



Ο ρόλος του ιού Parvovirus B19 στον καρκίνο του  
θυρεοειδούς αδένος

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ  
ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Υποβληθείσα στο

Τμήμα Ιατρικής

του

Πανεπιστημίου Κρήτης

Υπό

**Δημητρίου Κ. Νασίκα**

Χειρουργού

Για την απόκτηση του  
τίτλου του Διδάκτορα

Ηράκλειο, 2020



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ PARVOVIRUS B19 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ  
ΑΔΕΝΑ

Υπό

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Κ. ΝΑΣΙΚΑ**

Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Κρήτης

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ

Καθηγητής,

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

---

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗΣ

Αφ. Καθηγητής,

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

---

ΜΑΡΙΑ ΤΖΑΡΔΗ

Καθηγήτρια,

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

---

ΟΔΥΣΣΕΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΖΩΡΑΣ

Καθηγητής,

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

---

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΣΥΜΒΟΥΛΑΚΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής,

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

---

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής,

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

---

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΛΑΣΙΘΙΩΤΑΚΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής,

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

---



*Αφιερώνεται στην  
Οικογένεια μου*



## *Αντί προλόγου*

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε υπό την σκέπη της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και αποτελεί το επιστέγασμα των σπουδών μου, κατόπιν της λήψης του Πτυχίου της Ιατρικής και του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, από το ίδιο τμήμα.

Είναι λοιπόν για εμένα, ιδιαίτερη χαρά και τιμή, η επίβλεψη της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής από εξαιρετους Πανεπιστημιακούς Δασκάλους που η διαρκής αρωγή και υποστήριξή τους μετρά ήδη αρκετά χρόνια.

Τις θερμότερες των ευχαριστιών μου χρωστώ στον Καθηγητή Γεώργιο Σουρβίνο, ο οποίος με τη συνεχή καθοδήγηση του και την αγάπη του για την επιστήμη, αποτέλεσε -και αποτελεί- το παράδειγμά μου στο διαρκές «ταξίδι» της επιστημονικής γνώσης. Τον ευχαριστώ επίσης για την υποστήριξή του στις αμέτρητες ώρες δουλειάς εντός του εργαστηρίου αλλά και για τις μακροσκελείς μας επιστημονικές συζητήσεις, συμβάλλοντας καθοριστικά στην επιστημονική μου ολοκλήρωση. Δίχως την πολύτιμη συμβολή του, η παρούσα Διδακτορική Διατριβή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες χρωστώ στον Καθηγητή Γεώργιο Χαλκιαδάκη, ο οποίος αποτέλεσε την πηγή έμπνευσης μου για την ειδικότητα της Γενικής Χειρουργικής, ήδη από τα φοιτητικά μου χρόνια. Θυμάμαι ακόμη την αφοσίωσή του στον ασθενή και την προσήλωσή του στη χειρουργική επιστήμη, αποτελώντας για εμένα τον πρώτο Δάσκαλο μου στη χειρουργική και παράλληλα ένα πρότυπο Χειρουργού και Πανεπιστημιακού Δασκάλου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Καθηγήτρια Μαρία Τζαρδή για την υποστήριξη και την καθοδήγηση της στην εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Οι βασικές αρχές και η άριστη γνώση της Παθολογικής Ανατομίας, είναι από τα σημαντικότερα εφόδια ενός χειρουργού στην καριέρα του και την ευχαριστώ που ήδη από τα προπτυχιακά μου χρόνια, μου προσφέρει τις πολύτιμες γνώσεις της.

Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή Οδυσσέα Ιωάννη Ζώρα για την πολύτιμη συμβολή του στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή αλλά και ως Πανεπιστημιακό Δάσκαλο μου στα προπτυχιακά χρόνια. Είχα τη χαρά και την τιμή να παραλαμβάνω από εκείνον -ως Πρόεδρο του τμήματος Ιατρικής- σε κάθε θερινή ορκωμοσία τις 6 υποτροφίες του Ιδρύματος

Κρατικών Υποτροφιών (κάθε έτος) καθώς και την Υποτροφία Βασιλάκη, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Εμμανουήλ Συμβουλάκη για την καθοριστική συμβολή του στην διενέργεια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Οι συνεχείς παρατηρήσεις του και η διαρκής αρωγή του συνέβαλλαν τα μέγιστα για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ θερμά επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο, ο οποίος με την επιστημονική του αρτιότητα συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Κωνσταντίνο Λασιθιωτάκη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

Επιπλέον οφείλω θερμές ευχαριστίες στον κ. Γεώργιο Σακοράφα, διευθυντή μου στο νοσοκομείο Άγιος Σάββας, ο οποίος συνέβαλλε και υποστήριξε καθοριστικά την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Ακόμη οφείλω θερμές ευχαριστίες στον Σταύρο Δέρδα, στον Αντώνη Μπερτσιά και στη Μαρία Σκουλά για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον διευθυντή μου κατά τη διάρκεια του μέρους της ειδικότητάς μου στις ΗΠΑ, Καθηγητή Χειρουργικής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Στανφορντ Jeffrey Norton για την συμβολή και το παράδειγμά του στην επιστημονική μου ολοκλήρωση.

Ακόμη θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Διευθυντή της Β' Χειρουργικής Κλινικής Μαστού του Νοσοκομείου «ΙΑΣΩ» και μέντορά μου στη χειρουργική του μαστού, χειρουργού Δρ Γρηγορίου Ξεπαπαδάκη, ο οποίος με περιέβαλε με την αμέριστη συμπαράστασή του, αναδεικνύοντας καθημερινά την ανάγκη σύνδεσης της χειρουργικής πράξης με την ερευνητική δραστηριότητα.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου χρωστώ στον Καθηγητή Δημήτρη Μπούμπα, ο οποίος από τα προπτυχιακά έτη, αποτελεί για εμένα το πρότυπο ιατρού και ανθρώπου. Θα ακολουθώ πάντοτε τις ιατρικές αρχές που με δίδαξε και συνεχίζει να με διδάσκει με το παράδειγμά του.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τον αδελφό μου Νεκτάριο για την συνεχή αρωγή και έμπνευσή τους.







Κατά την τελευταία δεκαετία, ένας αναδυόμενος αριθμός μελετών επιχειρεί να διερευνήσει το ρόλο του Παρβοϊού B19 (B19V) στην καλοήγη και κακοήγη θυρεοειδική νόσο. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υφίστανται σαφείς αποδείξεις σχετικά με την παρουσία του του Παρβοϊού B19 στα καρκινικά κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα αλλά και τα φυσιολογικά κύτταρα του θυρεοειδούς, και έτσι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να συσχετίζουν τον Παρβοϊό B19 με την παθολογία του θυρεοειδούς. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε την παρουσία του του Παρβοϊού B19 τόσο σε μη φυσιολογικά όσο και σε φυσιολογικά δείγματα θυρεοειδικού ιστού ασθενών μετά από ολική θυρεοειδεκτομή, καθώς και στο βαθμό που αυτό το φαινόμενο εμφανίζεται σε μια ομάδα πληθυσμού ενός τριτοβάθμιου τμήματος Χειρουργικής Ογκολογίας. Εξετάσαμε 41 δείγματα τόσο μη φυσιολογικού όσο και παρακείμενου φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ολική θυρεοειδεκτομή (με κακοήγη ή καλοήγη προεγχειρητική διάγνωση) εντός μιας περιόδου 3 ετών. Η γονιδιακή αλληλουχία του ιού Parvovirus B19 αναλύθηκε με Real-Time PCR. Η θυρεοειδίτιδα του Hashimoto, το μέγεθος του θυρεοειδούς αδένα, το μέγιστο μέγεθος του κυρίαρχου όζου του θυρεοειδούς αδένα καθώς και το φύλο και η ηλικία των ασθενών αξιολογήθηκαν επίσης σε σχέση με την παρουσία του Παρβοϊού B19. Το γονιδίωμα του Παρβοϊού B19 ανιχνεύθηκε σε 21 από τα 41 (51,2%) δείγματα θυρεοειδικού ιστού. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά στο φύλο, στην ηλικία, στη μετεγχειρητική διάγνωση, στη διαμέτρου του όζου του θυρεοειδούς αδένα, στο βάρος και την παρουσία πολυεστιακής νόσου. Η συσχέτιση μεταξύ της επίπτωσης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto και της απουσίας του γονιδιώματος του Παρβοϊού B19 ήταν στατιστικά σημαντική. Τα ευρήματά μας έδειξαν αυξημένη παρουσία του DNA του Παρβοϊού B19 σε θυρεοειδικό ιστό στον πληθυσμό που εξετάστηκε. Ο πραγματικός ρόλος του ιού και οι πιθανές συνέπειές του στην ανάπτυξη ή την εξέλιξη των θυρεοειδών νόσων πρέπει να διευκρινιστούν περαιτέρω. Απαιτούνται μεγαλύτερες προοπτικές μελέτες για την αποσαφήνιση του ρόλου της



θυρεοειδίτιδας του Hashimoto αλλά και της γεωγραφικής ενδημικότητας του Παρβοϊού B19 και ο ρόλος τους στην θυρεοειδική νόσο.



During the last decade, an emerging number of studies have investigated the role of Parvovirus B19 (B19V) presence in thyroid disease. However, no clear evidence considering the presence of Parvovirus B19 in thyroid cancer cells and normal thyroid epithelial cells has been established to date and thus sufficient supporting data associating Parvovirus B19 to thyroid pathology are missing. In the present study, we sought to investigate the presence of Parvovirus B19 in both abnormal and normal adjacent thyroid tissue specimens after total thyroidectomy as well as the extent that this phenomenon occurs in a population group referred to a tertiary surgical oncology department. We examined both abnormal and normal adjacent thyroid tissue specimens from forty-one patients who underwent total thyroidectomy for thyroid disease (cancerous or benign) within a 3-year period in a tertiary surgical oncology department. Parvovirus B19 viral gene sequence was amplified by Real-Time PCR. Hashimoto's thyroiditis, thyroid gland weight, maximum size of the predominant thyroid nodule as well as sex and age of the patients were also evaluated in respect to the Parvovirus B19 presence. Parvovirus B19 virus genome was detected in 21/41 (51.2%) patients thyroid tissue samples. No statistically significant difference was noted regarding the sex, age, postoperative diagnosis, thyroid weight and maximum nodule diameter and presence of multifocal disease. The correlation between the incidence of Hashimoto Thyroiditis and absence of Parvovirus B19 genome was statistically significant. Our findings showed high prevalence of Parvovirus B19 DNA in thyroid tissue disease in the population examined. Its actual role of the virus and its potential implication in the development or progression of thyroid diseases remain to be elucidated. Larger cohort studies are needed in order to validate a quasi-mutually exclusive role of Hashimoto's thyroiditis and Parvovirus B19 presence in thyroid disease in terms of geographical distribution.



## Περιεχόμενα

### Εισαγωγή

### Κεφάλαιο 1

#### Ο θυρεοειδής αδένας

- 1.1 Εισαγωγικά – ιστορικά στοιχεία
- 1.2 Εμβρυολογία του θυρεοειδούς αδένος
- 1.3 Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος
- 1.4 Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος
- 1.5 Καλοήθεις παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος
- 1.6 Καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος

### Κεφάλαιο 2

#### Parvovirus B19

- 2.1 Δομή των ιών Parvovirus
- 2.2 Λοιμώξεις των ιών Parvovirus
- 2.3 Από τη λοίμωξη στην καρκινογένεση του θυρεοειδούς αδένος

### Κεφάλαιο 3

#### Υλικό και Μεθοδολογία της μελέτης

- 3.1 Επιλογή, ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά ασθενών
- 3.2 Συλλογή και επεξεργασία των ιστικών παρασκευασμάτων ασθενών
- 3.3 Στατιστική ανάλυση

### Κεφάλαιο 4

#### Αποτελέσματα

- 4.1 Παρουσία του Parvovirus B19 στα ιστικά δείγματα
- 4.2 Συσχέτιση του Parvovirus B19 με την θυρεοειδίτιδα Hashimoto

Κεφάλαιο 5  
Συζήτηση - Συμπεράσματα

Παράρτημα

Βιβλιογραφικές αναφορές

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Εμβρυολογία του θυρεοειδούς αδένος

Εικόνα 2. Τοπογραφική ανατομία του θυρεοειδούς αδένος

Εικόνα 3. Τοπογραφική ανατομία των παλίνδρομων λαρυγγικών νεύρων

Εικόνα 4. Η αιμάτωση του θυρεοειδούς αδένος

Εικόνα 5. Ανατομικά λεμφαδενικά διαμερίσματα του τραχήλου

Εικόνα 6. Συσχέτιση της παρουσίας του Παρβοϊού B19 με την ηλικία των ασθενών της μελέτης

Εικόνα 7. Συσχέτιση της παρουσίας του Παρβοϊού B19 με το βάρος του θυρεοειδούς αδένος των ασθενών της μελέτης

Εικόνα 8. Συσχέτιση της παρουσίας του Παρβοϊού B19 με τη μέγιστη διάμετρο του προεξάρχοντος όζου του θυρεοειδούς αδένος των ασθενών της μελέτης





## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Συμπτώματα και κλινικά σημεία στον υπερθυρεοειδισμό

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των ιστικών παρασκευασμάτων σε συνάρτηση με την παρουσία ή απουσία του B19V

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των ιστικών παρασκευασμάτων σε συνάρτηση με την παρουσία ή απουσία του B19V στις επιμέρους υποομάδες

Τις τελευταίες δεκαετίες και κυρίως λόγω της ευρείας χρήσης του υπερήχου του τραχήλου και της διαθεσιμότητάς του, έχει σημειωθεί αύξηση στην ανίχνευση όζων του θυρεοειδούς αδένα στον γενικό πληθυσμό. Αν και ο θάνατος από καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα είναι σπάνιος, ορισμένοι παράγοντες κινδύνου έχουν προταθεί, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία σε νεαρή ηλικία και το θετικό οικογενειακό ιστορικό. Ο πλέον συχνός ιστολογικός τύπος του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα είναι το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (Papillary thyroid cancer - PTC), που αντιπροσωπεύει περίπου το 80% όλων των περιπτώσεων καρκίνου (1). Η πολυοζώδης βρογχοκήλη (MNG) αναφέρεται στην παρουσία πολλαπλών, ασύμμετρων οζιδίων του θυρεοειδούς αδένα σε έναν συχνά διογκωμένο θυρεοειδή αδένα που προκαλείται κυρίως από την έλλειψη ιωδίου. Αν και η πολυοζώδης βρογχοκήλη θεωρείται κλασικά ως καλοήθης νόσος του θυρεοειδούς αδένα με εκτιμώμενο επιπολασμό περίπου 4% στις δυτικές χώρες, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη πιθανόν υψηλότερου κινδύνου καρκίνου, κοντά σε εκείνο του μονήρους όζου του θυρεοειδούς αδένα (2).

Ο Ερυθροϊός B19 (παλαιότερα γνωστός ως Parvovirus B19) (EVB19) είναι μέλος της οικογένειας Parvoviridae, που αποτελείται από ένα γραμμικό, μονόκλωνο γονιδίωμα DNA με μέγεθος περίπου 5,6kb. Ο EVB19 είναι ένας ιός με διάμετρο περίπου 23–26 nm (3). Η μόλυνση με EVB19 μπορεί να προκαλέσει πολλές ασθένειες στον άνθρωπο, όπως παροδική απλαστική κρίση, εμμένουσα αναιμία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, καρδιομυοπάθεια και φλεγμονή διαφόρων άλλων ιστών (4,5,6). Δύο πρωτεΐνες του καψιδίου (VP1 και VP2) και μία μεγάλη, μη δομική πρωτεΐνη (NS1) κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του EVB19 (7).

