller, M. Lewis et al., "Association of Hashimoto's thyroiditis with thyroid cancer," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 21, no. 6, pp. 845–852, 2014.
- [11] X. Liu, L. Zhu, D. Cui et al., "Coexistence of histologically confirmed Hashimoto's thyroiditis with different stages of papillary thyroid carcinoma in a consecutive Chinese cohort," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2014, Article ID 769294, 7 pages, 2014.
- [12] E. Fiore, T. Rago, M. Scutari et al., "Papillary thyroid cancer, although strongly associated with lymphocytic infiltration on histology, is only weakly predicted by serum thyroid autoantibodies in patients with nodular thyroid diseases," *Journal of Endocrinological Investigation*, vol. 32, no. 4, pp. 344–351, 2009.
- [13] F. Gabalec, L. Srbova, M. Nova et al., "Impact of Hashimoto's thyroiditis, TSH levels, and anti-thyroid antibody positivity on differentiated thyroid carcinoma incidence," *Endokrynologia Polska*, vol. 67, no. 1, pp. 48–53, 2016.
- [14] E. S. Cibas, S. Z. Ali, and NCI Thyroid FNA State of the Science Conference, "The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 132, no. 5, pp. 658–665, 2009.
- [15] B. R. Haugen, E. K. Alexander, K. C. Bible et al., "2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association Guidelines Task Force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer," *Thyroid*, vol. 26, no. 1, pp. 1–133, 2016.
- [16] M. Bongiovanni, A. Spitale, W. C. Faquin, L. Mazzucchelli, and Z. W. Baloch, "The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: a meta-analysis," *Acta Cytologica*, vol. 56, no. 4, pp. 333–339, 2012.
- [17] S. Shu, G. E. Plautz, J. C. Krauss, and A. E. Chang, "Tumor immunology," *JAMA*, vol. 278, no. 22, pp. 1972–1981, 1997.
- [18] L. L. Cunha, R. C. Ferreira, M. A. Marcello, J. Vassallo, and L. S. Ward, "Clinical and pathological implications of concurrent autoimmune thyroid disorders and papillary thyroid cancer," *Journal of Thyroid Research*, vol. 2011, Article ID 387062, 13 pages, 2011.
- [19] M. Muzza, D. Degl'Innocenti, C. Colombo et al., "The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies," *Clinical Endocrinology*, vol. 72, no. 5, pp. 702–708, 2010.
- [20] A. A. Tam, C. Kaya, F. B. M. Kılıç, R. Ersoy, and B. Çakır, "Thyroid nodules and thyroid cancer in Graves' disease," *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, vol. 58, no. 9, pp. 933–938, 2014.
- [21] A. Belfiore, D. Russo, R. Vigneri, and S. Filetti, "Graves' disease, thyroid nodules and thyroid cancer," *Clinical Endocrinology*, vol. 55, no. 6, pp. 711–718, 2001.

- [22] K. Boelaert, J. Horacek, R. L. Holder, J. C. Watkinson, M. C. Sheppard, and J. A. Franklyn, "Serum thyrotropin concentration as a novel predictor of malignancy in thyroid nodules investigated by fine-needle aspiration," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 91, no. 11, pp. 4295–4301, 2006.
- [23] E. Fiore, T. Rago, M. A. Provenzale et al., "Lower levels of TSH are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer in patients with thyroid nodular disease: thyroid autonomy may play a protective role," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 16, no. 4, pp. 1251–1260, 2009.

## 15. Diskuze

Tyreoidální uzly patří mezi velmi časté patologie. Ukazuje se, že spolu se vzrůstající citlivostí moderních zobrazovacích přístrojů lze určité uzlové změny prokázat téměř u 70% populace, výskyt uzlů stoupá s věkem a je častější u žen (Guth S. et al., 2009). Z pohledu klinického lékaře je nejdůležitějším a zároveň nejnáročnějším úkolem včasná diagnostika tyreoidální malignity. Vzhledem k vysoké incidenci uzlů a dnes již velmi snadné dostupnosti citlivých sonografických přístrojů pacientů s touto problematikou extrémně přibývá. To přináší zvýšené finanční a personální nároky na celý zdravotní systém.

Výskyt tyreoidálního karcinomu sice v posledních desetiletí výrazně vzrůstá, zdá se však, že to je především na úkor lepší diagnostiky drobných, klinicky méně významných lézí. Celková mortalita na tyreoidální karcinom se totiž nemění. Ani zavedení screeningových opatření nevede k poklesu mortality, ačkoliv zvyšuje počty nově diagnostikovaných karcinomů. (Ahn H. S. et al., 2014). V posledních dekádách je tedy vyvíjena snaha o zlepšení neinvazivní anebo minimálně invazivní diagnostiky tyreoidálních uzlů. Cílem je najít nové rizikové faktory klinicky signifikantního tyreoidálního karcinomu. Touto problematikou jsem se zabýval ve své práci, konkrétně vztahem tyreoidální onkogeneze a mechanických vlastností tyreoidální tkáně a vztahem tyreoidální autoimunity k riziku tyreoidálního karcinomu.

### 15.1. Elasticita tyreoidálních uzlů

Výsledky naší práce, podobně jako jiné práce (Azizi G. et al., 2013, Bojunga J. et al., 2010, Rago T. et al., 2007, Trimboli P. et al., 2012) ukazují, že s využitím ultrazvukové strain elastografie jsou tyreoidální karcinomy tužší a mají tedy nižší tkáňovou elasticitu v porovnání s benigními tyreoidálními uzly. Tento rozdíl byl statisticky signifikantní pomocí kvalitativní analýzy s využitím Tsukuba skóre, a to v obou rovinách (longitudinální i transverzální) vyšetřovaného uzlu. Rizikové skóre, za které jsme považovali hodnotu 4 nebo 5 (tj. uzly, které nejsou elastické nad celou svojí plochou anebo uzly, které nejsou elastické nad celou plochou a zároveň je snížena elasticita tkáně i dorzálně za uzlem), jsme našli u 67 % karcinomů při vyšetření v transverzální rovině a u 62 % karcinomů při vyšetření v longitudinální rovině oproti

11 % benigních uzlů v transversální rovině ( $p < 0,001$ ) a 21 % benigních uzlů v longitudinální rovině ( $p = 0,004$ ).

Rozdíl mezi elasticitou obou skupin jsme pozorovali také při využití semikvantitativního hodnocení pomocí SR, které porovnává relativní elasticitu uzlu s předem definovanou referenční oblastí, v tomto případě okolní tyreoidální tkání. Distribuce SR se však statisticky signifikantně lišila pouze v longitudinální rovině (průměr SR-ThyL 2,21 u karcinomů, vs. 1,21 u benigních uzlů;  $p=0,001$ ). V případě transversálního rozměru byl naznačen trend, který však nedosahoval statistické významnosti (průměr SR-ThyT 1,6 u karcinomů, vs. 1,3 u benigních uzlů;  $p = 0,1$ ; viz. tabulka 3 v příloženém článku). Navíc pokud jsme dopočítali senzitivitu, specificitu, negativní prediktivní hodnotu (NPV) a pozitivní prediktivní hodnotu (PPV) (viz. tabulka 4 v článku), ukázalo se, že negativní elastografické skóre (skóre 1, 2 nebo 3) v naší skupině pacientů dosahuje mírně lepší NPV v porovnání s SR (transverzálně 83 % vs. 79 %). NPV lze považovat za nejdůležitější vlastnost testu, který má sloužit k vyloučení vyšetřované patologie, protože udává, s jakou pravděpodobností není daná patologie přítomna v případě, že byl test negativní. Mírně horší výsledky SR jsou částečně v rozporu s některými literárními zdroji. Například výsledky meta-analýzy Razavi et al. totiž naopak poukazyvaly na lepší výsledky SR v porovnání s elastografickým skóre (Razavi S. A. et al., 2013).