Η πρώτη αναφορά που συνδέει τη παρουσία του Ερυθροϊού B19 με το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς ανακοινώθηκε το 2008 (8). Οι συγγραφείς ανέφεραν την παρουσία αλληλουχιών του Ερυθροϊού B19 σε βιοπτικά, μονιμοποιημένα σε παραφίνη, δείγματα θυρεοειδούς αδένα ασθενών με θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένα. Επιπλέον

ανακοίνωσαν και την παρουσία των πρωτεϊνών του καψιδίου. Περισσότερα στοιχεία ήταν διαθέσιμα το 2011 και η παρουσία του Ερυθροϊού B19 αναφέρθηκε τόσο στο αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς (ATC) όσο και στη θυρεοειδίτιδα (HT) του Hashimoto σε αρχειοθετημένα δείγματα ιστού του θυρεοειδούς αδένα (9). Η ίδια ομάδα το 2014 ανέφερε για πρώτη φορά, την παρουσία DNA του Ερυθροϊού B19, mRNA και καψιδιακών πρωτεϊνών όχι μόνο στα καρκινικά κύτταρα του θυρεοειδούς, αλλά και στα παρακείμενα φυσιολογικά κύτταρα του θυρεοειδούς ιστού χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά (10). Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη, η ανίχνευση του Ερυθροϊού B19 μέσω ανοσοϊστοχημείας (IHC) διαπιστώθηκε ότι δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των δειγμάτων του θυρεοειδούς ιστού της νόσου του Grave και των δειγμάτων του θυρεοειδούς ιστού της πολυοζώδους βρογχοκήλης του θυρεοειδούς (11).

Αν και ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών κατά την τελευταία δεκαετία υποδηλώνει πιθανό ρόλο της παρουσίας του του Ερυθροϊού B19 στη νόσο του θυρεοειδούς αδένα, ωστόσο υπάρχουν αντικρουόμενες ενδείξεις σχετικά με την συνπαρουσία του Ερυθροϊού B19 στα καρκινικά κύτταρα του θυρεοειδούς και στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα. Στοχεύσαμε στο να διερευνήσουμε την παρουσία του ερυθροϊού B19 σε δείγματα θυρεοειδικού ιστού ασθενών μετά από ολική θυρεοειδεκτομή τόσο για κακοήθη όσο και για καλοήθη διάγνωση και το βαθμό που αυτό το φαινόμενο εμφανίζεται στον πληθυσμό.

## 1.1 | Εισαγωγικά – ιστορικά στοιχεία

Η ονοματοδοσία του ανθρώπινου οργάνου που σήμερα καλείται θυρεοειδής αδένας αλλά και η εκλατινισμένη της μορφή που έχει επικρατήσει στην αγγλική ορολογία και τη διεθνή βιβλιογραφία (thyroid gland), έχει τις ρίζες της στην αρχαία Ελλάδα και στις απαρχές της περιγραφικής ανατομίας. Έχοντας το σχήμα του θυρεού, προσομοιάζει σε μία ασπίδα που φυλάττει τον τράχηλο.

Οι πρώτες θεραπευτικές παρεμβάσεις για τις παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος αναφέρονται ήδη από το 2.700 π.Χ. στην Κίνα υπό την αυτοκρατορία του Σεν Νούνγκ και αφορούσαν στη χορήγηση φύκων της θάλασσας σε ασθενείς με βρογχοκήλη. Παρόμοιες αναφορές υπάρχουν και το 1500 π.Χ. από την Αίγυπτο,



όπου οι θεραπευτές της εποχής αναφέρουν τη χρήση ενός άλατος για τη θεραπεία της βρογχοκήλης. Έκτοτε υπάρχουν παρόμοιες αναφορές μέχρι και τον 16ο και 17ο αιώνα όπως για παράδειγμα οι ανατομικές περιγραφές του Andreas Vesalius αλλά και οι χειρόγραφες απεικονίσεις του Λεονάρντο ντα Βίντσι (12,13). Όλες όμως αυτές οι αναφορές, περιορίστηκαν στην περιγραφή της παθολογικής διόγκωσης του θυρεοειδούς αδένα και τη δημιουργία της βρογχοκήλης καθώς και οι όποιες χειρουργικές προσεγγίσεις επιχειρήθηκαν, παρουσίασαν σοβαρές επιπλοκές και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας.

Όμως προς τα τέλη του 19ου αιώνα, όπου οι αρχές της αντισηψίας του Lister εδραιώθηκαν καθώς και οι τεχνικές της αναισθησίας έθεταν τις βάσεις τους, παράλληλα με τη δημιουργία των πρώτων οργανωμένων νοσοκομείων στην Ευρώπη, τέθηκαν οι βάσεις για ασφαλείς επεμβάσεις του θυρεοειδούς αδένα. Σε αυτό το πλαίσιο οι Theodor Kocher και Theodor Billroth εφάρμοσαν τις χειρουργικές τους τεχνικές στις παθήσεις του θυρεοειδούς αδένα -αλλά και όχι μόνο- και έθεσαν τις βάσεις για την κατανόηση της φυσιολογίας και της παθοφυσιολογίας αυτού του οργάνου. Στις σειρές ασθενών που δημοσίευσε ο Theodor Kocher η εγχειρητική θνησιμότητα της θυρεοειδεκτομής αναφέρεται 1 προς 500 επεμβάσεις, πολύ μικρότερο ποσοστό από το μέχρι τότε αναφερθέν 1 προς 6 επεμβάσεις θυρεοειδούς. Για τη συνολική του αυτή προσφορά ο Theodor Kocher τιμήθηκε με το βραβείο «ιατρικής και φυσιολογίας Νόμπελ» το 1909 (14,15,16).

Τον 20ο αιώνα ο δρόμος πλέον ήταν ανοικτός για την εις βάθος μελέτη των παθήσεων του θυρεοειδούς αδένα αλλά και τη βελτίωση των χειρουργικών τεχνικών. Σημαντική πρόοδος συντελέστηκε στον τομέα της επιδημιολογίας της νόσου αλλά και των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση τους. Επίσης μελετήθηκαν οι παραγόμενες από τον θυρεοειδή αδένα ορμόνες και ο κεντρικός ρόλος που αυτές κατέχουν στο μεταβολισμό του ανθρώπου, μελετώντας ενδελεχώς τις παθήσεις του υπερθυρεοειδισμού και του υποθυρεοειδισμού αλλά και του καρκίνου του θυρεοειδούς (17,18). Επίσης σημαντική ώθηση δόθηκε στις απεικονιστικές τεχνικές



για τη διάγνωση των θυρεοειδικών παθήσεων όπως το υπερηχογράφημα, η αξονική τομογραφία και το σπινθηρογράφημα του θυρεοειδούς αδένα. Ακόμη, χαρακτηρίστηκαν οι λεπτές ανατομικές σχέσεις του θυρεοειδούς αδένα με τους παραθυρεοειδείς αδένες και τα παλίνδρομα λαρυγγικά τα νεύρα. Επίσης μελετήθηκαν νέες χειρουργικές προσεγγίσεις όπως, η λοβεκτομή έναντι της ολικής θυρεοειδεκτομής αλλά και ο λεμφαδενικός καθαρισμός σε συγκεκριμένα ανατομικά διαμερίσματα σε περιπτώσεις καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα (19,20). Τέλος εφαρμόστηκαν ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές όπως η θερμοκαυτηρίαση με ραδιοσυχνότητες καλοήθων βλαβών του θυρεοειδούς αδένα (RF Ablation) αλλά και η αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (Fine Needle Aspiration) ύποπτων για κακοήθεια όζων του θυρεοειδούς αδένα και η κυτταρολογική εξέταση των ευρημάτων της, θέτοντας τη διάγνωση σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

Στη βάση όλων αυτών των επαναστατικών επιτευγμάτων του 20ου αιώνα, στον 21ο αιώνα ανήκουν η περαιτέρω εξέλιξη και βελτίωση τους αλλά κυρίως η μελέτη του γενετικού υπόβαθρου των παθήσεων του θυρεοειδούς αδένα, η οποία οδηγεί σε στοχευμένες θεραπείες, σε πρωιμότερη διάγνωση ταχύ και αποδοτικό τρόπο και εξαιρετικά χαμηλή νοσηρότητα.



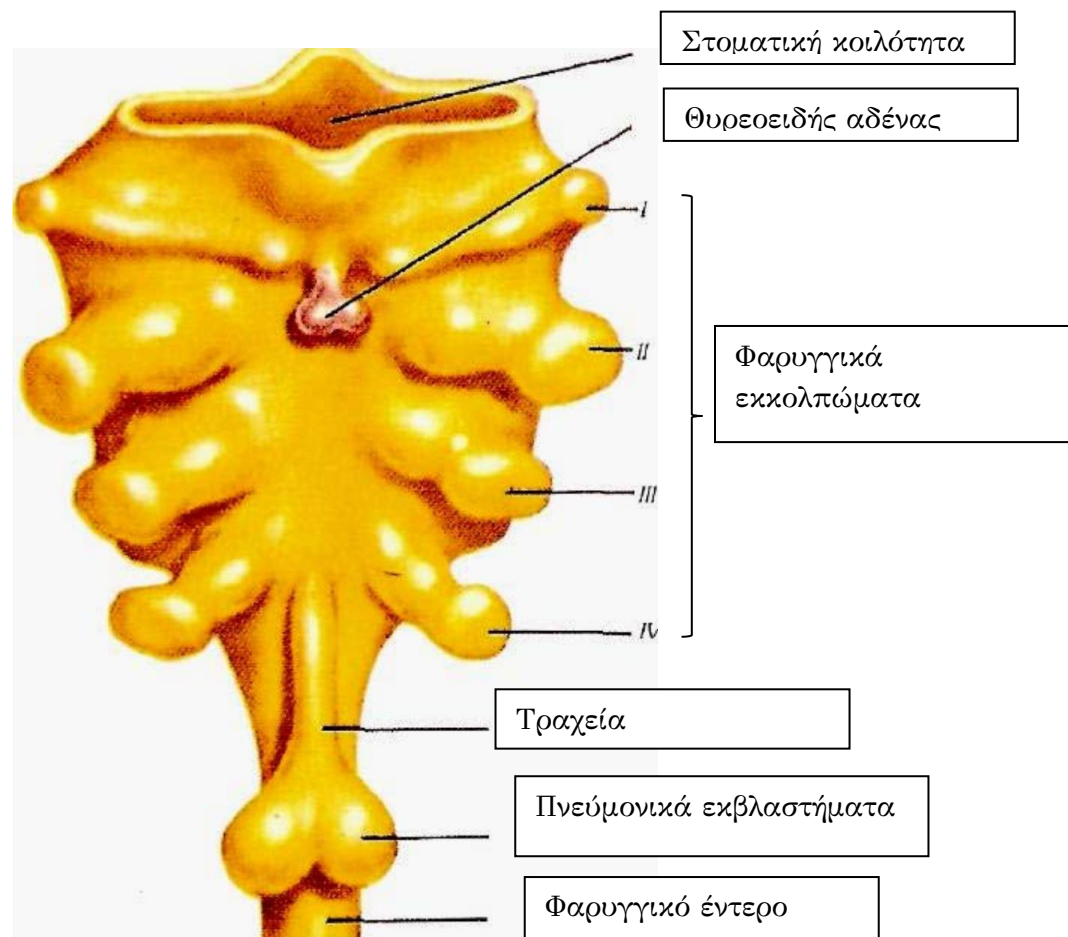
## 1.2 | Εμβρυολογία του θυρεοειδούς αδένα

Κατά την ενδομήτριο ζωή ο θυρεοειδής αδένας εμφανίζεται ως ένα ενδοδερμικό εκβλάστημα μεταξύ του άζυγου φύματος και του υποβραγχιακού επάρματος στο έδαφος του φάρυγγα, όπως φαίνεται στη εικόνα 1. Το σημείο αυτό είναι γνωστό ως το τυφλό τρήμα στη βάση της γλώσσας. Ακολουθεί η κάθοδος του θυρεοειδούς αδένα με τη μορφή ενός δίλοβου πλέον εκκολπώματος ακριβώς μπροστά από το φαρυγγικό έντερο. Καθ'όλη τη διάρκεια της μετανάστευσης του θυρεοειδούς αδένα εκείνος παραμένει συνδεδεμένος με τη βάση της γλώσσας μέσω ενός στενού πόρου ο οποίος αργότερα, φυσιολογικά εξαφανίζεται και αποτελεί τον θυρεογλωσσικό πόρο (21). Την έβδομη εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής, ο θυρεοειδής αδένας κατέρχεται μπροστά από το υοειδές οστό και τους χόνδρους του





λάρυγγα και καταλαμβάνει την τελική του θέση μπροστά από την τραχεία, έχοντας ήδη σχηματίσει έναν μικρό ισθμό και δύο διακριτούς πλέον πλάγιους λοβούς. Η λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος ξεκινά προς το τέλος του τρίτου μήνα της ενδομήτριας ζωής όταν έχουν σχηματιστεί πλέον τα πρώτα θυλάκια που περιέχουν κολλοειδές (22). Τα θυλακιώδη αυτά κύτταρα παράγουν το κολλοειδές το οποίο χρησιμεύει ως πηγή θυροξίνης και τριιωδοθυρονίνης ενώ τα παραθυλακικά κύτταρα ή κύτταρα C, προέρχονται από το οπισθοβραγχιακό σωματίο και παράγουν την καλσιτονίνη (23,24).



Εικόνα 1. Εμβρυολογία του θυρεοειδούς αδένος (Langman's Embryology, 1999)

Σε οποιοδήποτε σημείο της πορείας μετανάστευσης του θυρεοειδούς αδένα, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ένα κυστικό υπόλειμμα του θυρεογλωσσικού πόρου, γνωστό και σαν θυρεογλωσσική κύστη. Εάν αυτή η κύστη επικοινωνεί με το περιβάλλον με σηραγγωδη πόρο τότε ονομάζεται θυρεογλωσσικό συρίγγιο. Υπόλειμμα του θυρεογλωσσικού πόρου πλησίον του ισθμού του θυρεοειδούς αδένα αποτελεί ασταθές εύρημα και εφ'όσον υφίσταται, καλείται πυραμοειδής λοβός του θυρεοειδούς αδένα. Η ύπαρξη του πυραμοειδούς λοβού του θυρεοειδούς αδένα αναφέρεται σε νεκροτομικά ευρήματα σε ποσοστό 30-50%. Επίσης καθ'όλη την πορεία της μετανάστευσης του θυρεοειδούς αδένα μπορεί να παρατηρηθεί έκτοπος θυρεοειδικός ιστός, με πιο συχνή θέση τη βάση της γλώσσας αμέσως πίσω από το τυφλό τρήμα και μπορεί να εμφανίσει τα ίδια νοσήματα με τον κυρίως θυρεοειδή αδένα (25).

Αναφορικά με τη βιολογική καταβολή των παραθυρεοειδών αδένων, οι δύο κάτω παραθυρεοειδείς αδένες προέρχονται από τον τρίτο φαρυγγικό θύλακο, ενώ οι δύο άνω παραθυρεοειδείς αδένες προέρχονται από τον τέταρτο φαρυγγικό θύλακο. Τέλος ο πέμπτος φαρυγγικός θύλακος (συχνά αναφέρεται ως τμήμα του τέταρτου φαρυγγικού θυλάκου) παράγει το τελοβραγχιακό σωματίο το οποίο αργότερα ενσωματώνεται στο θυρεοειδή αδένα. Στον ενήλικα τα κύτταρα του τελοβραγχιακού σωματίου παράγουν τα παραθυλακικά κύτταρα ή κύτταρα C του θυρεοειδούς αδένα. Από αυτά τα κύτταρα παράγεται η καλσιτονίνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ασβεστίου στο αίμα (26,27).