Vysvětlením této diskrepance je pravděpodobně vysoký výskyt CLT v naší skupině pacientů (56 % pacientů s tyreoidálním karcinomem mělo pozitivní anti-TPO). Jak již prokázal Sahin et al. změny v okolní tyreoidální tkáni vyvolané zánětem snižují výtěžnost SR v diagnostice tyreoidálních uzlů (Sahin M. et al., 2014). Infiltrace zánětlivými buňkami, fibrotizace a edém tkáně může totiž snižovat elasticitu zánětlivě přestavěného parenchymu štítné žlázy a může vést k falešnému snížení poměru relativní elasticity mezi vyšetřovaným uzlem a okolní tkání. CLT v okolním pozadí tedy může vést k falešně negativnímu SR tyreoidálního karcinomu. K limitacím SR patří i další stavy, které způsobují absenci dostatečného množství okolního normálního tyreoidálního parenchymu. Kontrolní oblast totiž musí být v podobné hloubce a měla by mít přibližně stejný tvar a plochu jako vyšetřovaný uzel. Mezi tyto stavy patří například: polynodozní přestavba štítné žlázy, objemné uzly vyplňující podstatnou část laloku štítné žlázy, isthmická lokalizace uzlu, přítomnost objemných tkáňových kalcifikací, nebo pseudocyst (Cantisani V. et al., 2015).

Problematické může být také vyšetření uzlů s četnými drobnými dutinami, vyplněnými tekutinou (spongiformní uzly). Riziko malignity je však u takovýchto uzlů velmi nízké – menší

než 3 % (Haugen B. R. et al., 2016) a to i přesto, že se při běžném elastografickém vyšetření zobrazují jako tuhá tkáň. Kapalina, jako nestlačitelná hmota, je totiž málo elastická. Při elastografickém vyšetření smíšených solidně-cystických uzlů je třeba hodnotit pouze solidní porci uzlu (Bhatia K. S. et al., 2011). U uzlů, které jsou skryté v hloubce „pod“ tekutinou pseudocysty nebo jsou v jejím těsném kontaktu je elastografické vyšetření velmi problematické a jde tak o další limitaci elastografie.

Výše uvedené skutečnosti mě vedly k myšlence využít jako kontrolní oblast jiné dostupné krční struktury, které nejsou ovlivněny souběžnou tyreoidální patologií a umožňují vyšetření i v případě, že není dostupné dostatečné množství okolního tyreoidálního parenchymu. Za referenční oblast jsme zvolili okolní krční svaly – v transverzálním řezu musculus sternocleidomastoideus (SR-MusT), v longitudinální řezu infrahyoidní svaly (SR-MusL). Další referenční oblast představoval průřez a. carotis communis v transverzální rovině (SR-CarT). Krev jako nestlačitelná kapalina může být považována za kontroverzní referenční oblast pro stanovení SR, nicméně byla již využita v práci Zhang et al., který využil obsah arterie jako referenční oblast k vyšetření elasticity cévní stěny. (Zhang Y. H. et al., 2012). Navíc před analýzou tyreoidálních uzlů jsme tuto metodu otestovali na 12 pacientech s normální štítnou žlázou a získali jsme velice konzistentní výsledky SR, které porovnávalo zdravou tyreoidální tkáň s obsahem karotidy (střední hodnota SR-CarT  $0,3 \pm 0,067$ ). Analogicky jsme otestovali i SR-MusL na stejné skupině 12 pacientech se zdravou štítnou žlázou. Výsledky SR byly opět konzistentní (střední hodnota SR-MusL  $0,41 \pm 0,076$ ).

Pro všechny alternativní, výše zmíněné referenční oblasti jsme prokázali signifikantní rozdíl v distribuci SR mezi karcinomy a benigními uzly, u tyreoidálních malignit byl vždy SR vyšší v porovnání s benigními uzly (viz. tabulka 3 v příloženém článku). Na základě těchto výsledků lze považovat okolní krční svaly a obsah a. carotis communis za potenciální vhodné alternativní referenční oblasti, není-li dostupné dostatečné množství okolního zdravého tyreoidálního parenchymu.

S využitím SR-CarT a SR-MusL bylo dosaženo výrazně lepší NPV než v případě SR s kontrolní oblastí v tyreoidálním parenchymu (89 % respektive 92 % vs. 79 %). Navíc, v podskupině pacientů s pozitivními anti-TPO protilátkami dosahovala NPV SR-MusL 100 %. Tento diagnostický přístup by tedy mohl být vhodný specificky pro pacienty s uzly v terénu CLT.

Pokud jsme kombinovali klasické ultrazvukové rizikové faktory tyreoidálního uzlu s elastografickým vyšetřením (konkrétně SR-MusL) dosáhli jsme 100 % NPV. Uzly, které neměly žádný konvenční rizikový faktor a zároveň měly negativní SR-MusL, měly nulové riziko malignity. Zdá se tedy, že elastografie může fungovat jako vhodný doplněk konvenční sonografie štítné žlázy, avšak určitě ji – i vzhledem k časové náročnosti vyšetření nemůže nahradit. Shweel et al. Analogicky ukazují, že elastografie slouží jako užitečný doplněk, který v kombinaci s klasickou sonografií dosahuje lepších diagnostických výsledků než jednotlivé metody izolovaně (Shweel M. and Mansour E., 2013).

Na snížené elasticitě maligních tumorů se pravděpodobně podílí více faktorů (viz. tabulka č. 7 v úvodní části této práce). Patří mezi ně nekontrolovatelný růst a proliferace buněk a vystupňovaná fibrotizace intersticia tumoru, které vedou k větší lokální hustotě tkáně. Významný vliv má pravděpodobně i zvýšený tlak intersticiální tekutiny tumoru, případně hypervaskularizace tkáně, která může způsobit zvýšení statického hydrodynamického tlaku v pokročilých tumorech (Broders-Bondon F. et al., 2018).

U solidních tumorů byl prokázán zvýšený intersticiální tlak, který může dosahovat až 60 mmHg a obvykle klesá od centra směrem do periferie tumoru (Boucher Y. et al., 1990, Heldin C. H. et al., 2004). Mechanismus vzestupu intersticiálního tlaku tumoru je pravděpodobně založen na zvýšené propustnosti patologicky změněných kapilár, přes jejichž stěnu prochází větší množství plazmatických bílkovin do extracelulární matrix nádoru. Infiltrace lymfatických cév navíc vede ke sníženému zpětnému transportu těchto proteinů z tkáně tumoru. Vyšší onkotický tlak intersticia pak způsobuje nasávání vody z cév, která zvyšuje lokální intersticiální tlak. Na zvýšené propustnosti kapilár se může podílet i zvýšená lokální sekrece VEGF, která byla prokázána u mnoha lidských tumorů, mimo jiné i u PTC (Soh E. Y. et al., 1997).