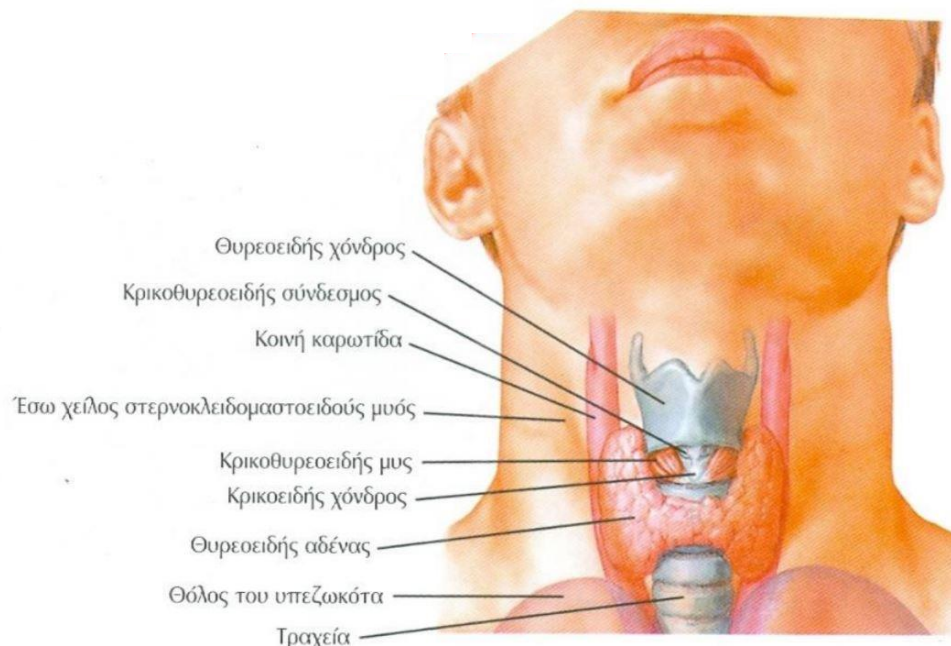
## 1.3 | Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος

### Τοπογραφική ανατομία

Σε έναν ενήλικα το βάρος του θυρεοειδούς αδένος κυμαίνεται από 10 έως 20 γραμμάρια και καταλαμβάνει θέση, στο πρόσθιο τμήμα του τραχήλου ακριβώς μπροστά από τον θυρεοειδή χόνδρο, στη συμβολή του λάρυγγα με την τραχεία. Η τοπογραφική ανατομία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μιας και οι δύο λοβοί του θυρεοειδούς αδένος εκτείνονται μέχρι την τραχειοοισοφαγική αύλακα στα πλάγια



ενώ βρίσκονται πρόσθια και έσω των καρωτίδων δεματίων, οπίσθια και έσω των στερνοκλειδομαστοειδών μυών, των στερνοϋοειδών μυών και των στερνοθυρεοειδών μυών (28). Οι δύο λοβοί ενώνονται στο μέσον, μέσω του ισθμού, το ανώτατο όριο του οποίου τοποθετείται στο ύψος του κρικοειδούς χόνδρου όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 2.



Εικόνα 2. Τοπογραφική ανατομία του θυρεοειδούς αδένα (Netter's Atlas of Anatomy, 2002)

Η προτραχειακή περιτονία επεκτείνεται και επενδύει ολόκληρο τον θυρεοειδή αδένα και αποτελεί ξεχωριστή ανατομική δομή από την κάψα του θυρεοειδικού παρεγχύματος. Οι δυο τους συνέχονται στα πλάγια, σχηματίζοντας έναν ισχυρό ινώδη σύνδεσμο, τον γνωστό σύνδεσμο του Berry ο οποίος και αναρτά τον θυρεοειδή αδένα στις πλάγιες επιφάνειες του κρικοειδούς χόνδρου. Ο σύνδεσμος του Berry αποτελεί σημαντικό χειρουργικό σημείο λόγω της στενής ανατομικής του σχέσης με

το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο, το οποίο οφείλει να αναγνωρίζεται διαφυλάσσεται διεγχειρητικά (29).



Εννεύρωση του θυρεοειδούς αδένα

Ο θυρεοειδής αδένας δέχεται παρασυμπαθητική νεύρωση από το πνευμονογαστρικό νεύρο που αποτελεί τη δέκατη εγκεφαλική συζυγία. Ο πυρήνας του πνευμονογαστρικού νεύρου εντοπίζεται στην παραελαϊκή αυλακα του προμήκους και εξέρχεται του κρανίου από το σφαγιτιδικό τρημα. Κατά την πορεία προς το θώρακα παρέχει νεύρωση από δύο σημαντικούς κλάδους: τον έξω κλάδου του άνω λαρυγγικού νεύρου και το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο. Οποιαδήποτε βλάβη κατά τους χειρουργικούς χειρισμούς μιας θυρεοειδεκτομής επέλθει στον έξω κλάδου του άνω λαρυγγικού νεύρου που νευρώνει το κρικοφαρυγγικό μυ, μπορεί να επηρεάσει τη φώνηση και ιδιαίτερα την παραγωγή υψηλών συχνοτήτων (30).

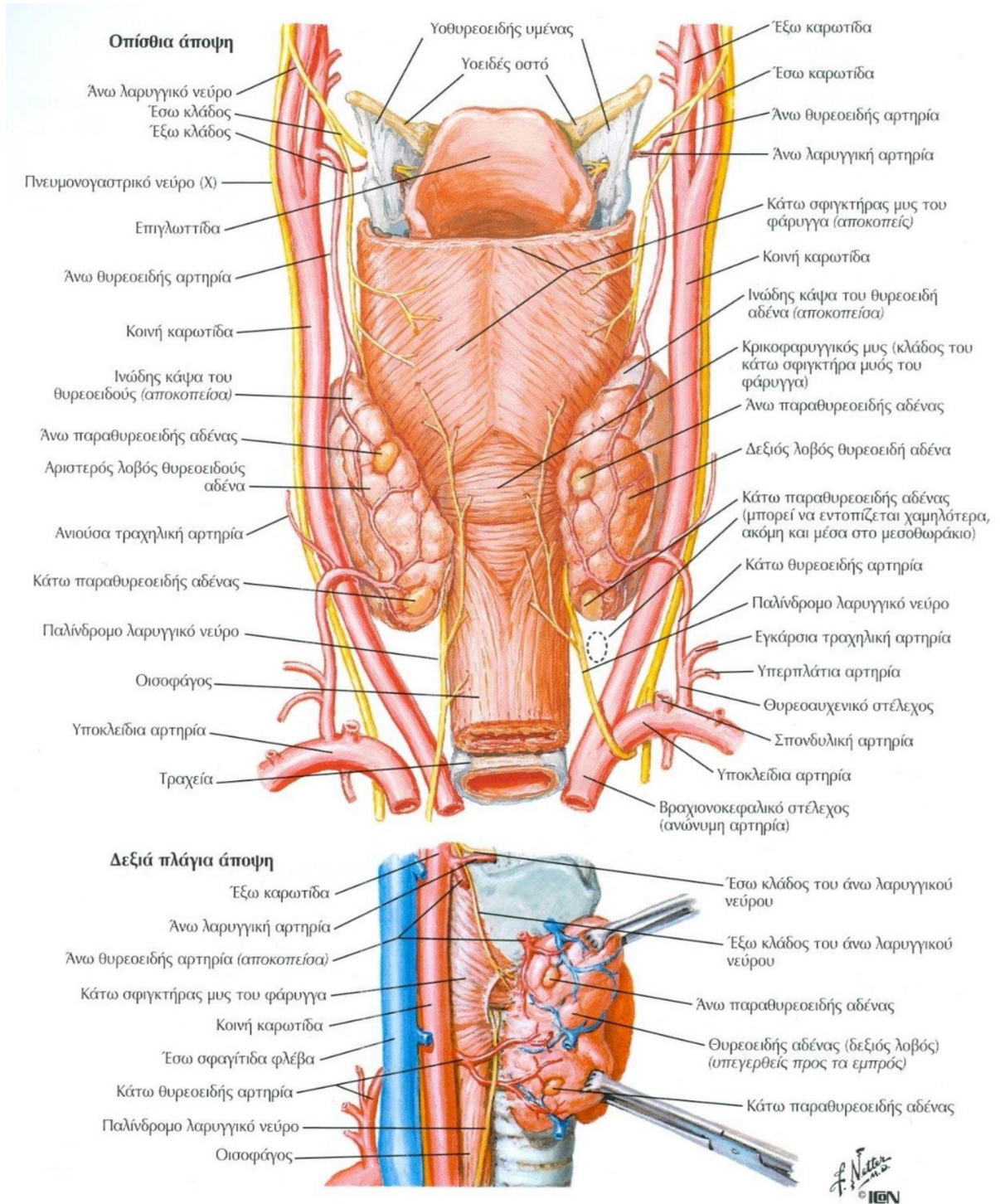
Το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο αποτελώντας κλάδο του πνευμονογαστρικού νεύρου, ονομάζεται έτσι ακριβώς διότι παλινδρομεί με κεφαλική πορεία στο επίπεδο του θώρακα. Το δεξιό παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο παλινδρομεί και διέρχεται μπροστά από την δεξιά υποκλειδία αρτηρία και λαμβάνει ανατομικά τη θέση του πλησίον ή εντός της τραχειοισοφαγικής αυλακας. Το αριστερό παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο αντίθετα, παλινδρομεί μπροστά από το αοροτικό τόξο και λαμβάνει και εκείνο ανατομική θέση πλησίον ή εντός της τραχειοισοφαγικής αυλακας (30).

Το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο θεωρείται το πιο σημαντικό ανατομικό στοιχείο κατά τη διάρκεια μιάς θυρεοειδεκτομής όχι μόνο λόγω της ανατομικής του θέσης σε σχέση με τους παραθυρεοειδείς αδένες οι οποίοι ατυχηματικά μπορεί να υποστούν βλάβη ή να εξαιρεθούν αλλά κυρίως διότι παρέχει κινητικές ίνες στις φωνητικές χορδές. Οποιαδήποτε βλάβη του νεύρου, ακόμη και θερμική από τις χρησιμοποιούμενες πηγές ενέργειας (διαθερμία), καταλείπει βράγχος φωνής. Η δε πλήρης διατομή του οδηγεί σε καθήλωση της σύστοιχης φωνητικής χορδής στη μέση γραμμή. Εάν αυτή η διατομή αφορά και στα δύο παλίνδρομα λαρυγγικά νεύρα τότε η καθήλωση και των δυο φωνητικών χορδών στη μέση γραμμή οδηγούν σε μόνιμη



απόφραξη του αεραγωγού και ο ασθενής έχει ανάγκη μόνιμης τραχειοστομίας. Ο χειρουργός του θυρεοειδούς αδένος οφείλει να είναι πολύ προσεκτικός καθώς και οι ελάχιστοι χειρουργικοί χειρισμοί κατά την παρασκευή του παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου μπορεί να οδηγήσουν σε παροδική νευροαπραξία η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε λοίμωξη του αναπνευστικού λόγω της αυξημένης πιθανότητας για εισρόφηση (31,32). Τα παραπάνω απεικονίζονται στην εικόνα 3.





Εικόνα 3. Τοπογραφική ανατομία των παλίνδρομων λαρυγγικών νεύρων  
(Netter's Atlas of Anatomy, 2002)



Αιμάτωση του θυρεοειδούς αδένος

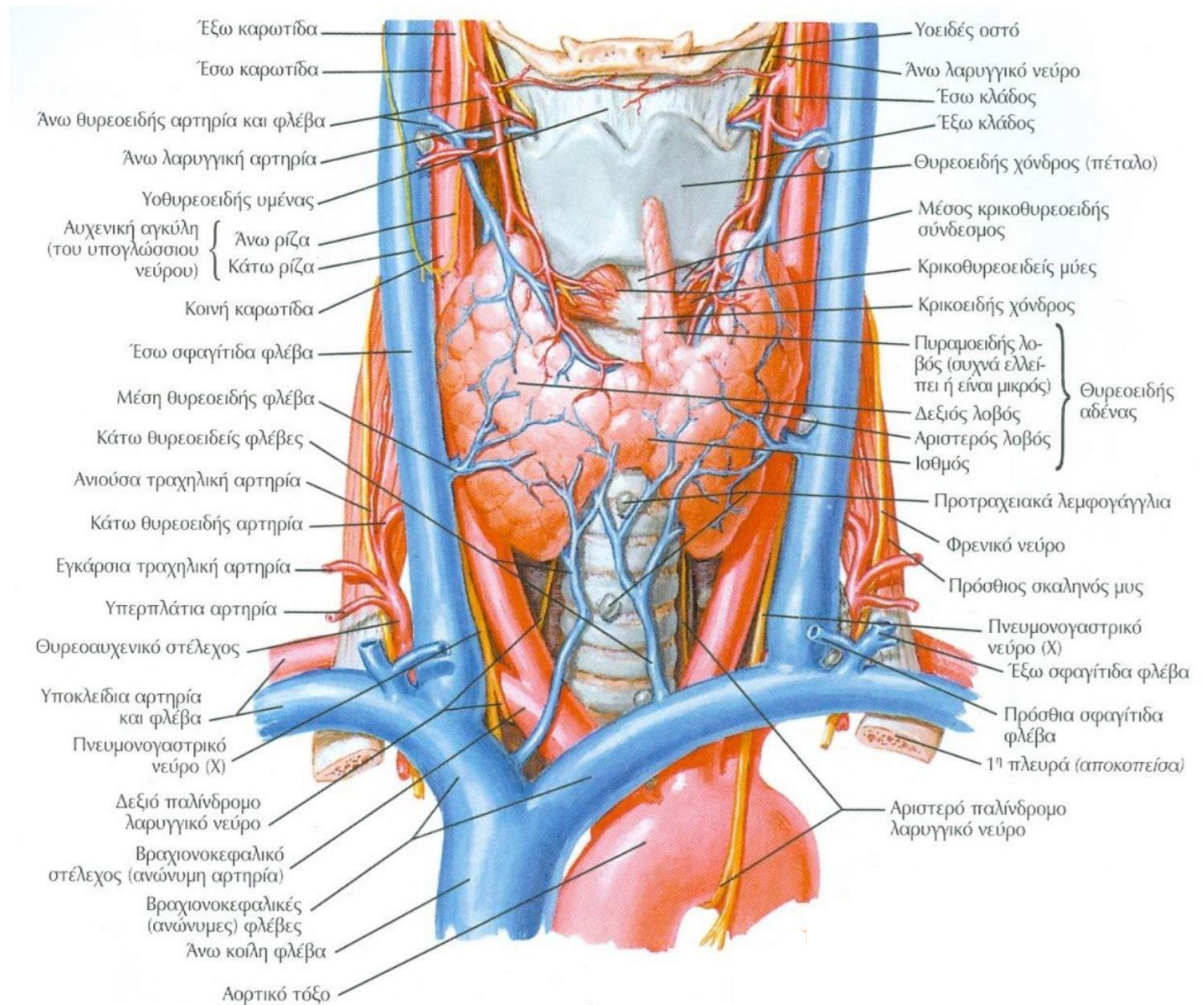
Η αρτηριακή άρδευση του θυρεοειδούς αδένος λαμβάνει χώρα από δύο ζεύγη αρτηριών, τις δύο άνω θυρεοειδικές αρτηρίες και τις δύο κάτω θυρεοειδικές αρτηρίες. Η άνω θυρεοειδική αρτηρία είναι κλάδος της έξω καρωτίδας ενώ η κάτω θυρεοειδική αρτηρία είναι κλάδος του θυρεοαυχενικού στελέχους. Ιδιαίτερα σημαντικές ανατομικές σχέσεις αναπτύσσονται στην περιοχή και η άριστη γνώση τους είναι προϋπόθεση για τον χειρουργό του θυρεοειδούς αδένος. Η άνω θυρεοειδική αρτηρία διασταυρώνεται με τον έξω κλάδο του άνω λαρυγγικού νεύρου ο οποίος πρέπει όπως προαναφέραμε να διαφυλαχθεί. Επίσης η κάτω θυρεοειδική αρτηρία χιάζεται με το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο και κατά την χειρουργική παρασκευή της θυρεοειδεκτομής απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή κάκωσης του νεύρου αυτού (33).

Επίσης οι κάτω θυρεοειδικές αρτηρίες αρδεύουν και τους παραθυρεοειδείς αδένες και θα πρέπει να λαμβάνεται πάντοτε ιδιαίτερη μέριμνα για τη διατήρηση της αιμάτωσης αυτών. Για αυτόν ακριβώς το λόγο η σωστή χειρουργική παρασκευή των κάτω θυρεοειδικών αρτηριών οφείλει να γίνεται επί της κάψας του θυρεοειδούς αδένος και όχι στο στέλεχος τους.