Pro tyreoidální karcinomy je navíc poměrně typická přítomnost různých variant kalcifikací, které dramaticky snižují elasticitu tyreoidálních uzlů (Yi L. et al., 2017). Mohou se vyskytovat v podobě drobných mikrokalcifikací (do 2 mm), které jsou velmi časté především v PTC (Oh E. M. et al., 2014) nebo v podobě okrajových přerušovaných kalcifikací (Kim B. M. et al., 2008), také typických pro PTC. Větší kalcifikace (nad 2 mm) se naopak mohou vyskytovat u medulárního karcinomu štítné žlázy. Yi et al. se zaměřili na vztah mezi elasticitou tyreoidálního karcinomu (vyšetřovali strain ratio) a histologickou charakteristikou PTC. Prokázali statisticky signifikantní pozitivní korelaci mezi hodnotou SR a stupněm fibrotizace PTC a přítomností

tkáňových kalcifikací. Histologicky prokázané kalcifikace podobně jako vyšší podíl vaziva v intersticiu byly spojeny s vyšší hodnotou SR (Yi L. et al., 2017).

Vlivem vyššího intersticiálního tlaku v tkáni je narušena její elasticita, ale také může dojít ke zhoršení perfúze tkáně. Zajímavé je, že zvýšený intersticiální tlak v tumoru byl v některých studiích spojen s horší odpovědí na chemoterapii či biologickou léčbu. Vysvětlením může být zhoršený transkapilární transport, který způsobuje nedostatečnou koncentraci farmaka v tkáni s vyšším tlakem intersticia (Heldin C. H. et al., 2004). Studie na myších ukazují, že pokles tlaku intersticiální tekutiny je časným ukazatelem pozitivní odpovědi na protinádorovou léčbu (Ferretti S. et al., 2009). Také u lidí byla prokázána lepší odpověď na léčbu u pacientů s maligními lymfomy a melanomy, u kterých došlo po podání terapie k poklesu invazivně měřeného intersticiálního tlaku tumoru (Curti B. D. et al., 1993). V tomto směru by mohla mít určitý prognostický přínos i ultrazvuková elastografie. Hayashi et al. prokázali, že pacientky s karcinomem prsu měly větší pravděpodobnost kompletní odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii, pokud byl jejich tumor před zahájením léčby elastičtější v porovnání s pacientkami, které měly již iniciálně elastograficky výrazně tuhé léze (Hayashi M. et al., 2012).

Ukazuje se, že změny biomechanických vlastností tkáně mohou mít také vliv na agresivitu, progresi a metastazování tumoru. Vyšší nitrotkáňový tlak v tužších tumorech může způsobit aktivaci embryonálních vývojových mechanosenzitivních signálních kaskád, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu, zvyšují buněčnou mobilitu a mohou destabilizovat polaritu a adhezi epiteliálních buněk. Vyšší tlak tedy prostřednictvím těchto cest může usnadňovat tvorbu vzdálených metastáz. Navíc zvýšený tlak tumoru působí i na okolní zdravé epiteliální buňky a aktivuje v nich další tumorogenní procesy (Broders-Bondon F. et al., 2018).

## **15.2. Chronická lymfocytární tyreoiditida a tyreoidální karcinom**

Výsledky naší práce, která analyzovala data celkem od 2571 pacientů, kteří podstoupili FNAB tyreoidálního uzlu, naznačují, že pacienti, kteří mají tyreoidální uzel a zároveň pozitivní antityreoidální autoprotiátky mohou mít vyšší riziko tyreoidální malignity. V minulosti již byla v některých studiích prokázána asociace mezi pozitivním anti-Tg a tyreoidálním karcinomem (Azizi G. et al., 2014, Kim E. S. et al., 2010), kterou ve naší práci jsme našli také. Anti-Tg



byly pozitivní u 35 % pacientů s tyreoidálním karcinomem, oproti 21 % pacientů s benigními uzly ( $p = 0,018$ ). Na rozdíl od výše zmíněných studií jsme ve skupině pacientů s tyreoidálními karcinomy prokázali také statisticky signifikantně vyšší prevalenci pozitivních anti-TPO protilátek oproti benigním uzlům (44 % vs. 27 %,  $p = 0,005$ ). Navíc v mnohočetné regresní analýze byly anti-TPO protilátky identifikovány jako nezávislý prediktor malignity tyreoidálního uzlu, který zvyšoval riziko 2,28krát v porovnání s anti-TPO negativními pacienty (viz. tabulka 3 v příloženém článku). Anti-Tg nebyly v mnohočetné regresní analýze hodnoceny z důvodu chybějících dat u části pacientů.

Naopak přítomnost sonografických známek CLT signifikantně nekorelovala s biologickou povahou uzlu. Alespoň jedna sonografická známka tyreoiditidy (nehomogenní struktura parenchymu, hypoechogenní parenchym, zvýšená vaskularizace) byla sice přítomna častěji ve skupině karcinomů (35 %) v porovnání s 21 % u benigních uzlů, tento trend však nedosahoval na rozdíl od autoprottilátek statistické významnosti ( $p = 0,16$ ). Důvodem může být fakt, že sonografie štítné žlázy je hodnocena subjektivně. Výsledek tedy může být ovlivněn pohledem vyšetřující osoby. Nabízí se však i další vysvětlení, kterým je lokální imunitní reakce omezená pouze na okolí tumoru. Peritumorózní lymfocytární infiltrace, která byla již v minulosti popsána u řady lidských malignit (Shu S. et al., 1997), může vyvolat produkci specifických antityreoidálních protilátek detekovatelných v séru, aniž by došlo k rozvoji tyreoiditidy ve zbylém parenchymu štítné žlázy, který by se tedy mohl v době diagnózy tumoru jevit sonograficky zcela normálně. Skutečnost, že 13 z celkového počtu 91 pacientů s tyreoidálním karcinomem mělo pozitivní antityreoidální protilátky a normální sonografický nálezn, také podporuje tuto hypotézu. Opačný nálezn, tedy negativní autoprottilátky spolu s pozitivním sonografickým nálezem tyreoiditidy měli pouze 2 pacienti z 91.

V kontrolní skupině pacientů s benigními tyreoidálními uzly jsme také našli signifikantně nižší plazmatické koncentrace TSH (medián 1,21 mIU/l u benigních uzlů vs. 1,88 mIU/l u tyreoidálních karcinomů,  $p < 0,001$ ). Tyto výsledky podobně jako v práci Boelaerta et al. (Boelaert K. et al., 2006) naznačují, že vyšší hladina TSH, která stimuluje tyreocyty, může mít vliv na tyreoidální onkogenezi. CLT je přítom v oblastech s dostatečným zásobením jódu, mezi které patří i Česká republika, nejčastější příčinou hypotyreózy, a tedy i vzestupu TSH. V logistické regresní analýze se riziko tyreoidální malignity se snižovalo s klesající plazmatickou koncentrací TSH.

Pacienti s TSH sníženým pod 0,5 mIU/l měli v naší práci 2,4krát nižší riziko tyreoidální malignity v porovnání s pacienty s normální nebo zvýšenou koncentrací TSH. Tento náález ukazuje na možnou protektivní roli suprese TSH, kterou již v minulosti prokázali Fiore et al. (Fiore E. et al., 2009a). Klinická, ale i subklinická hypertyreóza je však spojena s vyšším kardiovaskulárním rizikem, včetně fibrilace síní (Sun J. et al., 2017) a vyšším rizikem osteoporózy (Segna D. et al., 2018), která jistě převažují nad případným protektivním vlivem chránícím před rozvojem tyreoidálního karcinomu. Navíc, při podrobnější analýze, při které jsme pacienty rozdělil podle toho, zda užívali nebo neužívali tablety s levotyroxinem, jsme zjistili, že s nižším rizikem tyreoidálního karcinomu byla spojena pouze spontánní suprese TSH. U pacientů na terapii levotyroxinem, nebyla suprese TSH spojena s nižším rizikem tyreoidálního karcinomu (OR 1,09; p = 0,914).

Tento rozdíl lze vysvětlit i tím, že supresní terapie levotyroxinem byla pravděpodobně častěji zahájena v reakci na ultrazvukový náález suspektního uzlu, tedy již v době, kdy byl tyreoidální karcinom přítomen. Navíc suspektní ultrazvukový charakter uzlu v případě karcinomu může častěji vést ošetřujícího lékaře k rozhodnutí zahájit terapii levotyroxinem na rozdíl od pacientů, kteří mají benigní, tedy sonograficky méně suspektní uzly. Tento mechanismus může vést k selekčnímu bias a relativně vyššímu počtu pacientů s karcinomy, kteří jsou na terapii levotyroxinem.

Ostatní sledované parametry, tj. přítomnost hypotyreózy (TSH >5 mIU/l), celkový objem štítné žlázy ani chronická farmakoterapie levotyroxinem v období před FNAB, nebyly signifikantně asociovány s biologickou povahou uzlu.

Na základě diskutovaných výsledků nelze říct, že přítomnost CLT sama o sobě zvyšuje riziko vzniku tyreoidálního karcinomu. Nedokážeme totiž rozhodnout, zda se častější výskyt pozitivních antityreoidálních protilátek etiologicky podílí na vzniku karcinomu, nebo zda je častější seropozitivita pouze důsledkem přítomnosti maligních buněk, které vedou k reaktivní aktivaci imunitního systému pacienta. K ověření této skutečnosti jsou zapotřebí dlouhodobé prospektivní studie, které vzhledem k relativně nízké incidenci tyreoidálního karcinomu musí zahrnovat mnoho tisíc pacientů. V rozsáhlé dánské populační studii, založené na analýze dat z národního registru, která zahrnovala více než 8 milionů pacientů byl překvapivě asociován tyreoidální karcinom s předchozím hlášením hypertyreózy a CLT, naopak u hypotyreózy nebylo dosaženo statistické významnosti (Kitahara C. M. et al., 2018). Je však nutné podotknout, že výsledky byly získány pouze na základě hlášení diagnóz do národního registru.

Také americká studie, založená na analýze dat z registru vojenských veteránů (mužů) ukázala signifikantní asociaci tyreoidálního karcinomu s CLT, ale i s hypotyreózou a hypertyreózou (Balasubramaniam S. et al., 2012).

Na základě našich dat je možné tvrdit, že samotná pozitivita antityreoidálních protilátek by měla vést k obezřetnějšímu klinickému přístupu k pacientům s tyreoidálními uzly. Například u pacientů s CLT a cytologicky nejednoznačnými uzly (Bethesda III/IV) volit častěji operativní řešení s histologickým ověřením biologické povahy uzlu. Nezáleží přitom na tom, zda serokonverze nastala před vznikem karcinomu anebo až v reakci na jeho přítomnost.

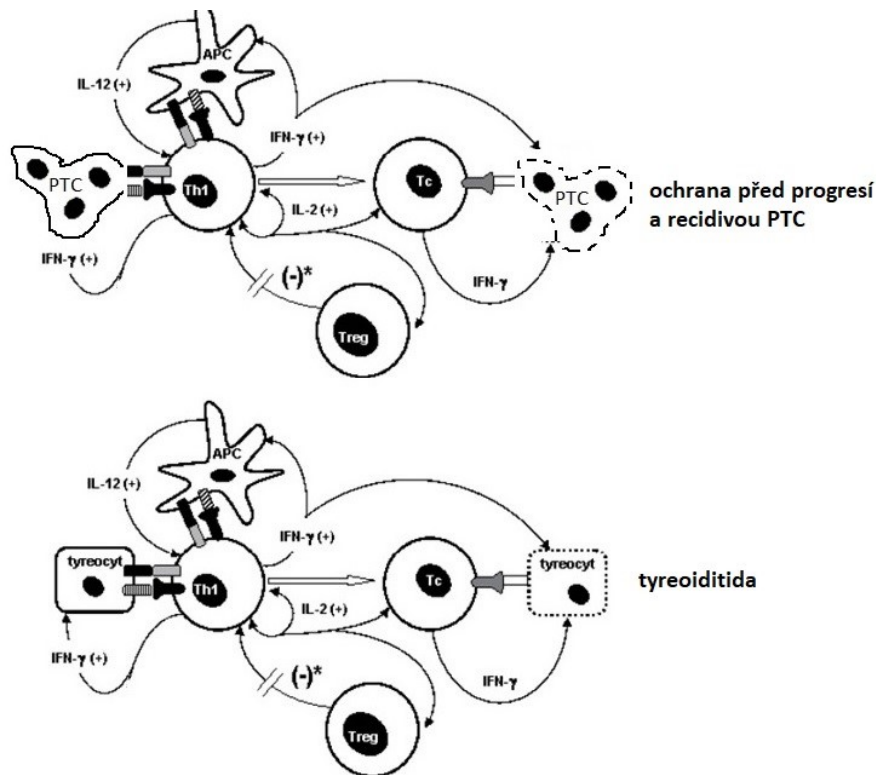
### **15.3. Vztah chronické lymfocytární tyreoiditidy k prognóze diferencovaného tyreoidálního karcinomu**

Aktivita imunitního systému hraje klíčovou roli jak v klinické primomanifestaci, tak v ochraně před recidivou nebo progresí všech nádorových onemocnění včetně DTC (Ribatti D., 2017). Vznik CLT je podmíněn především patologií buněčné složky imunitního systému. Aktivace cytotoxických CD8 T lymfocytů, které u pacientů s CLT patologicky reagují na tyreoidální autoantigeny může paradoxně chránit před progresí tyreoidálního karcinomu (viz. obr. 10). Předpokládá se totiž, že CLT i tyreoidální karcinomy sdílejí určité antigeny, proti kterým může imunitní systém reagovat obdobným mechanismem a navozovat tak „snáze“ apoptózu buněk karcinomu.

V souladu s tím byla v rozsáhlé meta-analýze Lee et al. extratyroidální invaze tumoru a přítomnost pozitivních lymfatických uzlin asociována s absencí CLT, a naopak pacienti s CLT měli delší interval bez recidivy onemocnění. CLT byla sice spojena s vyšším výskytem multifokálního karcinomu (Lee J. H. et al., 2013) avšak samotná multifokalita je kontroverzním prognostickým faktorem a dle recentních doporučení ATA není její přítomnost považována za faktor zhoršující prognózu (Haugen B. R. et al., 2016). V naší práci se během sledování (medián 63 měsíců) vyskytly 2 (2,2 %) lokální recidivy. Tento počet je nedostatečný k vyvozování statisticky významných závěrů, nicméně obě se vyskytly u pacientů bez CLT.

Odlíšná může být situace u nízkce diferencovaných a anaplastických tyreoidálních karcinomů, kde byla vyšší denzita tumorasociovaných makrofágů v okolí nediferencovaného tumoru

spojena s horší prognózou (Cunha L. L. et al., 2014). Samotná přítomnost imunitních buněk není tedy pravděpodobně dostatečná k ochraně před progresí tumoru. Podstatné je především celé mikroprostředí, ovlivněné vzájemným vztahem imunitního systému a nádorových buněk.