Τυχόν υποάρδευση των παραθυρεοειδών αδένων μπορεί να οδηγήσει άμεσα μετεγχειρητικά σε δραματική πτώση της παραθορμόνης και την κλινική εκδήλωση της υποασβεστιαϊμίας με τη χαρακτηριστική τετανία και τις καρδιακές αρρυθμίες (33).

Η φλεβική αποχέτευση του θυρεοειδούς αδένος λαμβάνει χώρα από τρεις θυρεοειδικές φλέβες: την άνω, τη μέση και την κάτω. Η άνω και μέση θυρεοειδική φλέβα εκβάλλουν στην έσω σφαγίτιδα φλέβα, ενώ η κάτω θυρεοειδική φλέβα απευθείας στις βραχιονοοκεφαλικές ή ανώνυμες φλέβες (34,35). Τα παραπάνω απεικονίζονται στην εικόνα 4.





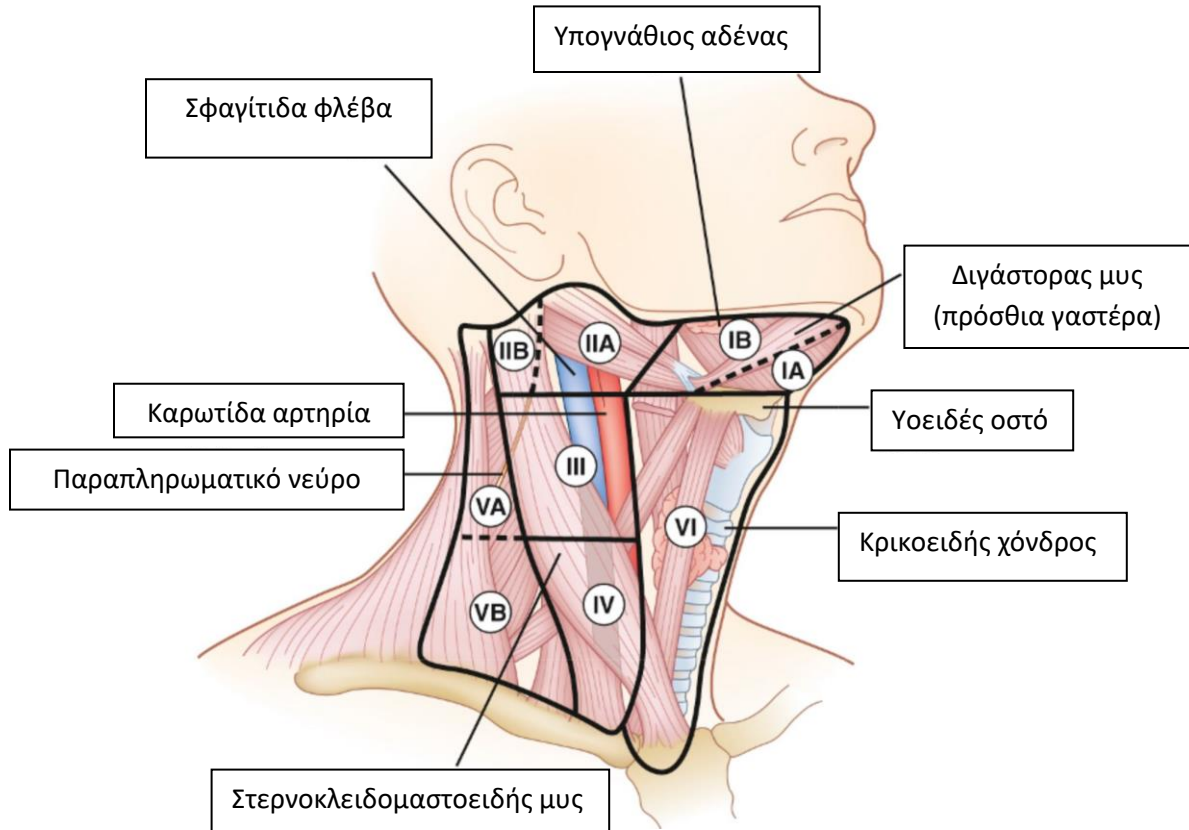
Εικόνα 4. Η αιμάτωση του θυρεοειδούς αδένος (Netter's Atlas of Anatomy, 2002)

Λεμφική αποχέτευση του θυρεοειδούς αδένος

Η μελέτη της λεμφικής αποχέτευσης του θυρεοειδούς αδένος αποκτά ιδιαίτερη σημασία όταν ο χειρουργός καλείται να αντιμετωπίσει έναν ασθενή με καρκίνο του θυρεοειδούς. Υπάρχει ένα πλούσιο λεμφικό δίκτυο του μαζικού παρεγχύματος του θυρεοειδούς αδένος το οποίο διαπλέκεται μέσω του ισθμού, μεταξύ των δύο λοβών και αρδεύει προς επιχώριους λεμφαδένες (36).

Ακριβώς επειδή ο τράχηλος αποτελεί μία περιοχή του ανθρώπινου σώματος με συγκεκριμένη ανατομική τάξη, η κλινική εξέταση των λεμφαδένων του τραχήλου αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της κλινικής εξέτασης του θυρεοειδούς. Συχνά ένας διογκωμένος λεμφαδένας γίνεται εύκολα αντιληπτός κατά την ψηλάφηση από τον έμπειρο κλινικό ιατρό. Έτσι λοιπόν ο τράχηλος διαιρείται σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές ή διαμερίσματα όπως φαίνεται στην εικόνα 5.





Εικόνα 5. Ανατομικά λεμφαδενικά διαμερίσματα του τραχήλου (Sabiston's Surgery, 2019)

Η πληθώρα της λεμφικής αποχέτευσης, άρα και των μεταστάσεων στους λεμφαδένες από καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος, λαμβάνει χώρα στο κεντρικό διαμέρισμα ή διαμέρισμα VI. Εκεί ανευρίσκονται οι προτραχειακοί λεμφαδένες αλλά και οι δελφικοί λεμφαδένες, οι παρατραχειακοί λεμφαδένες, οι λεμφαδένες της τραχειοοισοφαγικής αύλακας, οι οπισθοφαρυγγικοί, οι οπισθοοισοφαγικοί λεμφαδένες αλλά και οι λεμφαδένες του ανώτερου μεσοθωρακίου (36). Οι υπόλοιποι λεμφαδένες των πλαγίων τραχηλικών διαμερισμάτων θα πρέπει και αυτοί να χαρτογραφηθούν υπερηχογραφικά προεγχειρητικά για το βέλτιστο σχεδιασμό της επέμβασης που θα συνοδεύει την ολική θυρεοειδεκτομή σε περίπτωση καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος.

## 1.4 | Φυσιολογία του θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένος είναι υπεύθυνος για την παραγωγή τριών ορμονών του μεταβολισμού: τη θυροξίνη (T4) την τριωδοθυρονίνη (T3) και την καλσιτονίνη. Η βασική ανατομική μονάδα του θυρεοειδούς αδένος είναι το θυρεοειδές θυλάκιο, όπου αποτελεί και την θέση της σύνθεσης των ορμονών. Το θυλάκιο επενδύεται με μονόστοιβο κυβοειδές ενδοθήλιο το οποίο πληρείται με κολλοειδές και είναι πλούσιο σε θυροσφαιρίνη (TG). Εμβόλιμα αυτής της δομής, βρίσκονται τα παραθυλακικά κύτταρα ή κύτταρα C τα οποία παράγουν την καλσιτονίνη. Το πλέον βασικό χημικό στοιχείο για την σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών αποτελεί το ιώδιο το οποίο απορροφάται από τις διαιτητικές τροφές μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα. Η



αποθήκευση και ακολούθως η οξειδωση του ιωδίου και η δέσμευση του στη θυρεοσφαιρίνη λαμβάνει χώρα στα θυρεοειδικά θυλάκια και ρυθμίζεται από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH) που εκκρίνεται από την υπόφυση.

#### Σύνθεση και δράση των ορμονών του θυρεοειδούς αδένος

Όπως αναφέρθηκε το ιώδιο είναι το κύριο συστατικό των ορμονών που εκκρίνονται από το θυρεοειδή αδένος (T3 και T4). Η περιεκτικότητα σε ιώδιο του θυρεοειδούς αδένος είναι μέχρι και 30 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση του ιωδίου στο αίμα και συνεπώς η πρόσληψη του ιωδίου από την αιματική κυκλοφορία στον θυρεοειδή αδένος, απαιτεί την ενεργό μεταφορά της μέσω μιας αντλίας νατρίου καλίου (Na-K-ATPase). Ακολούθως το ιώδιο οξειδώνεται ενδοκυττάρια, μέσω της μυελοπεροξειδάσης (37,38).

Η θυρεοσφαιρίνη, αποτελεί μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη μεγέθους 666 kDa και περιέχει 115 μόρια τυροσίνης τα οποία αποτελούν και δυναμικές θέσεις ιωδίσωσης. Η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH) διεγείρει τη σύνθεση της θυρεοσφαιρίνης που λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου. Ακολουθεί η γλυκοζυλίωση της στη συσκευή του Golgi και η απέκκριση της στο κολλοειδές των θυλακίων. Η ποσότητα θυροξίνης που παράγεται εντός του θυρεοειδούς είναι πάντοτε μεγαλύτερη από της τριωδοθυρονίνης. Η θυροξίνη μετατρέπεται στους περιφερικούς ιστούς (όπως το ήπαρ και οι μύες) στην δραστικότερη μορφή της, στην τριωδοθυρονίνη με διαδικασία αποιωδίωσης.

Το σημαντικότερο βήμα είναι η σύζευξη της τριωδοθυρονίνης και της θυροξίνης με την θυρεοσφαιρίνη. Σε κάθε ερέθισμα της TSH, που παράγεται στην υπόφυση, η θυρεοσφαιρίνη διασπάται, απελευθερώνοντας τις δραστήριες ιωδιομένες μονάδες θυροξίνης και τριωδοθυρονίνης. Ο έλεγχος της απελευθέρωσης της TSH, υπόκειται στην εκλυτική της θυρεοτροπίνης ορμόνη (TRH) η οποία συντίθεται και κρίνεται στον υποθάλαμο. Τα επίπεδα θυροξίνης και τριωδοθυρονίνης ελέγχουν



μέσω αρνητικής επανατροφοδοτικής αναστολής την έκλυση της TSH και της TRH αντίστοιχα (37, 38).

Στην αιματική κυκλοφορία η τριωδοθυρονίνη και η θυροξίνη συνδέονται κυρίως με τρεις πρωτεΐνες μεταφοράς: την θυρεοδεσμευτική σφαιρίνη (TBG) την θυρεοδεσμευτική πρωλευκωματίνη (TBPA) και τη λευκωματίνη (ALB). Ένα πολύ μικρό κλάσμα (περίπου το 1%) των θυρεοειδικών ορμονών παραμένει ασύζευκτο και είναι υπεύθυνο για την βιολογική δραστηριότητα των ορμονών. Οι ελεύθερες αυτές θυρεοειδικές ορμόνες, αφού συνδεθούν στον υποδοχέα των κυττάρων στόχων, προκαλούν αύξηση της κατανάλωσης του οξυγόνου με συνοδό παραγωγή θερμότητας και έκλυση ελευθέρων ριζών που τελικώς οδηγούν στην αύξηση του βασικού μεταβολισμού των κυττάρων. Ειδικότερα όσον αφορά στο καρδιαγγειακό σύστημα, επιφέρουν ισχυρή θετική ινότροπο και χρονότροπο δράση στο μυοκάρδιο μέσω της αύξησης της παραγωγής της μυοσίνης αλλά και της αύξησης της εκφράσεις των Β αδρενεργικών υποδοχέων. Επιπλέον επάγουν την παραγωγή ερυθροποιητίνης, αυξάνουν τη λιπόλυση, αυξάνουν τη γλυκονεογένεση και τη γλυκογονόλυση αλλά και την απορρόφηση της γλυκόζης από τον εντερικό σωλήνα (37, 39).



## 1.5 | Καλοήθειες παθήσεις του θυρεοειδούς αδένα

### Υποθυρεοειδισμός

Για την σωστή ευθυρεοειδική λειτουργία ενός οργανισμού, απαιτείται η διατήρηση της λεπτής ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών και του κεντρικού ερεθίσματος που αυτές δέχονται για την παραγωγή τους. Το συχνότερο αίτιο του κλινικού υποθυρεοειδισμού είναι η ανεπαρκής παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών από τον θυρεοειδή αδένα (πρωτοπαθής υποθυρεοειδισμός). Εξαιρετικά σπάνια μπορεί να εμφανιστούν καταστάσεις





αντίστασης των περιφερικών ιστών στις θυρεοειδικές ορμόνες. Αν και παγκοσμίως ο υποθυρεοειδισμός οφείλεται συχνά στην έλλειψη ιωδίου εν τούτοις στο δυτικό κόσμο οι περισσότερες περιπτώσεις υποθυρεοειδισμού ενηλίκων προκαλούνται είτε από θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT), είτε μετά από θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο, είτε τέλος λόγω χειρουργικής εξαίρεσης του θυρεοειδούς αδένος (40,41).

Πολλοί ασθενείς, ιδιαίτερα στα πλαίσια αντιμετώπισης της νόσου του Graves αλλά και της τοξικής πολυοζώδους βρογχοκήλης, λαμβάνουν ραδιενεργό ιώδιο. Η λήψη με περισσότερα από 10mCi ραδιενεργού ιωδίου έχει συσχετιστεί με έως και 70% κίνδυνο εμφάνισης κλινικού υποθυρεοειδισμού. Επίσης ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία είτε για λέμφωμα είτε για καρκίνο κεφαλής και τραχήλου βρίσκονται σε αυξημένο ρίσκο για την εμφάνιση υποθυρεοειδισμού. Τέλος, μία σειρά φαρμακευτικών ουσιών έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση κλινικού υποθυρεοειδισμού όπως η αμιωδαρόνη αλλά και το λίθιο, καθώς επίσης και ιντερφερόνη Α και ιντερλευκίνη 2, όπου πλέον είναι γνωστό ότι μπορούν να διαταράξουν την ευθυρεοειδική λειτουργία σε πολλαπλά ενδοκρινικά επίπεδα (40, 42).

Για την εργαστηριακή διάγνωση του υποθυρεοειδισμού αρκεί η λήψη περιφερικού αίματος όπου και παρατηρείται πτώση των επιπέδων της θυροξίνης (T4) και της τριιωδοθυρονίνης (T3) με συνοδό αύξηση της TSH. Η θεραπεία εν γένει που προτείνεται είναι η ορμονική υποκατάσταση με λεβοθυροξίνη μία φορά ημερησίως.



### Θυρεοειδίτιδα

Με τον όρο θυρεοειδίτιδα εννοούμε κάθε φλεγμονή αυτοάνοσης ή μη αρχής του θυρεοειδούς αδένα. Έτσι λοιπόν η θυρεοειδίτιδα Hashimoto είναι μία θυρεοειδίτιδα ανοσολογικής αρχής που προκαλεί βλάβη στην βασική μεμβράνη των θυλακικών κυττάρων μέσω της καθίζησης ανοσοσυμπλεγμάτων. Η προκύπτουσα ίνωση και λεμφοκυτταρική διήθηση συνεπεία της φλεγμονής του θυρεοειδούς αδένα, οδηγεί σε διαταραχή της παραγωγής T3 και T4 αλλά και σε μειωμένη απόκριση του θυρεοειδούς αδένα στα ερεθίσματα της TSH (43).

Αντίστοιχα στην οξεία θυρεοειδίτιδα, η φλεγμονή συνήθως είναι συνέπεια μικροβιακών παραγόντων όπως των *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus sp.* Πρόκειται για μία σοβαρή πυογόνο λοίμωξη, οφειλόμενη συχνά σε λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού ή στα πλαίσια μιας συγγενούς διαμαρτίας όπως ένα συρίγγιο (44).