Obr. 10: Schéma hypotetického rozvoje tyreoiditidy aktivací cytotoxických lymfocytů a analogická ochrana před progresí nebo recidivou papilárního karcinomu. (archiv autora)

PTC – papilární karcinom štítné žlázy

Tc – cytotoxický T lymfocyt

Treg – regulační T lymfocyt

Th1 – Th1 lymfocyt

## 16. Závěr

Tyreoidální uzly jsou patologií s velmi vysokou prevalencí, která může dosahovat až 70 %. Diagnostika tyreoidálního karcinomu, který je nejčastější endokrinologickou malignitou, je při nálezů tyreoidálního uzlu nejdůležitější a zároveň nejsložitější úkol pro endokrinologa. Tyreoidální karcinom představuje 5-10 % klinicky signifikantních uzlů a jeho incidence v posledních desetiletích prudce vzrůstá. Na stoupajícím výskytu se jistě podílí i vyšší záchyt při výrazně zlepšené citlivosti moderních zobrazovacích metod, především ultrazvuku.

Cílem naší práce bylo zhodnotit vliv biomechanických vlastností (konkrétně elasticity) tkáně tyreoidálního uzlu na jeho biologickou povahu a vztah tyreoidální autoimunity k riziku tyreoidálního karcinomu.

- 1) Výsledky naší práce ukazují, že snížená elasticita uzlu, vyšetřená pomocí ultrazvukové elastografie je asociována s DTC. Přidání elastografie ke klasické sonografii zlepšuje diagnostické možnosti neinvazivního vyšetření tyreoidálního uzlu. Při kombinaci semikvantitativního hodnocení pomocí strain ratio oproti krčním svalům a konvenční sonografii jsme ve vyšetřované skupině pacientů dosáhli 100 % negativní prediktivní hodnoty.
- 2) Pilotní výsledky naší práce naznačují, že v případě chybějícího normálního okolního tyreoidálního parenchymu lze alternativně využít jiné krční struktury (krční svaly, obsah a. carotis communis) k semikvantitativnímu hodnocení tyreoidální elasticity pomocí strain-ratio. Tento přístup lze využít například u objemných tyreoidálních uzlů, v případě polynodozní přestavby anebo uzlů v terénu autoimunitní tyreoiditidy. Tento přístup však potřebuje ověřit na větším počtu pacientů.
- 3) Pozitivita tyreoidálních autoprotilátek (anti-TPO nebo anti-Tg) byla v naší práci asociována s vyšším rizikem maligní povahy uzlu. Zůstává nejasné, zda je samotná přítomnost chronické lymfocytární tyreoiditidy predispozicí k tyreoidálnímu karcinomu, nebo je vyšší výskyt positivity antityreoidálních protilátek vyvolán reaktivně přítomností maligně transformovaných buněk. Skutečností je, že pozitivita antityreoidálních protilátek by měla vést k obezřetnějšímu klinickému přístupu k pacientům s tyreoidálními uzly (např. volit u uzlů s cytologicky nejednoznačnými

nálezů (Bethesda III/IV) častěji operační řešení s histologickým ověřením) a nezáleží přitom na tom, zda serokonverze nastala před vznikem karcinomu anebo až v reakci na jeho přítomnost.

- 4) Spontánní suprese TSH (TSH <0,5 mIU/l bez terapie levotyroxinem) byla v naší práci spojena s 2,4krát nižším rizikem maligní povahy tyreoidálního uzlu.

## 17. Literatura

- 1) Ahn, H. S., Kim, H. J. and Welch, H. G. Korea's thyroid-cancer "epidemic"--screening and overdiagnosis. *N Engl J Med* **371**, 1765-1767 (2014).
- 2) Akslen, L. A. and Livolsi, V. A. Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance. *Hum Pathol* **31**, 439-442 (2000).
- 3) Amoako-Tuffour, Y., Graham, M. E., Bullock, M., Rigby, M. H., Trites, J., Taylor, S. M. and Hart, R. D. Papillary thyroid cancer recurrence 43 Years following Total Thyroidectomy and radioactive iodine ablation: a case report. *Thyroid Res* **10**, 8 (2017).
- 4) Aschebrook-Kilfoy, B., Ward, M. H., Sabra, M. M. and Devesa, S. S. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid* **21**, 125-134 (2011).
- 5) Asteria, C., Giovanardi, A., Pizzocaro, A., Cozzaglio, L., Morabito, A., Somalvico, F. and Zoppo, A. US-elastography in the differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. *Thyroid* **18**, 523-531 (2008).
- 6) Azizi, G., Keller, J., Lewis, M., Puett, D., Rivenbark, K. and Malchoff, C. Performance of elastography for the evaluation of thyroid nodules: a prospective study. *Thyroid* **23**, 734-740 (2013).
- 7) Azizi, G., Keller, J. M., Lewis, M., Piper, K., Puett, D., Rivenbark, K. M. and Malchoff, C. D. Association of Hashimoto's thyroiditis with thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* **21**, 845-852 (2014).
- 8) Balasubramaniam, S., Ron, E., Gridley, G., Schneider, A. B. and Brenner, A. V. Association between benign thyroid and endocrine disorders and subsequent risk of thyroid cancer among 4.5 million U.S. male veterans. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, 2661-2669 (2012).

- 9) Balkwill, F. and Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-545 (2001).
- 10) Bercoff, J., Tanter, M. and Fink, M. Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* **51**, 396-409 (2004).
- 11) Bhatia, K. S., Rasalkar, D. P., Lee, Y. P., Wong, K. T., King, A. D., Yuen, H. Y. and Ahuja, A. T. Cystic change in thyroid nodules: a confounding factor for real-time qualitative thyroid ultrasound elastography. *Clin Radiol* **66**, 799-807 (2011).
- 12) Boelaert, K., Horacek, J., Holder, R. L., Watkinson, J. C., Sheppard, M. C. and Franklyn, J. A. Serum thyrotropin concentration as a novel predictor of malignancy in thyroid nodules investigated by fine-needle aspiration. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 4295-4301 (2006).
- 13) Bojunga, J., Herrmann, E., Meyer, G., Weber, S., Zeuzem, S. and Friedrich-Rust, M. Real-time elastography for the differentiation of benign and malignant thyroid nodules: a meta-analysis. *Thyroid* **20**, 1145-1150 (2010).
- 14) Bongiovanni, M., Spitale, A., Faquin, W. C., Mazzucchelli, L. and Baloch, Z. W. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol* **56**, 333-339 (2012).
- 15) Boucher, Y., Baxter, L. T. and Jain, R. K. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res* **50**, 4478-4484 (1990).
- 16) Broders-Bondon, F., Nguyen Ho-Boulidoires, T. H., Fernandez-Sanchez, M. E. and Farge, E. Mechanotransduction in tumor progression: The dark side of the force. *J Cell Biol* **217**, 1571-1587 (2018).