Η αιτιολογία της υποξείας θυρεοειδίτιδας, η οποία προσβάλλει κατά κανόνα γυναίκες, δεν έχει επαρκώς διευκρινιστεί, αν και θεωρείται ότι έχει αυτοάνοση ή μεταλοιμώδη (από ιογενή λοίμωξη) προέλευση. Πρόκειται για μία επώδυνη κατάσταση η οποία συνοδεύεται από εμπύρετο. Επίσης συνυπάρχει λεμφοκυτταρική διήθηση των θυλακικών κυττάρων του θυρεοειδούς αδένα. Η θεραπεία εν γένει περιλαμβάνει τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (45).

Τέλος, μία χρονιά φλεγμονώδης διεργασία του θυρεοειδούς αδένα, μπορεί να καταλήξει σε αυτό που είναι γνωστό σαν θυρεοειδίτιδα του Riedel, η οποία και κατά κανόνα προσβάλλει ολόκληρο τον θυρεοειδή αδένα. Η φλεγμονή αυτή έχει τάση τοπικής επέκτασης και συχνά δίδει συμπτώματα απόφραξης του ανώτερου αεραγωγού. Η θεραπεία εν γένει περιλαμβάνει την θυρεοειδική ορμονική υποκατάσταση αλλά και τα κορτικοστεροειδή. Η χειρουργική επέμβαση ενδείκνυται για την ανακούφιση των συμπτωμάτων δυσφορίας που συχνά αναφέρουν αυτοί οι ασθενείς.



### Υπερθυρεοειδισμός

Με τον όρο υπερθυρεοειδισμός αναφερόμαστε στην υπερλειτουργία του θυρεοειδούς αδένου η οποία αφορά στην αυξημένη παραγωγή και αυξημένη απελευθέρωση στην αιματική κυκλοφορία των θυρεοειδικών ορμονών T3 και T4. Η επίπτωση του υπερθυρεοειδισμού στις γυναίκες αναφέρεται έως 2%, με την επίπτωση του είναι κατά 10 φορές μικρότερη στους άνδρες. Ο υπερθυρεοειδισμός εμφανίζεται στα πλαίσια της νόσου του Graves, στην τοξική οζώδη βρογχοκήλη (με την παρουσία είτε μονήρους τοξικού όζου, είτε πολλαπλών όζων – Plummer's disease) ή τέλος συνεπεία της λήψης αμιωδαρόνης (46,47).

Οι ασθενείς με θυρεοτοξίκωση συχνά παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων και σημείων, τα οποία χωρίς θεραπεία μπορεί να οδηγήσουν σε καρδιακές αρρυθμίες, καρδιακή ανεπάρκεια, θυρεοτοξική κρίση αλλά ακόμη μπορούν και να επιφέρουν το θάνατο.

Εργαστηριακά στη θυρεοτοξίκωση παρατηρείται μείωση των επιπέδων της TSH και αύξηση των επιπέδων της T3 και T4, ενώ στην υποκλινική εικόνα του υπερθυρεοειδισμού τα επίπεδα της TSH είναι πάλι μειωμένα όμως τα επίπεδα της T3 και T4 μπορεί να είναι εντός των φυσιολογικών ορίων. Στον πίνακα 1 συνοψίζονται τα συμπτώματα και τα κλινικά σημεία του υπερθυρεοειδισμού (46,48).



<u>Συμπτώματα</u>	<u>Κλινικά σημεία</u>
Αίσθημα παλμών	Τρόμος
Κόπωση	Εξόφθαλμος
Απώλεια βάρους	Εφίδρωση
Τριχόπτωση	Προκνημιαίο οίδημα
Διαρροϊκές κενώσεις	Περικογχικό οίδημα
Αυπνία	Ταχυκαρδία
Διαταραχή εμμήνου ρύσεως	Βρογχοκήλη

Πίνακας 1. Συμπτώματα και κλινικά σημεία στον υπερθυρεοειδισμό

Η νόσος του Graves αποτελεί την συχνότερη αιτία υπερθυρεοειδισμού στο δυτικό κόσμο και πρόκειται για μία αυτοάνοσης αρχής διαταραχή που προκαλείται από το αντίσωμα έναντι του υποδοχέα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TRAb). Αυτό έχει σαν συνέπεια τη συνεχή διέγερση του υποδοχέα της TSH με αποτέλεσμα την υπερβολική παραγωγή και έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών από τον θυρεοειδή αδέν. Η υπερλειτουργία του θυρεοειδούς αδένου οδηγεί συχνά και στην συμμετρική διόγκωση του (48).

Στη φαρμακευτική θεραπεία της νόσου του Graves σημαντική θέση έχουν τα αντιθυρεοειδικά φάρμακα όπως η προπυλθειουρακίλη (PTU) χορηγούμενη τρεις φορές ημερησίως και η μεθιμαζόλη χορηγούμενη εφάπαξ ημερησίως. Συχνά επιτυγχάνεται μείωση της σύνθεσης των θυρεοειδικών ορμονών και τελικά έλεγχος του υπερθυρεοειδισμού στο 90% των ασθενών μέσα σε λίγες εβδομάδες. Επίσης αρκετά διαδεδομένη είναι και η χρήση του ραδιενεργού ιωδίου με εξίσου καλά αποτελέσματα. Η χειρουργική θεραπεία συνίσταται στην ολική θυρεοειδεκτομή και την εφ'όρου ζωής ορμονική υποκατάσταση.



Στην περίπτωση του μονήρους τοξικού αδενώματος του θυρεοειδούς, ο υπερθυρεοειδισμός προκύπτει από την αυτόνομη λειτουργία του θυρεοειδικού όζου ο οποίος συχνά έχει διάμετρο άνω των τριών εκατοστών. Τα αντιθυρεοειδικά φάρμακα συχνά οδηγούν σε μερικό έλεγχο του υπερθυρεοειδισμού με συχνές υποτροπές και έχουν θέση κυρίως στον προεγχειρητικό έλεγχο της θυρεοειδικής λειτουργίας. Επίσης, το ραδιενεργό ιώδιο μπορεί να επιτύχει σημαντική μείωση των διαστάσεων του όζου και σπανίως όμως την εξαφάνιση του και τελικά έλεγχο του υπερθυρεοειδισμού. Τα μειονεκτήματα του ραδιενεργού ιωδίου αφορούν στην υποτροπή της νόσου ή την εγκατάσταση υποθυρεοειδισμού ενώ αντενδείκνυται η χορήγησή του κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Η χειρουργική θεραπεία και πρακτική συνίσταται στην λοβεκτομή του θυρεοειδούς αδένα, μία πρακτική συνήθη στη Βόρειο Αμερική ή στην ολική θυρεοειδεκτομή, μία πρακτική συνήθη στην Ευρώπη.

Η τοξική πολυοζώδης βρογχοκήλη (Plummers disease) περιγράφηκε το 1913 από τον H S Plummer. Η πρόοδος της νόσου είναι μακρά και διέρχεται από μία περίοδο υποκλινικού υπερθυρεοειδισμού προτού εμφανιστούν τα κυρίαρχα συμπτώματα του υπερθυρεοειδισμού όπως η ταχυκαρδία, η καρδιακή ανεπάρκεια και η κολπική μαρμαρυγή. Στην τοξική πολυοζώδη βρογχοκήλη παρατηρούνται επίσης, αναλόγως του μεγέθους της ακόμη και πιεστικά φαινόμενα στην τραχεία, στον οισοφάγο η και στην σφαγίτιδα φλέβα (σημείο Pemberton) (49). Για τους λόγους που αναφέρθηκαν και στο τοξικό αδένωμα του θυρεοειδούς, τα αντιθυρεοειδικά φάρμακα και η χρήση του ραδιενεργού ιωδίου έχουν θέση κυρίως για τον μερικό έλεγχο της νόσου ενώ η οριστική θεραπεία είναι η ολική θυρεοειδεκτομή και η εφ'όρου ζωής ορμονική υποκατάσταση.

Στη θυρεοτοξίκωση επαγόμενη από αμιωδαρόνη (Amiodarone-Associated Thyrotoxicosis - AAT), ο μηχανισμός του υπερθυρεοειδισμού οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων του ιωδίου από την περιεκτικότητα του ίδιου του φαρμάκου σε ιώδιο. Η αμιωδαρόνη ως γνωστόν, χορηγείται σε ασθενείς με ήδη επιβαρυσμένη καρδιακή



λειτουργία οι οποίοι συχνά δεν δύνανται να αντιροπήσουν εύκολα τα συμπτώματα που συνοδεύουν τον υπερθυρεοειδισμό. Η ΑΑΤ διακρίνεται σε δύο τύπους. Στον τύπο 1 η θυρεοτοξίκωση από αμιωδαρόνη αναπτύσσεται σε ασθενείς με προϋπάρχουσα οζώδη βρογχοκήλη, στους οποίους υπάρχει αυξημένη παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών κυρίως λόγω της περίσσεια ιωδίου. Στον τύπο 2, ο οποίος είναι και ο συχνότερος, υπάρχει μία χημειοεπαγόμενη θυρεοειδίτιδα η οποία τελικά οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή και απελευθέρωση των ορμονών (46,47,50). Η θεραπεία με αντιθυρεοειδικά φάρμακα παρέχει πτωχά αποτελέσματα, ενώ η χρήση του ραδιενεργού ιωδίου ιδιαίτερα στον τύπο 2 δεν παρέχει επαρκή κλινικό έλεγχο του υπερθυρεοειδισμού. Η θεραπεία συνίσταται στην ολική θυρεοειδεκτομή και την εφ'όρου ζωής ορμονική υποκατάσταση.



## 1.6 | Καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος αν και αντιπροσωπεύει περίπου το 4% όλων των κακοηθειών στις Ηνωμένες Πολιτείες, εν τούτοις είναι η νεοπλασία με το μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης των περιστατικών τα τελευταία χρόνια. Περίπου τα τρία



τέταρτα των ασθενών που νοσούν από καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα είναι γυναίκες, κατατάσσοντας έτσι τον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα, ως την πέμπτη πιο συχνή κακοήθεια στις γυναίκες. Υπολογίζεται ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά την περίοδο 1973 με 2003, η συχνότητα εμφάνισης του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς αδένα αυξήθηκε κατά 189%. Με τον όρο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα εννοούμε μία ετερογενή, ως προς την προέλευση του νεοπλασματικού κυττάρου οικογένεια. Έτσι λοιπόν διακρίνουμε στο διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα το θηλώδες καρκίνωμα (PTC), το θυλακιώδες καρκίνωμα (FTC) και το καρκίνωμα από κύτταρα Hürthle. Η υποκατηγορία αυτή του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα αποτελεί έως και το 93% των περιπτώσεων των νεοπλασιών του θυρεοειδούς αδένα. Στη συνέχεια διακρίνουμε το μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένα (MTC), που αντιπροσωπεύει περίπου το 6% των καρκίνων του θυρεοειδούς. Περίπου το ένα τέταρτο το μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα εμφανίζεται στα πλαίσια των συνδρόμων της πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας MEN2A και MEN2B. Το υπόλοιπο 1% αφορά στο αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένα, μία από τις πλέον θανατηφόρες μορφές (49, 50, 51).

Η γενετική βάση της καρκινογένεσης στον θυρεοειδή αδένα περιλαμβάνει αδρά δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά σε μεταλλάξεις ογκογονιδίων οι οποίες επιφέρουν διαταραχή στην παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών του κυττάρου και εν τέλει οδηγούν σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει μεταλλάξεις (loss of function) των ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αν και οι περισσότερες γενετικές μεταλλάξεις θεωρούνται επίκτητες, εν τούτοις ένα ποσοστό 5-10% του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς πιστεύεται ότι έχει οικογενή προέλευση (40,52).

Συχνά, στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα υπάρχει ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK και PI3K/AKT. Μεταλλάξεις στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες





RET και NTRK1 έχουν ως αποτέλεσμα χιμαιρικά προϊόντα γνωστά ως RET/PTC και TRK, αντίστοιχα και εμφανίζονται περίπου στο 40% των σποραδικών PTC. Επιπλέον, το πρωτο-ογκογονίδιο RET σχετίζεται με υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων σε ασθενείς με MEN2A και η γενετική ανεύρεση αυτής της μετάλλαξης επιτρέπει την ασφαλή διάγνωση σε παιδιά πριν από την κλινική εμφάνιση του MTC (53). Η μετάλλαξη BRAF V600E είναι η πιο συχνά ευρισκόμενη μετάλλαξη στην κακοήθεια του θυρεοειδούς αδένος. Είναι παρούσα στο 40% έως 50% των PTC.

Τέλος, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια εμπλέκονται ευθέως στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος. Μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, που σχετίζεται με την έκθεση σε ακτινοβολία, εντοπίζεται συχνότερα σε πιο επιθετικές μορφές του PTC και FTC (54, 55).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πιο συχνή μορφή καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος, είναι το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένος. Πρόκειται για ένα καρκίνωμα με εξαιρετικά καλή πρόγνωση. Σε νεκροτομικά παρασκευάσματα, η παρουσία θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς αδένος με διαστάσεις κάτω του ενός εκατοστού, αναφέρεται σε ποσοστό έως και 30%. Σημαντικοί παράγοντες κινδύνου αποτελούν η έκθεση σε ακτινοβολία στην παιδική ηλικία αλλά και το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του θυρεοειδούς. Επίσης ανευρίσκεται στα πλαίσια συνδρομών όπως το σύνδρομο Werner, το σύνδρομο Cowden και η οικογενής πολυποδίαση (55). Εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες με περίπου διπλάσια αναλογία με τους άνδρες και συχνότερα στην ηλικιακή ομάδα 30 έως 50 ετών.

Το θυλακιδώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένος αποτελεί περίπου το 10% όλων των κακοήθων του θυρεοειδούς. Η μέγιστη συχνότητα εμφάνισης βρίσκεται στις ηλικίες μεταξύ 40 και 60 ετών, με μία αναλογία περίπου τριπλάσια στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. Σε αντίθεση με το θηλώδες καρκίνωμα, το



θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένος δεν φαίνεται να σχετίζεται με την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία (56).

Το μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς (MTC) αντιστοιχεί σε χαμηλότερο ποσοστό που κυμαίνεται από 4 έως 10% των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Η προέλευση του είναι από τα παραθυλακικά κύτταρα ή κύτταρα C τα οποία προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία. Σε ποσοστό 80% εμφανίζεται στη σποραδική του μορφή και λιγότερο συχνά στα πλαίσια των οικογενειών συνδρομών πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας MEN2A και MEN2B (57).

Το αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένος (ATC) αποτελεί περίπου το 1% των καρκινωμάτων και αποτελεί την πιο επιθετική μορφή καρκινώματος του θυρεοειδούς αδένος με την θνησιμότητα του να πλησιάζει το 100%. Συνήθως αφορά σε ηλικιωμένους ασθενείς με προϋπάρχουσα βρογχοκήλη και μπορεί, σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα να προκαλέσει δυσφαγία αλλά και απόφραξη των αεροφόρων οδών εξαιτίας της ταχείας ανάπτυξης του. Η χειρουργική επέμβαση του αναπλαστικού καρκινώματος του θυρεοειδούς έχει θέση μόνο στα πλαίσια παρηγορητικής θεραπείας και για την αποφυγή απόφραξης των αεραγωγών.

Τέλος το πρωτοπαθές λέμφωμα του θυρεοειδούς αδένος, αν και είναι σπάνιο, τα τελευταία έτη διαγιγνώσκεται συχνότερα. Συνήθως αφορά στην ταχεία αύξηση των διαστάσεων μιας προϋπάρχουσας βρογχοκήλης με συνοδό βράγχος φωνής, δυσφαγία και εμπύρετο. Το πρωτοπαθές θυρεοειδικό λέμφωμα απαντάται τέσσερις φορές συχνότερα στις γυναίκες από ότι στους άντρες και στο 50% των περιπτώσεων αναπτύσσεται σε έδαφος θυρεοειδίτιδας Hashimoto (57).