- 17) Cantara, S., Capezzone, M., Marchisotta, S., Capuano, S., Busonero, G., Toti, P., Di Santo, A., Caruso, G., Carli, A. F., Brillì, L., Montanaro, A. and Pacini, F. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 1365-1369 (2010).
- 18) Cantisani, V., Grazhdani, H., Drakonaki, E., D'Andrea, V., Di Segni, M., Kaleshi, E., Calliada, F., Catalano, C., Redler, A., Brunese, L., Drudi, F. M., Fumarola, A., Carbotta, G., Frattaroli, F., Di Leo, N., Ciccariello, M., Caratozzolo, M. and D'Ambrosio, F. Strain US Elastography for the Characterization of Thyroid Nodules: Advantages and Limitation. *Int J Endocrinol* **2015**, 908575 (2015).
- 19) Cibas, E. S. and Ali, S. Z. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* **27**, 1341-1346 (2017).
- 20) Cibas, E. S., Ali, S. Z. and Conference, N. C. I. T. F. S. o. t. S. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* **132**, 658-665 (2009).
- 21) Cunha, L. L., Ferreira, R. C., Marcello, M. A., Vassallo, J. and Ward, L. S. Clinical and pathological implications of concurrent autoimmune thyroid disorders and papillary thyroid cancer. *J Thyroid Res* **2011**, 387062 (2011).
- 22) Cunha, L. L., Marcello, M. A. and Ward, L. S. The role of the inflammatory microenvironment in thyroid carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* **21**, R85-R103 (2014).
- 23) Curti, B. D., Urba, W. J., Alvord, W. G., Janik, J. E., Smith, J. W., 2nd, Madara, K. and Longo, D. L. Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment. *Cancer Res* **53**, 2204-2207 (1993).
- 24) Dailey, M. E., Lindsay, S. and Skahen, R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. *AMA Arch Surg* **70**, 291-297 (1955).

- 25) Das, D. K. Psammoma body: a product of dystrophic calcification or of a biologically active process that aims at limiting the growth and spread of tumor? *Diagn Cytopathol* **37**, 534-541 (2009).
- 26) Davies, L. and Welch, H. G. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* **140**, 317-322 (2014).
- 27) Demers, L. M. and Spencer, C. A. Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**, 138-140 (2003).
- 28) Farid, N. R., Shi, Y. and Zou, M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* **15**, 202-232 (1994).
- 29) Ferretti, S., Allegrini, P. R., Becquet, M. M. and McSheehy, P. M. Tumor interstitial fluid pressure as an early-response marker for anticancer therapeutics. *Neoplasia* **11**, 874-881 (2009).
- 30) Fiore, E., Rago, T., Provenzale, M. A., Scutari, M., Ugolini, C., Basolo, F., Di Coscio, G., Berti, P., Grasso, L., Elisei, R., Pinchera, A. and Vitti, P. Lower levels of TSH are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer in patients with thyroid nodular disease: thyroid autonomy may play a protective role. *Endocr Relat Cancer* **16**, 1251-1260 (2009a).
- 31) Fiore, E., Rago, T., Scutari, M., Ugolini, C., Proietti, A., Di Coscio, G., Provenzale, M. A., Berti, P., Grasso, L., Mariotti, S., Pinchera, A. and Vitti, P. Papillary thyroid cancer, although strongly associated with lymphocytic infiltration on histology, is only weakly predicted by serum thyroid auto-antibodies in patients with nodular thyroid diseases. *J Endocrinol Invest* **32**, 344-351 (2009b).
- 32) Gabalec, F., Srbova, L., Nova, M., Hovorkova, E., Hornychova, H., Jakubikova, I., Ryska, A. and Cap, J. Impact of Hashimoto's thyroiditis, TSH levels, and anti-thyroid

antibody positivity on differentiated thyroid carcinoma incidence. *Endokrynol Pol* **67**, 48-53 (2016).

- 33) Gharib, H., Papini, E., Garber, J. R., Duick, D. S., Harrell, R. M., Hegedus, L., Paschke, R., Valcavi, R., Vitti, P. and Nodules, A. A. A. T. F. o. T. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules--2016 Update. *Endocr Pract* **22**, 622-639 (2016).
- 34) Guarino, V., Castellone, M. D., Avilla, E. and Melillo, R. M. Thyroid cancer and inflammation. *Mol Cell Endocrinol* **321**, 94-102 (2010).
- 35) Guerra, A., Sapio, M. R., Marotta, V., Campanile, E., Moretti, M. I., Deandrea, M., Motta, M., Limone, P. P., Fenzi, G., Rossi, G. and Vitale, M. Prevalence of RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid nodules and its clinical application. *Endocr J* **58**, 31-38 (2011).
- 36) Guth, S., Theune, U., Aberle, J., Galach, A. and Bamberger, C. M. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest* **39**, 699-706 (2009).
- 37) Harach, H. R., Franssila, K. O. and Wasenius, V. M. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study. *Cancer* **56**, 531-538 (1985).
- 38) Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., Pacini, F., Randolph, G. W., Sawka, A. M., Schlumberger, M., Schuff, K. G., Sherman, S. I., Sosa, J. A., Steward, D. L., Tuttle, R. M. and Wartofsky, L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* **26**, 1-133 (2016).

- 39) Hauch, A., Al-Qurayshi, Z., Randolph, G. and Kandil, E. Total thyroidectomy is associated with increased risk of complications for low- and high-volume surgeons. *Ann Surg Oncol* **21**, 3844-3852 (2014).
- 40) Hayashi, M., Yamamoto, Y., Ibusuki, M., Fujiwara, S., Yamamoto, S., Tomita, S., Nakano, M., Murakami, K., Iyama, K. and Iwase, H. Evaluation of tumor stiffness by elastography is predictive for pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* **19**, 3042-3049 (2012).
- 41) Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K. and Ostman, A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 806-813 (2004).
- 42) Hollowell, J. G., Staehling, N. W., Flanders, W. D., Hannon, W. H., Gunter, E. W., Spencer, C. A. and Braverman, L. E. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 489-499 (2002).
- 43) Chem, K. T. and Rosai, J. Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases. *Am J Surg Pathol* **1**, 123-130 (1977).
- 44) Iglesias, M. L., Schmidt, A., Ghuzlan, A. A., Lacroix, L., Vathaire, F., Chevillard, S. and Schlumberger, M. Radiation exposure and thyroid cancer: a review. *Arch Endocrinol Metab* **61**, 180-187 (2017).
- 45) Ito, Y., Miyauchi, A., Kihara, M., Higashiyama, T., Kobayashi, K. and Miya, A. Patient age is significantly related to the progression of papillary microcarcinoma of the thyroid under observation. *Thyroid* **24**, 27-34 (2014).
- 46) Itoh, A., Ueno, E., Tohno, E., Kamma, H., Takahashi, H., Shiina, T., Yamakawa, M. and Matsumura, T. Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. *Radiology* **239**, 341-350 (2006).

- 47) Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R. and Graham, N. M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* **84**, 223-243 (1997).
- 48) Jeon, M. J., Kim, W. G., Choi, Y. M., Kwon, H., Lee, Y. M., Sung, T. Y., Yoon, J. H., Chung, K. W., Hong, S. J., Kim, T. Y., Shong, Y. K., Song, D. E. and Kim, W. B. Features Predictive of Distant Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinomas. *Thyroid* **26**, 161-168 (2016).
- 49) Jiskra J. Diagnostika a další péče o pacienty s tyreoidálními uzly: doporučení American Thyroid Association 2015 modifikované pro podmínky České republiky
- 50) Johannessen, J. V. and Sobrinho-Simoes, M. The origin and significance of thyroid psammoma bodies. *Lab Invest* **43**, 287-296 (1980).
- 51) Kamran, S. C., Marqusee, E., Kim, M. I., Frates, M. C., Ritner, J., Peters, H., Benson, C. B., Doubilet, P. M., Cibas, E. S., Barletta, J., Cho, N., Gawande, A., Ruan, D., Moore, F. D., Jr., Pou, K., Larsen, P. R. and Alexander, E. K. Thyroid nodule size and prediction of cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, 564-570 (2013).
- 52) Kim, B. M., Kim, M. J., Kim, E. K., Kwak, J. Y., Hong, S. W., Son, E. J. and Kim, K. H. Sonographic differentiation of thyroid nodules with eggshell calcifications. *J Ultrasound Med* **27**, 1425-1430 (2008).
- 53) Kim, E. S., Lim, D. J., Baek, K. H., Lee, J. M., Kim, M. K., Kwon, H. S., Song, K. H., Kang, M. I., Cha, B. Y., Lee, K. W. and Son, H. Y. Thyroglobulin antibody is associated with increased cancer risk in thyroid nodules. *Thyroid* **20**, 885-891 (2010).
- 54) Kitahara, C. M., D, K. R. F., Jorgensen, J. O. L., Cronin-Fenton, D. and Sorensen, H. T. Benign Thyroid Diseases and Risk of Thyroid Cancer: A Nationwide Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab* **103**, 2216-2224 (2018).

- 55) Kybic, J. and Smutek, D. Computational elastography from standard ultrasound image sequences by global trust region optimization. *Inf Process Med Imaging* **19**, 299-310 (2005).
- 56) Lee, J. H., Kim, Y., Choi, J. W. and Kim, Y. S. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* **168**, 343-349 (2013).
- 57) Liang, Q. C., Wei, Q. Y. and Fan, S. Q. [Expression of VEGF-C and angiogenesis, and lymphangiogenesis in papillary thyroid carcinoma]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **31**, 414-416, 419 (2006).
- 58) Lin, K. L., Wang, O. C., Zhang, X. H., Dai, X. X., Hu, X. Q. and Qu, J. M. The BRAF mutation is predictive of aggressive clinicopathological characteristics in papillary thyroid microcarcinoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 3294-3300 (2010).
- 59) Liu, R. and Xing, M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* **23**, R143-155 (2016).
- 60) Liu, X., Zhu, L., Cui, D., Wang, Z., Chen, H., Duan, Y., Shen, M., Wu, Y., Rong, R., Zhang, Z., Wang, X., Chen, J., Alexander, E. K. and Yang, T. Coexistence of Histologically Confirmed Hashimoto's Thyroiditis with Different Stages of Papillary Thyroid Carcinoma in a Consecutive Chinese Cohort. *Int J Endocrinol* **2014**, 769294 (2014).
- 61) Marotta, V., Guerra, A., Sapio, M. R. and Vitale, M. RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint. *Eur J Endocrinol* **165**, 499-507 (2011).
- 62) McLeod, D. S. and Cooper, D. S. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* **42**, 252-265 (2012).

- 63) Moon, H. J., Sung, J. M., Kim, E. K., Yoon, J. H., Youk, J. H. and Kwak, J. Y. Diagnostic performance of gray-scale US and elastography in solid thyroid nodules. *Radiology* **262**, 1002-1013 (2012).
- 64) Muzza, M., Degl'Innocenti, D., Colombo, C., Perrino, M., Ravasi, E., Rossi, S., Cirello, V., Beck-Peccoz, P., Borrello, M. G. and Fugazzola, L. The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* **72**, 702-708 (2010).
- 65) Nabhan, F. and Ringel, M. D. Thyroid nodules and cancer management guidelines: comparisons and controversies. *Endocr Relat Cancer* **24**, R13-R26 (2017).
- 66) Niemeier, L. A., Kuffner Akatsu, H., Song, C., Carty, S. E., Hodak, S. P., Yip, L., Ferris, R. L., Tseng, G. C., Seethala, R. R., Lebeau, S. O., Stang, M. T., Coyne, C., Johnson, J. T., Stewart, A. F. and Nikiforov, Y. E. A combined molecular-pathologic score improves risk stratification of thyroid papillary microcarcinoma. *Cancer* **118**, 2069-2077 (2012).
- 67) Nikiforov, Y. E., Ohori, N. P., Hodak, S. P., Carty, S. E., LeBeau, S. O., Ferris, R. L., Yip, L., Seethala, R. R., Tublin, M. E., Stang, M. T., Coyne, C., Johnson, J. T., Stewart, A. F. and Nikiforova, M. N. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 3390-3397 (2011).
- 68) Nikiforov, Y. E., Seethala, R. R., Tallini, G., Baloch, Z. W., Basolo, F., Thompson, L. D., Barletta, J. A., Wenig, B. M., Al Ghuzlan, A., Kakudo, K., Giordano, T. J., Alves, V. A., Khanafshar, E., Asa, S. L., El-Naggar, A. K., Gooding, W. E., Hodak, S. P., Lloyd, R. V., Maytal, G., Mete, O., Nikiforova, M. N., Nose, V., Papotti, M., Poller, D. N., Sadow, P. M., Tischler, A. S., Tuttle, R. M., Wall, K. B., LiVolsi, V. A., Randolph, G. W. and Ghossein, R. A. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol* **2**, 1023-1029 (2016).

- 69) Nikiforova, M. N., Biddinger, P. W., Caudill, C. M., Kroll, T. G. and Nikiforov, Y. E. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* **26**, 1016-1023 (2002).
- 70) Nikiforova, M. N. and Nikiforov, Y. E. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* **8**, 83-95 (2008).
- 71) Oh, E. M., Chung, Y. S., Song, W. J. and Lee, Y. D. The pattern and significance of the calcifications of papillary thyroid microcarcinoma presented in preoperative neck ultrasonography. *Ann Surg Treat Res* **86**, 115-121 (2014).
- 72) Ophir, J., Cespedes, I., Ponnekanti, H., Yazdi, Y. and Li, X. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrason Imaging* **13**, 111-134 (1991).
- 73) Rago, T., Santini, F., Scutari, M., Pinchera, A. and Vitti, P. Elastography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2917-2922 (2007).
- 74) Raman, P. and Koenig, R. J. Pax-8-PPAR-gamma fusion protein in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol* **10**, 616-623 (2014).
- 75) Razavi, S. A., Hadduck, T. A., Sadigh, G. and Dwamena, B. A. Comparative effectiveness of elastographic and B-mode ultrasound criteria for diagnostic discrimination of thyroid nodules: a meta-analysis. *AJR Am J Roentgenol* **200**, 1317-1326 (2013).
- 76) Reading, C. C., Charboneau, J. W., Hay, I. D. and Sebo, T. J. Sonography of thyroid nodules: a "classic pattern" diagnostic approach. *Ultrasound Q* **21**, 157-165 (2005).



- 77) Resende de Paiva, C., Gronhoj, C., Feldt-Rasmussen, U. and von Buchwald, C. Association between Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer in 64,628 Patients. *Front Oncol* **7**, 53 (2017).
- 78) Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* **8**, 7175-7180 (2017).
- 79) Romei, C. and Elisei, R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**, 54 (2012).
- 80) Russ, G., Bonnema, S. J., Erdogan, M. F., Durante, C., Ngu, R. and Leenhardt, L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J* **6**, 225-237 (2017).
- 81) Russ, G., Leboulleux, S., Leenhardt, L. and Hegedus, L. Thyroid incidentalomas: epidemiology, risk stratification with ultrasound and workup. *Eur Thyroid J* **3**, 154-163 (2014).
- 82) Sahin, M., Cakal, E., Ozbek, M., Gungunes, A., Arslan, M. S., Akkaymak, E. T., Ucan, B., Unsal, I. O., Bozkurt, N. C. and Delibasi, T. Elastography in the differential diagnosis of thyroid nodules in Hashimoto thyroiditis. *Med Oncol* **31**, 97 (2014).
- 83) Segna, D., Bauer, D. C., Feller, M., Schneider, C., Fink, H. A., Aubert, C. E., Collet, T. H., da Costa, B. R., Fischer, K., Peeters, R. P., Cappola, A. R., Blum, M. R., van Dorland, H. A., Robbins, J., Naylor, K., Eastell, R., Uitterlinden, A. G., Rivadeneira Ramirez, F., Gogakos, A., Gussekloo, J., Williams, G. R., Schwartz, A., Cauley, J. A., Aujesky, D. A., Bischoff-Ferrari, H. A., Rodondi, N. and Thyroid Studies, C. Association between subclinical thyroid dysfunction and change in bone mineral density in prospective cohorts. *J Intern Med* **283**, 56-72 (2018).