Στον πίνακα 2 φαίνεται η σταδιοποίηση του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος



<b>Πρωτοπαθής όγκος (T)</b>			
TX	Δεν δύναται να εκτιμηθεί		
T0	Απουσία πρωτοπαθούς όγκου		
T1a	≤1 cm, ενδοθυρεοειδικά		
T1b	1-2 cm, ενδοθυρεοειδικά		
T2	2-4 cm, ενδοθυρεοειδικά		
T3	>4 cm περιοριζόμενο στον θυρεοειδή αδένα ή οποιοδήποτε μέγεθος με ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση (μύες, λιπώδης ιστός)		
T4a	Διήθηση υποδόριου ιστού, λάρυγγα, τραχείας, οισοφάγου ή παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου (RLN)		
T4b	Διήθηση προσπονδυλικής περιτονίας ή περιβρογχισμός καρωτίδας αρτηρίας ή μεσοθωρακικών αγγείων		
<b>Επιχώριοι λεμφαδένες (N)</b>			
NX	Δεν δύναται να εκτιμηθούν		
N0	Αρνητικοί για διήθηση λεμφαδένες		
N1a	Θετικοί για διήθηση λεμφαδένες διαμερίσματος VI		
N1b	Θετικοί πέραν του διαμερίσματος VI		
<b>Άπω μεταστάσεις (M)</b>			
M0	Απουσία		
M1	Παρουσία		
<b>Στάδιο για τον διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα</b>			
<b>&lt;45 ετών</b>			
Stage I	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M0



Stage II	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1
<i>≥45 ετών</i>			
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
Stage IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0
Stage IVB	T4b	Οποιοδήποτε N	M0
Stage IVC	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος (NCCN Guidelines,2019)





## 2.1 | Δομή του ιού Parvovirus B19

Ο ιός Parvovirus B19, έχει μία συναρπαστική ιστορία καθώς ανακαλύφθηκε με έναν εντελώς τυχαίο τρόπο το 1974. Είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας Parvoviridae που έως σήμερα είναι αποδεδειγμένο ότι αποτελεί ένα παθογόνο του ανθρώπου.



Αν και έχει ταυτοποιηθεί ο τροπισμός του ιού για τα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα, εντούτοις το κλινικό φάσμα των εκδηλώσεων μετά από μία λοίμωξη του Parvovirus B19, ποικίλει και περιλαμβάνει τόσο το λοιμώδες ερύθημα, την αρθρίτιδα αλλά και την παροδική απλαστική κρίση. Ιδιαίτερα στους ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς μπορεί να εμφανιστεί απλασία της ερυθράς κυτταρικής σειράς και χρόνια αναιμία (58). Επίσης, λοίμωξη κατά την κύηση μπορεί να οδηγήσει σε εμβρυϊκό ύδρωπα, σε ανάπτυξη συγγενούς αναιμίας λόγω βλάβης της ερυθράς κυτταρικής σειράς αλλά και σε εμβρυϊκό θάνατο.

Η ιστορία ανακάλυψης του Παρβοϊού B19 ξεκινάει το 1974 στην Αυστραλία όταν η Υβόννη Κοσάρ (Yvonne Cossart) και οι συνεργάτες της δημοσίευσαν στο περιοδικό Lancet, τον εντοπισμό ενός αντιγόνου έναντι του Παρβοϊού (Parvovirus like antigen) στον ορό 9 υγιών αιμοδοτών και δύο ασθενών (58). Αυτό έγινε όταν κατά τη διάρκεια ελέγχου ρουτίνας του αίματος αιμοδοτών, για την πιθανή ανεύρεση του επιφανειακού αντιγόνου του ιού της ηπατίτιδας Β, το δείγμα στην σειρά 19 της στήλης Β του πίνακα των δειγμάτων, απέδωσε κάποια μη αναμενόμενα αποτελέσματα. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε την παρουσία σωματιδίων διαμέτρου 23nm που μοιάζουν με τους παρβοϊούς των ζώων. Πέντε χρόνια αργότερα, στην Ιαπωνία περιγράφηκε ένα παρόμοιο φαινόμενο και ονομάστηκε σαν «ιός Nakatani». Λίγο αργότερα αποδείχθη ότι πρόκειται για ακριβώς τον ίδιο ιό και το 1985 η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών τον αναγνώρισε επίσημα ως μέλος της οικογένειας Parvoviridae και πήρε το όνομα B19. Το 1983 ο ιός συνδέθηκε για πρώτη φορά με το λοιμώδες ερύθημα στα παιδιά (58,59,60).

Η οικογένεια Parvoviridae λαμβάνει το όνομά της από τη λατινική λέξη "parvum", που σημαίνει μικρό. Το γένος ξεχωρίζει λόγω της ικανότητας να αναπαράγεται αυτόνομα σε αντίθεση με το γένος Dependovirus όπου απαιτείται η παρουσία ενός βοηθητικού ιού για συνεπιμόλυνση αλλά και το γένος Erythrovirus που κατά αποκλειστικότητα μολύνει κύτταρα της ερυθράς σειράς.



Το ιοσωμάτιο (virion) του Parvovirus B19, αποτελείται από δύο πρωτεΐνες και ένα γραμμικό, μονόκλωνο μόριο DNA. Παρουσιάζει συμμετρία εικοσάεδρου και η απουσία λιπιδικού φακέλλου αλλά και το εξαιρετικά μικρό μέγεθός του, τον καθιστούν πολύ ανθεκτικό στη φύση και συνεπώς την αδρανοποίησή του. Ο ιός παραμένει σταθερός στους 56 ° C για 60 λεπτά (60,61).

Το μονόκλωνο γονιδίωμα αποτελείται συνολικά από 5.596 νουκλεοτίδια, που κωδικοποιούν την μοναδική μη δομική πρωτεΐνη (NS1) αλλά και τις δύο πρωτεΐνες καψιδίου (VP1 και VP2). Έχει παρατηρηθεί πως το γονίδιο της NS1 είναι καλά συντηρημένο, ενώ οι περιοχές VP1 και VP2 δύνανται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα, η οποία αναφέρεται από 2 έως 3% (59,61).

Το καψίδιο του Παρβοϊού B19 συντελείται από δύο πρωτεΐνες του καψιδίου, οι VP1 και VP2 και κάθε καψίδιο συνίσταται σε μια εικοσαεδρική δομή με συνολικά 60 καψομερή με την VP2 να είναι η κυρίαρχη δομική πρωτεΐνη αντιπροσωπεύοντας περίπου το 96% της ολικής πρωτεΐνης του καψιδίου. Η πρωτεΐνη VP2 έχει μοριακή μάζα 58 kDa ενώ η πρωτεΐνη VP1 έχει μοριακή μάζα 84 kDa και αποτελεί το υπόλοιπο 4% της ολικής πρωτεΐνης του καψιδίου (58).

Η λειτουργία της μη δομικής πρωτεΐνης NS1 (με μοριακή μάζα 77 kDa) δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη αν και πιστεύεται ότι διαθέτει έντονη κυτταροτοξική δράση. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η NS1 ασκεί την κυτταροτοξική της δράση μέσω της ενεργοποίησης μονοπατιών που περιλαμβάνουν την Κασπάση 3 και οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση (58).





## 2.2 | Επιδημιολογία και λοιμώξεις του ιού Parvovirus B19

Σήμερα είναι γνωστό πως ο Παρβοϊός B19 αποτελεί ένα κοινό παθογόνο του ανθρώπου. Μελέτες έχουν δείξει τον επιπολασμό των αντισωμάτων IgG έναντι του Παρβοϊού B19 σε ποσοστό έως και 60% σε ενήλικες και έως 85% σε γηριατρικούς ασθενείς. Ωστόσο η παρουσία αντισωμάτων σε έναν ασθενή έναντι του Παρβοϊού B19 δεν συνεπάγεται απαραίτητα και την ιαιμία, δηλαδή την παρουσία ιικού DNA στον ορό των ασθενών αυτών (50). Ακριβώς επειδή ο Παρβοϊός B19 έχει τροπισμό ως προς τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθροειδούς σειράς κανείς θα



ανέμενε την ανεύρεση του με σχετικά υψηλή συχνότητα. Εντούτοις, τα αποτελέσματα από περιορισμένες μελέτες εντοπισμού του Παρβοϊού B19 στο μυελό των οστών υγιών δοτών αναφέρεται σε ποσοστό 9% σε μία μελέτη ενώ μία δεύτερη μελέτη δεν ανίχνευσε καθόλου DNA του Παρβοϊού B19 στο μυελό των οστών υγιών δοτών.

Λαμβάνοντας υπόψιν την εποχικότητα του λοιμώδους ερυθήματος στα παιδιά, μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα για την εποχική διακύμανση που εμφανίζεται στις λοιμώξεις από τον Παρβοϊό B19 και η οποία συμβαίνει συχνότερα κατά τους μήνες προς το τέλος του χειμώνα και νωρίς την άνοιξη.

Η κύρια οδός μετάδοσης του Παρβοϊού B19 είναι μέσω της αναπνευστικής οδού καθώς και η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο αλλά και η μετάδοση μέσω μετάγγισης προϊόντων αίματος.

Ο κύκλος της λοίμωξης από τον Παρβοϊό B19 είναι ένας τυπικός κύκλος που περιλαμβάνει κατά πρώτον τη σύνδεση με τον κυτταρικό υποδοχέα του κυττάρου στόχου και ακολούθως την ενδοκύττωση. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, η μεταγραφή του DNA σε RNA και η μετάφραση του RNA με την παραγωγή πρωτεϊνών. Τέλος έχουμε τη σύνθεση των νέων ισωματίων του Παρβοϊού B19 τα οποία απελευθερώνονται μέσω της λύσης του κυττάρου ξενιστή (61).

Στους υγιείς ανθρώπους, το πιθανότερο είναι μία λοίμωξη από τον Παρβοϊό B19, να διάγει μία υποκλινική φάση με μη ειδικά συμπτώματα τα οποία προσομοιάζουν τα συμπτώματα της κοινής γρίπης. Μία καλώς αναγνωρισμένη νόσος, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί το λοιμώδες ερυθήμα στα παιδιά το οποίο εμφανίζει το χαρακτηριστικό ερυθήμα των παρειών με πυρετό και συνοδό κεφαλαλγία και ναυτία. Στο δεύτερο στάδιο της νόσου το ερυθήμα δύναται να επεκταθεί στον κορμό και στα άκρα. Το ερυθήμα αυτό, επηρεάζεται από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και συνοδεύεται συχνά από κνησμό ενώ μπορεί να



καταλήξει σε αποφολιδωτική δερματίτιδα. Περίπου ένα στα δέκα παιδιά θα εμφανίσει συνοδό αρθραλγία. Η αρθραλγία συχνά περιλαμβάνει τις μετακαρποφαλαγγικές αρθρώσεις σε ποσοστό 75% ενώ περίπου στους μισούς ασθενείς θα προσβληθούν και οι κατά γόναυ αρθρώσεις.

Επίσης, είναι γνωστό ότι ο Παρβοϊός B19 μέσω της κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα στο έμβρυο μπορεί να προκαλέσει εμβρυϊκό ύδρωπα, ακόμη και τον εμβρυϊκό θάνατο. Διάφορες μελέτες έχουν συνδέσει τη λοίμωξη του Παρβοϊού B19 με θρομβοπενία και απλαστική αναιμία αλλά και με μυοκαρδίτιδα (61,62,63,64).



## 2.3 | Από τη λοίμωξη στην καρκινογένεση του θυρεοειδούς αδένου

Η πρώτη αναφορά που συσχετίζει τη μόλυνση με τον Παρβοϊό B19 και το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένου PTC δημοσιεύθηκε το 2008 (61). Οι συγγραφείς ανέφεραν την παρουσία ιικών ακολουθιών του Παρβοϊού B19 στα ιστοπαθολογικά δείγματα παραφίνης PTC του θυρεοειδούς, καθώς και την παρουσία της πρωτεΐνης του καψιδίου σε αυτά. Επιπλέον δεδομένα ήταν διαθέσιμα το 2011 όταν αναφέρθηκε επιμόλυνση από Παρβοϊό B19 τόσο σε δείγματα από αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς (ATC) όσο και σε δείγματα με θυρεοειδίτιδα του Hashimoto (HT) στα ιστοπαθολογικά παρασκευάσματα θυρεοειδεκτομών (62). Η



ίδια ομάδα το 2014, ανέφερε για πρώτη φορά, την παρουσία DNA, mRNA και πρωτεϊνών του καψιδίου του Παρβοϊού B19, όχι μόνο στα καρκινικά κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα αλλά και στα φυσιολογικά κύτταρα του θυρεοειδούς ιστού χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά (63). Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη, η ανίχνευση του Παρβοϊού B19 μέσω ανοσοϊστοχημείας (IHC) βρέθηκε να μην είναι στατιστικά σημαντικώς διαφορετική μεταξύ δειγμάτων του θυρεοειδούς ιστού ασθενών με νόσο του Grave's και μεταξύ δειγμάτων θυρεοειδούς ιστού ασθενών με πολυοζώδη βρογχοκήλη (64).

Αν και ένας σημαντικά αναδυόμενος αριθμός μελετών κατά την τελευταία δεκαετία υποδηλώνει ένα πιθανό ρόλο της παρουσίας του Παρβοϊού B19 στη νόσο και στη καρκινογένεση του θυρεοειδούς αδένα, εντούτοις υπάρχουν αντικρουόμενες ενδείξεις σχετικά με την παρουσία του Παρβοϊού B19 στα καρκινικά και στα φυσιολογικά κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα. Ο περιορισμός αυτός στη βιβλιογραφία αποτέλεσε και το έναυσμα για την διερεύνηση της παρουσίας του Παρβοϊού B19 σε δείγματα θυρεοειδούς ιστού σε έναν πληθυσμό ασθενών μετά από ολική θυρεοειδεκτομή, με χειρουργική ένδειξη τόσο την κακοήθη όσο και την καλοήθη νόσο.





### 3.1 | Επιλογή, ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά ασθενών

Στην παρούσα μελέτη, 41 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ολική θυρεοειδεκτομή στο Χειρουργικό Ογκολογικό τμήμα του «Αντικαρκινικού Ογκολογικού Νοσοκομείου ο Άγιος Σάββας» στην Αθήνα, σε μια περίοδο 3 ετών (2016-2019), συμφώνησαν εγγράφως να συμμετάσχουν. Δείγματα θυρεοειδικού ιστού ελήφθησαν άμεσα μετεγχειρητικά, μετά την ολική θυρεοειδεκτομή και τη μέτρηση του βάρους του θυρεοειδούς αδένα. Μετά από στενή επιθεώρηση των χειρουργικών παρασκευασμάτων, ελήφθη ένα δείγμα του παθολογικού ιστού του θυρεοειδούς αδένα και του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού του θυρεοειδούς



αδένα από κάθε ασθενή και αποθηκεύτηκαν αμφότερα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , δημιουργώντας ένα σύνολο 82 δειγμάτων θυρεοειδικών ιστών. Όλα τα δείγματα παθολογικού θυρεοειδικού ιστού επανεξετάστηκαν από παθολόγους για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση. Τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη ήταν: ύποπτη κυτταρολογία μετά αναρρόφηση με λεπτή βελόνα (FNA) και η χαρτογράφηση υπερήχων του θυρεοειδούς αδένα και του τραχήλου εκάστου ασθενούς. Τα κριτήρια αποκλεισμού στην παρούσα μελέτη ήταν: η θεραπεία με ανοσοκαταστολή και γλυκοκορτικοειδή κατά τους τελευταίους τρεις μήνες πριν από τη χειρουργική επέμβαση. Όλοι οι ασθενείς ήσαν ευθυρεοειδικοί κατά το χρόνο της χειρουργικής επέμβασης.

Δεκατρείς άνδρες (31,7%) και 28 (68,3%) γυναίκες με μέση ηλικία  $52,6 \pm 12,5$  έτη πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη. Όσον αφορά τις διαφορές κατά φύλο, η μέση ηλικία των ανδρών ήταν  $50,7 \pm 12,4$  έτη, ενώ η μέση ηλικία των γυναικών ήταν  $53,5 \pm 12,7$  έτη.