- 84) Shi, C., Li, S., Shi, T., Liu, B., Ding, C. and Qin, H. Correlation between thyroid nodule calcification morphology on ultrasound and thyroid carcinoma. *J Int Med Res* **40**, 350-357 (2012).
- 85) Shu, S., Plautz, G. E., Krauss, J. C. and Chang, A. E. Tumor immunology. *JAMA* **278**, 1972-1981 (1997).
- 86) Shweel, M. and Mansour, E. Diagnostic performance of combined elastosonography scoring and high-resolution ultrasonography for the differentiation of benign and malignant thyroid nodules. *Eur J Radiol* **82**, 995-1001 (2013).
- 87) Soh, E. Y., Duh, Q. Y., Sobhi, S. A., Young, D. M., Epstein, H. D., Wong, M. G., Garcia, Y. K., Min, Y. D., Grossman, R. F., Siperstein, A. E. and Clark, O. H. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 3741-3747 (1997).
- 88) Sun, J., Yao, L., Fang, Y., Yang, R., Chen, Y., Yang, K. and Tian, L. Relationship between Subclinical Thyroid Dysfunction and the Risk of Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Int J Endocrinol* **2017**, 8130796 (2017).
- 89) Taki, S., Terahata, S., Yamashita, R., Kinuya, K., Nobata, K., Kakuda, K., Kodama, Y. and Yamamoto, I. Thyroid calcifications: sonographic patterns and incidence of cancer. *Clin Imaging* **28**, 368-371 (2004).
- 90) Tanaka, K., Sonoo, H., Kurebayashi, J., Nomura, T., Ohkubo, S., Yamamoto, Y. and Yamamoto, S. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* **8**, 1125-1131 (2002).
- 91) Trimboli, P., Guglielmi, R., Monti, S., Misischi, I., Graziano, F., Nasrollah, N., Amendola, S., Morgante, S. N., Deiana, M. G., Valabrega, S., Toscano, V. and Papini, E. Ultrasound sensitivity for thyroid malignancy is increased by real-time

elastography: a prospective multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, 4524-4530 (2012).

- 92) Unluturk, U., Erdogan, M. F., Demir, O., Gullu, S. and Baskal, N. Ultrasound elastography is not superior to grayscale ultrasound in predicting malignancy in thyroid nodules. *Thyroid* **22**, 1031-1038 (2012).
- 93) Vander, J. B., Gaston, E. A. and Dawber, T. R. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* **69**, 537-540 (1968).
- 94) Vargas-Salas, S., Martinez, J. R., Urra, S., Dominguez, J. M., Mena, N., Uslar, T., Lagos, M., Henriquez, M. and Gonzalez, H. E. Genetic testing for indeterminate thyroid cytology: review and meta-analysis. *Endocr Relat Cancer* **25**, R163-R177 (2018).
- 95) Vlcek, P., Novakova, D. and Kutra, R. [Thyroid carcinomas: the present view on diagnostics and therapy]. *Vnitr Lek* **63**, 572-579.
- 96) Yi, L., Qiong, W., Yan, W., Youben, F. and Bing, H. Correlation between Ultrasound Elastography and Histologic Characteristics of Papillary Thyroid Carcinoma. *Sci Rep* **7**, 45042 (2017).
- 97) Zhang, Y. H., Gao, Y. and Su, B. L. Assessment of carotid arterial wall elasticity in type 2 diabetes mellitus patients with microalbuminuria by real-time ultrasound elastography. *Int J Endocrinol* **2012**, 340974 (2012).

## 18. Seznam publikací autora

### 18.1. Publikace s IF, které se zabývají problematikou dizertační práce

- 1) Krátký J, Vítková H, Bartáková J, Telička Z, Antošová M, Límanová Z, Jiskra J. Thyroid nodules: pathophysiological insight on oncogenesis and novel diagnostic techniques. *Physiol Res.* 2014;63 Suppl 2:S263-75. IF=1,32
- 2) Kratky J, Vitkova H, Bartakova J, Lukas J, Jiskra J. Neck Muscles and Content of Carotid Artery as Reference Tissue for Strain Ratio - a Novel Approach to Improve the Diagnostic Performance of Thyroid Elastography? *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2016 Mar;124(3):192-7 IF=1,62
- 3) Krátký J, Ježková J, Kosák M, Vítková H, Bartáková J, Mráz M, Lukáš J, Límanová Z, Jiskra J. Positive Antithyroid Antibodies and Nonsuppressed TSH Are Associated with Thyroid Cancer: A Retrospective Cross-Sectional Study. *International Journal of Endocrinology*, vol. 2018, Article ID 9793850, 6 pages, 2018 IF=2,34

### 18.2. Publikace s IF, které se nezabývají problematikou dizertační práce

- 1) Jiskra J, Fait T, Bílek R, Krátký J, Bartáková J, Lukáš J, Límanová Z, Telička Z, Zamrazil V, Potluková E. Mild iodine deficiency in women after spontaneous abortions living in an iodine-sufficient area of Czech Republic: prevalence and impact on reproductive health. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014 Mar;80(3):452-8 IF=3,08
- 2) Bartáková J, Potluková E, Rogalewicz V, Fait T, Schöndorfová D, Telička Z, Krátký J, Jiskra J. Screening for autoimmune thyroid disorders after spontaneous abortion is cost-saving and it improves the subsequent pregnancy rate. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2013 Nov 22;13:217 IF=2,331
- 3) Jiskra J, Antošová M, Krátký J, Vítková H, Límanová Z, Marečková H, Potluková E. CXCR3, CCR5, and CRTH2 Chemokine Receptor Expression in Lymphocytes

Infiltrating Thyroid Nodules with Coincident Hashimoto's Thyroiditis Obtained by Fine Needle Aspiration Biopsy. *J Immunol Res.* 2016;2016:274361 IF=3,23

- 4) Cinkajzlová A, Lacinová Z, Kloučková J, Kaválková P, Trachta P, Kosák M, Krátký J, Kasalický M, Doležalová K, Mráz M, Haluzík M. An alternatively activated macrophage marker CD163 in severely obese patients: the influence of very low-calorie diet and bariatric surgery. *Physiol Res.* 2017 Sep 22;66(4):641-652 IF=1,32

### **18.3. Publikace bez IF, které se zabývají problematikou dizertační práce**

- 1) Kratky J, Jiskra J. Nové možnosti diagnostiky tyreoidálních uzlů, *DMEV* 2013 (3) 165-173
- 2) Kratky J, Jiskra J, Chronická lymfocytární tyreoiditida a karcinom štítné žlázy. *Vnitř Lek.* 2015 Oct;61(10):878-81