Είκοσι έξι από τους 41 ασθενείς (63,4%) εισήχθησαν στο χειρουργείο με προεγχειρητική διάγνωση πολυοζώδους βρογχοκήλης και 11 ασθενείς (26,9%) με προεγχειρητική διάγνωση θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα μετά από αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (FNA). Τέσσερις ασθενείς (9,7%) παρουσίασαν κυτταρική ατυπία στην προεγχειρητική έκθεση κυτταρολογίας FNA.

Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του «Αντικαρκινικού Ογκολογικού Νοσοκομείου ο Άγιος Σάββας» και ελήφθη έγγραφη συναίνεση μετά από ενημέρωση, από όλους τους ασθενείς που εντάχθηκαν σε αυτή τη μελέτη.





## 3.2 | Συλλογή και επεξεργασία των ιστοικών παρασκευασμάτων

### Απομόνωση νουκλεϊνικού οξέος

Τα δείγματα του θυρεοειδούς ιστού (παθολογικός ιστός και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός για κάθε ασθενή) ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση διαλύματος κυτταρικής λύσης και επώασθηκαν σε θερμοκρασία 60 °C για διάστημα 48 ωρών, με παράλληλη προσθήκη πρωτεϊνάσης K ανά δώδεκα ώρες σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Η εκχύλιση DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας



φαινόλη-χλωροφόρμιο με προσθήκη 5M NaCl και απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί η επανάκτηση του DNA με φυγοκέντρηση σε 13.000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Εν συνεχεία λαμβάνει χώρα η έκπλυση με ψυχρή αιθανόλη 70% και η επαναδιάλυση των δειγμάτων σε 50ml αποσταγμένου ύδατος. Τα δείγματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20°C.

Αντίστοιχα για την εκχύλιση του RNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY) με τη χρήση χλωροφορμίου και ισοπροπανόλη και επαναδιάλυση των δειγμάτων σε 100μl diethyl pyrocarbonat treated H<sub>2</sub>O.

Η ποιότητα του νουκλεϊκού οξέος επιβεβαιώθηκε από τον ρυθμό απορρόφησής του στα 260/280 nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο ND1000D (NanoDrop, Wilmington, DE).



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Ο προσδιορισμός της παρουσίας Παρβοϊού B19 επιτεύχθηκε με Real-Time PCR χρησιμοποιώντας το Parvovirus B19 Real-TM Quant kit (Sacace Biotechnologies Srl, Ιταλία) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (65). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε το ακόλουθο προφίλ θερμικής ανακύκλωσης:

1 κύκλος στους 95 ° C για 15 λεπτά

5 κύκλοι στους 95 ° C για 5 δευτερόλεπτα

5 κύκλοι στους 60 ° C για 20 δευτερόλεπτα

5 κύκλοι στους 72 ° C για 15 δευτερόλεπτα

και 40 κύκλοι στους 95 ° C για 5 δευτερόλεπτα

40 κύκλοι στους 60 ° C για 30 δευτερόλεπτα

40 κύκλοι στους 72 ° C για 15 δευτερόλεπτα

Η επικύρωση της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης αντίστοιχα, έγινε με τη χρήση του ρυθμιστικού εσωτερικού ελέγχου (Internal Control) και αρνητικού ελέγχου (Negative Control) που παρέιχε η κατασκευάστρια εταιρεία.



### 3.3 | Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο στατιστικών αναλύσεων IBM SPSS Version 24.0 (Statistic Package for social Sciences for Windows 24 Inc., Chicago, II, USA).



Όλες οι κατηγορικές μεταβλητές κατεγράφησαν ως απόλυτος αριθμός μετρήσεων αλλά και ως ποσοστό. Όλες οι αριθμητικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως διάμεσος (ελάχιστο, μέγιστο, Inter-quartile range [IQR]. Η πολυπαραγοντική ανάλυση μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το τεστ Pearson's chi-square test και Fisher's exact test, όπως αναφέρονται στους πίνακες. Η στατιστική ανάλυση σε περιπτώσεις αριθμητικών μεταβλητών (univariate) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις δοκιμασίες Mann-Whitney ή Kruskal-Wallis. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε  $\alpha = 0,05$ .





#### 4.1 Παρουσία του Parvovirus B19 στα ιστικά δείγματα

Διερευνήσαμε την παρουσία Παρβοϊού B19 τόσο στον παθολογικό θυρεοειδικό ιστό όσο και στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό σε 41 ασθενείς. Στον Πίνακα 3, παρουσιάζονται τα δημογραφικά δεδομένα σε σχέση με την παρουσία του Παρβοϊού B19.

Ο Παρβοϊός B19 ανιχνεύθηκε σε δείγματα θυρεοειδικού ιστού, σε 21 (51,2%) ασθενείς ενώ δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευσή του σε δείγματα θυρεοειδικού ιστού σε 20 (48,8%) ασθενείς. Επιπλέον, υποδιαιρέσαμε την ομάδα παρουσίας Παρβοϊού B19 σε τρεις υποομάδες, ανάλογα με την παρουσία του Παρβοϊού B19 είτε στον



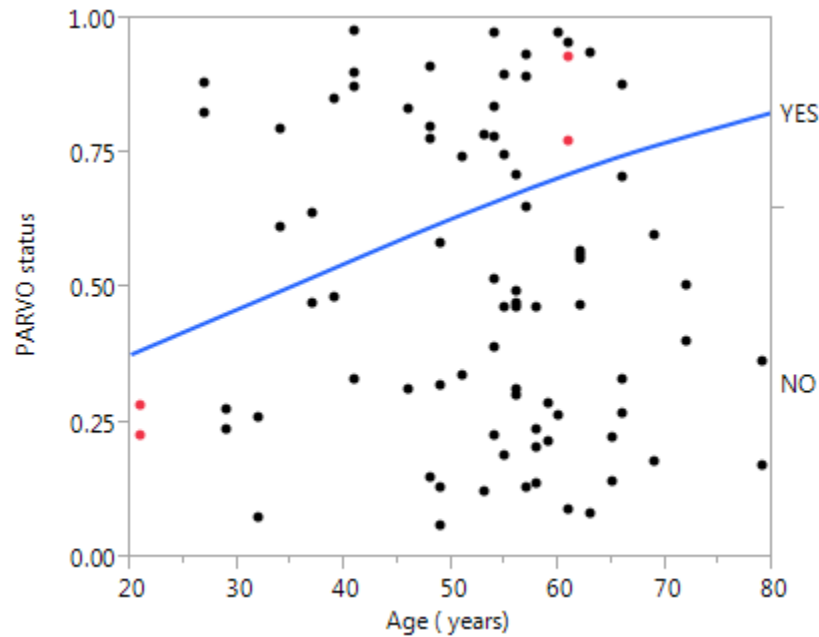
παθολογικό θυρεοειδικό ιστό είτε στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, είτε και σε συνδυασμό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Σε 2 από τους 21 (9,5%) ασθενείς, ο Παρβοϊός B19 ήταν παρών μόνο στον παθολογικό θυρεοειδικό ιστό ενώ σε έντεκα από τους 21 (52,4%) ασθενείς ο Παρβοϊός B19 ήταν παρών στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Στους υπόλοιπους 8 από τους 21 (38,1%) ασθενείς, ο Παρβοϊός B19 εντοπίστηκε τόσο στον παθολογικό θυρεοειδικό ιστό όσο και στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό των ίδιων ασθενών.

Ως επόμενο βήμα, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε τη συσχέτιση μεταξύ του Παρβοϊού B19 και του φύλου των ασθενών. Ο Παρβοϊός B19 δεν ανιχνεύθηκε σε 15 από τις 28 (53,5%) γυναίκες και σε 5 από τους 13 (38,4%) άνδρες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σχετικά με το φύλο των ασθενών ( $p = 0,811$ ).

Όσον αφορά στην ηλικία, στην ομάδα απουσίας του Παρβοϊού B19, η μέση ηλικία ήταν 57,5 (εύρος: 21-79) ετών και στην ομάδα παρουσίας του Παρβοϊού B19 η μέση ηλικία ήταν 53,0 ετών (εύρος: 27-68). Αν και παρατηρήθηκε μια θετική τάση προς την πιθανότητα παρουσίας του Παρβοϊού B19 καθώς αυξάνεται η ηλικία, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική παρά την τάση προς τη σημαντικότητα ( $p = 0,070$ ) όπως φαίνεται στην εικόνα 6.



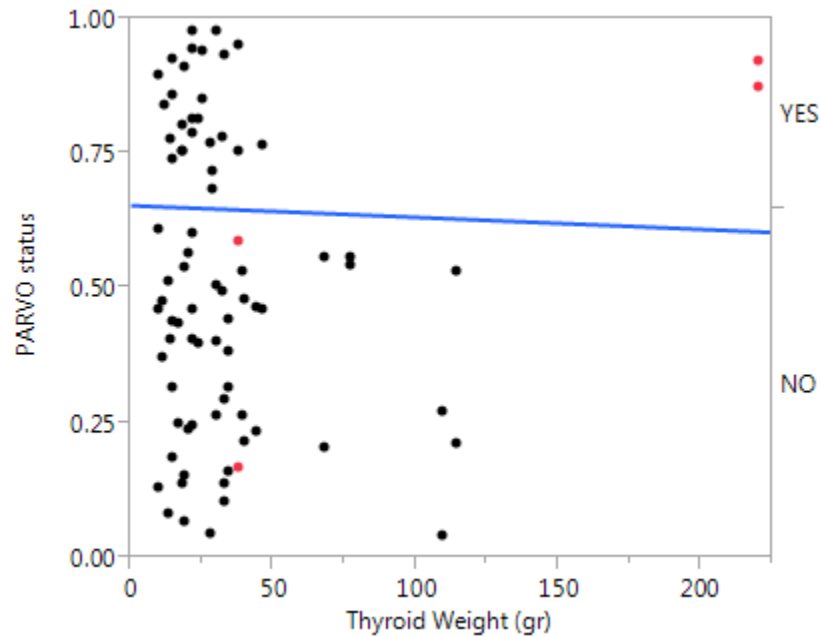




Εικόνα 6. Συσχέτιση της παρουσίας του Παρβοϊού B19 με την ηλικία των ασθενών της μελέτης

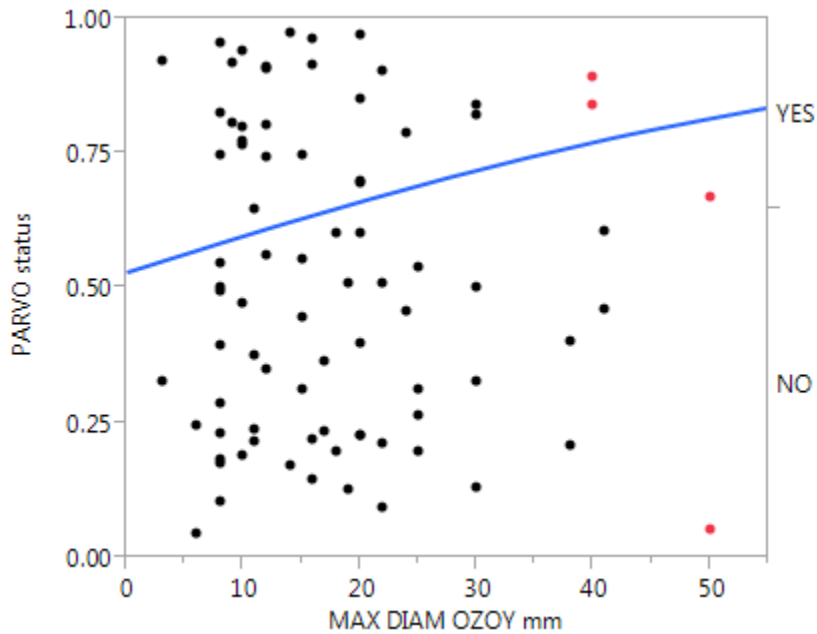
Όσον αφορά στη μετεγχειρητική διάγνωση και μετά τη λήψη της οριστικής ιστοπαθολογικής διάγνωσης, κατηγοριοποιήσαμε τους ασθενείς σε τρεις ομάδες: α) Πολυοζώδης βρογχοκήλη (ΠΟΒ) με συνολικά 19 από τους 41 (46,4%) ασθενείς, β) Θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένος (PTC) με συνολικά 22 από τους 41 (51,2%) ασθενείς και γ) μονήρης καλοήγητος όζος του θυρεοειδούς αδένος σε 1 (2,4%) ασθενή. Η στατιστική μας ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών ομάδων ασθενών σε σχέση με την οριστική μετεγχειρητική διάγνωση ( $p = 0,548$ ).

Στη συνέχεια ερευνήσαμε το συνολικό βάρος του θυρεοειδούς αδένος σε γραμμάρια. Το μέσο βάρος του θυρεοειδούς αδένος για την ομάδα παρουσίας του Παρβοϊού B19 ήταν 22 gr (εύρος: 10-210) και για την ομάδα απουσίας του Παρβοϊού B19 ήταν 33,5 gr (εύρος: 10-114). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p = 0,175$ ) όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.



Εικόνα 7. Συσχέτιση της παρουσίας του Παρβοϊού B19 με το βάρος του θυρεοειδούς αδένα των ασθενών της μελέτης

Η ανάλυσή μας επεκτάθηκε περαιτέρω στη διερεύνηση της μέγιστης διαμέτρου του κυρίαρχου οζιδίου του θυρεοειδούς και της συσχέτισής του με την παρουσία ή την απουσία του Παρβοϊού B19. Η διάμεση τιμή της μέγιστης διαμέτρου του όζου του θυρεοειδούς αδένα για την ομάδα παρουσίας του Παρβοϊού B19 ήταν 12 mm και για την ομάδα απουσίας του Παρβοϊού B19 ήταν 18,5 mm. Η ανάλυσή μας, έδειξε ότι η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p = 0,32$ ) όπως φαίνεται στην εικόνα 8.



Εικόνα 8. Συσχέτιση της παρουσίας του Παρβοϊού B19 με τη μέγιστη διάμετρο του προεξάρχοντος όζου του θυρεοειδούς αδένα των ασθενών της μελέτης

Όσον αφορά στην πολυεστιακότητα της νόσου στα δείγματα του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς αδένα, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι πολυεστιακή νόσος παρατηρήθηκε σε συνολικά 5 (25,0%) ασθενείς στην ομάδα απουσίας του Παρβοϊού B19 και σε 4 (19,0%) ασθενείς στην ομάδα παρουσίας του Παρβοϊού B19. Ωστόσο, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p = 0,719$ ).

	<b>Απουσία B19V (n=20)</b>	<b>Παρουσία B19V (n=21)</b>	<b>p-value</b>
<b>Φύλο</b>			0.368
Θήλυ (n,%)	15 (75.0%)	13 (61.9%)	
Άρρεν (n,%)	5 (25.0%)	8 (38.1%)	
<b>Ηλικία (έτη)</b>			0.070
Median (min,max,IQR)	57.5 (21,79,14)	53.0 (27,66,18)	
<b>Μετεγχειρητική διάγνωση</b>			0.548
ΠΟΒ (n,%)	9 (45.0%)	10 (47.6%)	
PTC (n,%)	10 (50.0%)	11 (52.4%)	
Καλοήθης όζος(n,%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	
<b>Βάρος (gr)</b>			0.175
Median (min,max,IQR)	33.5 (10,114,26)	22 (10,210,15)	
<b>Hashimoto's θυρεοειδίτιδα</b>			0.045*
Παρουσία (n,%)	6 (30.0%)	1 (4.8%)	
<b>Μέγιστη διάμετρος όζου (mm)</b>			0.320
Median (min,max,IQR)	18.5 (6,50,16)	12 (3,40,11)	
<b>Πολυεστιακή νόσος</b>			0.719
Παρουσία (n,%)	5 (25.0%)	4 (19.0%)	
*Fisher's exact test			

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των ιστικών παρασκευασμάτων σε συνάρτηση με την παρουσία ή απουσία του B19V



## 4.2 Συσχέτιση του Parvovirus B19 με την θυρεοειδίτιδα Hashimoto

Τέλος, μελετήσαμε τον ρόλο της θυρεοειδίτιδας του Hashimoto και την πιθανή συσχέτισή της με τη παρουσία του Παρβοϊού B19 στα δείγματα θυρεοειδικού ιστού των ασθενών μας. Η θυρεοειδίτιδα του Hashimoto ευρέθη σε συνολικά 6 (30,0%) ασθενείς στην ομάδα ασθενών χωρίς την παρουσία του Παρβοϊού B19 και μόνο σε έναν (4,8%) ασθενή στην ομάδα παρουσίας του Παρβοϊού B19. Είναι ενδιαφέρον ότι η στατιστική μας ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην



παρουσία θυρεοειδίτιδας του Hashimoto και στην απουσία του Παρβοϊού B19 (p = 0,045).

	Απουσία B19V		Παρουσία B19V		p-value
	Σε παθολογικό και φυσιολογικό ιστό (n=20)	Σε παθολογικό ιστό μόνο (n=2)	Σε φυσιολογικό ιστό μόνο (n=11)	Σε παθολογικό και φυσιολογικό ιστό (n=8)	
<b>Φύλο</b>					0.811
Θήλυ (n,%)	15 (75.0%)	1 (50.0%)	7 (63.6%)	5 (62.5%)	
Άρρεν (n,%)	5 (25.0%)	1 (50.0%)	4 (36.4%)	3 (37.5%)	
<b>Ηλικία (έτη)</b>					0.279
Median (min,max,IQR)	57.5 (21,79,14)	54.0 (48,60,12)	53.0 (37,66,20)	51.0 (27, 61,21)	
<b>Μετεγχειρητική διάγνωση</b>					0.930
ΠΟΒ (n,%)	9 (45.0%)	1 (50.0%)	6 (54.5%)	3 (37.5%)	
PTC (n,%)	10 (50.0%)	1 (50.0%)	5 (45.5%)	5 (62.5%)	
Καλοήθης όζος (n,%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
<b>Βάρος (gr)</b>					0.350
Median (min,max,IQR)	33.5 (10,114,26)	34.0 (22,46,24)	22.0 (10,33,15)	39.8 (12,220,20)	
<b>Hashimoto's θυρεοειδίτιδα</b>					0.039*
Παρουσία (n,%)	6 (30.0%)	0 (0.0%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	
<b>Μέγιστη διάμετρος όζου (mm)</b>					
Median (min,max,IQR)	18.5 (6,50,16)	18.5 (15,22,7)	12.0 (3,30,14)	14 (8,40,11)	0.656
<b>Πολυεστιακή νόσος</b>					0.736
Παρουσία (n,%)	5 (25.0%)	0 (0.0%)	2 (27.3%)	1 (12.5%)	

\*linear-by-linear association

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των ιστικών παρασκευασμάτων σε συνάρτηση με την παρουσία ή απουσία του B19V στις επιμέρους υποομάδες





## Συζήτηση – Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε την παρουσία του του Παρβοϊού B19 σε μετεγχειρητικά ιστικά δείγματα θυρεοειδεκτομών 41 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ολική θυρεοειδεκτομή με κακοήθη ή καλοήθη προεγχειρητική διάγνωση, σε ένα τριτοβάθμιο τμήμα Χειρουργικής Ογκολογίας. Εξετάσαμε τόσο τον μη φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό όσο και τον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό κάθε ασθενούς. Στα μισά από τα δείγματα που εξετάστηκαν, ανευρέθη η παρουσία του Παρβοϊού B19.





Παρόλο που ο Παρβοϊός B19 θεωρείται ιός που προκαλεί την κυτταρική απόπτωση (66), πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πιθανή επίδραση στη νόσο του θυρεοειδούς αδένος εν γένει και ιδιαίτερα στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος (8,67). Οι αλληλουχίες του Παρβοϊού B19 αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 2008 από τους Wang et al. σε δείγματα θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοϊστοχημείας (IHC), nested PCR και in situ υβριδισμού (ISH) στο 63%, 83,3% και έως 97% των περιπτώσεων αντίστοιχα. Το 2011, η παρουσία του του Παρβοϊού B19 αναφέρθηκε από τους Adamson et al. τόσο στο αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς (ATC) όσο και στη θυρεοειδίτιδα του Hashimoto (HT) σε μια αναδρομική μελέτη δειγμάτων θυρεοειδικού ιστού (6). Οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν το 2014, την παρουσία DNA του Παρβοϊού B19, αλλά και mRNA και πρωτεϊνών του καψιδίου όχι μόνο στα καρκινικά κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος αλλά και σε φυσιολογικά κύτταρα ιστού του θυρεοειδούς αδένος χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά (9).

Ο Παρβοϊός B19 είναι ένα υποχρεωτικό ανθρώπινο παθογόνο και μελέτες έχουν δείξει ότι ανιχνεύεται και σε άλλους εκτός από τον θυρεοειδικό, όπως η καρδιά και οι όρχεις. Αυτή η σχετικά συχνή παρουσία του Παρβοϊού B19 σε αυτούς τους ιστούς αναφέρθηκε ωστόσο ότι δεν σχετίζεται με νόσο σε αυτές τις κυτταρικές σειρές (69,70,71). Οι Adamson et al (63) έδειξαν την παρουσία του Παρβοϊού B19 σε φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό καθώς και ότι τα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς που χρειάζονται για την πρόσδεση σε αυτά του Παρβοϊού B19. Αυτό είναι ένα σημαντικό πρώτο βήμα προς τη θεωρία των Mori et al (72) για τον «αθώο παρατηρητή Παρβοϊό B19» στον θυρεοειδικό ιστό και ότι η παρουσία του δεν επηρεάζει, ούτε ενεργοποιεί παθολογικούς μηχανισμούς στον θυρεοειδή αδένος.

Πράγματι, στην παρούσα προοπτική μελέτη μας, αποδεικνύεται ότι ο Παρβοϊός B19 υπάρχει όχι μόνο σε μη φυσιολογικά δείγματα θυρεοειδικού ιστού,



αλλά και στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό στους θυρεοειδείς αδένες, μετά από ολική θυρεοειδεκτομή για κακοήθη ή καλοήθη προεγχειρητική διάγνωση.

Το κύτταρο ξενιστής του Παρβοϊού B19 είναι το προγονικό κύτταρο της ερυθροειδούς σειράς του μυελού των οστών, αν και μπορεί να παραμείνει σε διάφορους άλλους ανθρώπινους ιστούς. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η ανίχνευση του DNA του Παρβοϊού B19 στο αίμα με PCR θα μπορούσε να σχετίζεται με την παρουσία κλώνων DNA που απελευθερώνονται από τους επιμολυσμένους ιστούς χωρίς ωστόσο να υποδεικνύουν και τον ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού (73). Οι συγγραφείς αναφέρουν πως η παρουσία του Παρβοϊού B19, αν και έχει επιβεβαιωθεί σε κύτταρα που μέχρι σήμερα ήταν γνωστό πως δεν φέρουν τους υποδοχείς πρόσδεσης του Παρβοϊού B19, εντούτοις αυτοί οι ιστοί έχουν βρεθεί να περιέχουν DNA του Παρβοϊού B19. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στην έλλειψη ορισμένων μηχανισμών για την αποικοδόμηση του μικρού DNA του Παρβοϊού B19.

Η ανάλυση της υποομάδας μας αποκάλυψε ότι ο Παρβοϊός B19 ανευρέθη τόσο στον παθολογικό όσο και στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό σε 8 από τους 21 (38,1%) ασθενείς της μελέτης μας. Επιπλέον, σε 11 από τους 21 (52,4%) ασθενείς ο Παρβοϊός B19 ανιχνεύθηκε μόνο στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό αλλά όχι στον παθολογικό θυρεοειδικό ιστό του ίδιου ασθενούς. Τέλος, σε 2 από τους 21 (9,5%) ασθενείς, ο Παρβοϊός B19 ανιχνεύθηκε στον παθολογικό θυρεοειδικό ιστό αλλά όχι στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Πλέον είναι ασαφές το ποιες είναι οι ακριβείς συνθήκες που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την ανεύρεση του ιού άλλοτε σε φυσιολογικούς και άλλοτε σε μη φυσιολογικούς θυρεοειδικούς ιστούς.

Έχει αναφερθεί ότι η συχνότητα εμφάνισης των όζων του θυρεοειδούς αδένος αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η ηλικία και μάλιστα, ιδιαίτερα στις γυναίκες το μέγεθος των όζων σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την πιθανότητα ύπαρξης



κακοήθειας (74,75,76). Στη μελέτη μας, παρόλο που παρατηρήθηκε μια θετική τάση προς την πιθανότητα παρουσίας του Παρβοϊού B19 καθώς αυξάνεται η ηλικία, εντούτοις απαιτείται μεγαλύτερο μέγεθος συλλογής δειγμάτων για να επιβεβαιώσει ή να απορρίψει μια τέτοια υπόθεση.

Παρόλο που διάφορες αναφορές κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν δείξει την παρουσία του Παρβοϊού B19 σε δείγματα θυρεοειδούς αδένος με θυρεοειδίτιδα, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί σαφής σύνδεση των δυο αυτών πολύ συχνών παθολογιών (67, 72, 77, 78). Σε μια μελέτη των Mori et al. (79) οι συγγραφείς εισήγαγαν το μη δομικό γονίδιο πρωτεΐνης 1 (NS1) του Παρβοϊού B19 σε ποντίκια C57BL/6 και προκάλεσαν έτσι θυρεοειδίτιδα μέσω ανοσοποίησης θυρεοσφαιρίνης (Tg) - thyroglobulin (Tg) immunization. Η θυρεοειδίτιδα προκλήθηκε στο ένα τέταρτο των διαγονιδιακών ποντικών NS1, αλλά απέτυχε να προκληθεί σε άγριου τύπου ποντικούς, με τη διαφορά να μην ήταν στατιστικά σημαντική.

Στην παρούσα μελέτη μας εξετάσαμε την παρουσία θυρεοειδίτιδας του Hashimoto και τον συσχετισμό της με την παρουσία του Παρβοϊού B19. Ο Παρβοϊός B19 ήταν παρών σε μόνο έναν ασθενή (4,8%) με θυρεοειδίτιδα του Hashimoto, ενώ ο Παρβοϊός B19 δεν ανιχνεύθηκε σε 6 (30%) ασθενείς με θυρεοειδίτιδα του Hashimoto. Θα πρέπει να γίνουν ωστόσο, εξαιρετικά προσεκτικές υποθέσεις εξαιτίας του μικρού αριθμού των εξεταζόμενων ασθενών της μελέτης μας, ειδικά όταν οι περιβαλλοντικοί ή κοινωνικο-δημογραφικοί παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε ένα εν τέλει ετερογενές δείγμα ασθενών (80). Απαιτούνται συνεπώς πιο εξειδικευμένες και μεγαλύτερες μελέτες για να επιβεβαιώσουν την υπόθεσή μας.

Προφανώς είναι μια εξαιρετικά απαιτητική και επίπονη εργασία η σύνδεση ενός ιού που είναι υποχρεωτικό ανθρώπινο παθογόνο με τον καρκίνο, καθώς τα ζωικά μοντέλα και η *in vitro* ανάλυση σε κυτταρικές σειρές μπορούν μόνο να



εγείρουν την υποψία. Ωστόσο, η παρουσία του Παρβοϊού Β19 εντός φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού σε έναν πληθυσμό ασθενών μπορεί να αναδειχθεί και να αποτελέσει το έναυσμα περαιτέρω μελετών.

Προς αυτή τη κατεύθυνση λοιπόν, απαιτούνται επιπλέον μελέτες σε δείγματα ανθρώπινων θυρεοειδών ιστών για να διευκρινιστεί ο ρόλος του Παρβοϊού Β19 στη νόσο και πιθανά στην καρκινογένεση του θυρεοειδούς αδένος.





**ORIGINAL ARTICLE**

**Parvovirus B19 detection analysis in thyroid tissue paired samples: an observational study from a tertiary surgical oncology department**

Dimitrios Nasikas<sup>1,2</sup>, Alexandros Zafiropoulos<sup>1</sup>, Emmanouil K. Symvoulakis<sup>1,3</sup>,  
Antonios Bertsias<sup>3</sup>, Stavros Derdas<sup>2</sup>, Demetrios A. Spandidos<sup>1</sup>, Georgios  
Sakorafas<sup>2</sup>, George Sourvinos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece.

<sup>2</sup> Department of Surgical Oncology, Saint Savvas Cancer Hospital, Athens, Greece.

<sup>3</sup> Clinic of Social and Family Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.



**Running title:** Parvovirus B19 detection analysis in thyroid tissue paired samples

JBUON 2021; 26 (3)

Received: 07/11/2020;

Accepted: 11/12/2020

**Corresponding author:**

George Sourvinos, PhD. Laboratory of Virology, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, 71003, Crete, Greece. Tel/Fax: +30 2810 394 835, Email: sourvino@med.uoc.gr

**Summary**

**Purpose:** In the present study, we sought to investigate the presence of Parvovirus B19 in both abnormal and normal adjacent thyroid tissue specimens after total thyroidectomy as well as the extent that this phenomenon occurs in a population group referred to a tertiary surgical oncology department.



**Methods:** We detected Parvovirus B19 by Real-Time PCR in both abnormal and normal adjacent thyroid tissue specimens from 41 patients who underwent total thyroidectomy for thyroid disease (cancerous or benign). Hashimoto's thyroiditis, thyroid gland weight, maximum size of the predominant thyroid nodule as well as sex and age of the patients were also evaluated in respect to the Parvovirus B19 presence.

**Results:** Parvovirus B19 virus genome was detected in 21/41 (51.2%) patients in at least one of the paired thyroid tissue samples. No statistically significant difference was noted regarding the sex, age, postoperative diagnosis, thyroid weight and maximum nodule diameter and presence of multifocal disease. The correlation between the incidence of Hashimoto thyroiditis and absence of Parvovirus B19 genome was statistically significant.

**Conclusion:** Our findings showed high prevalence of Parvovirus B19 DNA in thyroid tissue disease in the population examined. Its actual role of the virus and its potential implication in the development or progression of thyroid diseases remain to be elucidated. Larger cohort studies are needed in order to validate a quasi-mutually exclusive role of Hashimoto's thyroiditis and Parvovirus B19 presence in thyroid disease in terms of geographical distribution.





**Key words:** Parvovirus B19, thyroid cancer, Hashimoto's thyroiditis, Real-Time PCR

## Introduction

During the last decades and mainly due to the widespread use of neck ultrasound and its availability and better sensitivity, there has been noted an increase in thyroid nodule detection in the general population. Although death from thyroid cancer is rare, certain carcinogenic risk factors have been proposed such as ionizing radiation at a young age and family history. The most common variation of thyroid cancer is papillary thyroid carcinoma (PTC), accounting for approximately 80% of all cancer cases [1]. Although multinodular goiter (MNG) is classically considered as a benign thyroid disease with an estimated prevalence of approximately 4% in western countries, recent data support the existence of a possible higher cancer risk, close to that of a solitary thyroid nodule [2].

Parvovirus B19 (also known as Erythrovirus B19) (B19V) is a member of the Parvoviridae family, consisting of a 5.6 kb linear single-stranded DNA genome. B19V is a non-enveloped virus with a diameter of approximately 23–26 nm [3]. B19V infection can cause numerous diseases in humans, such as transient aplastic crisis, persistent anemia in immunocompromised patients, cardiomyopathy and



inflammation of various other tissues [4-6]. Two capsid proteins (VP1 and VP2) and one large, nonstructural protein (NS1) are encoded by the B19V genome [7].

The first report that associated B19V infection to PTC was published in 2008 [8]. The authors reported the presence of Parvovirus B19 sequences in PTC paraffin-embedded thyroid samples as well as the presence of capsid protein. Additional data were available in 2011 when Parvovirus B19 infection was reported in both anaplastic thyroid carcinoma (ATC) and Hashimoto's thyroiditis (HT) in archived thyroid tissue samples [9]. The same group in 2014 reported for the first time, the presence of B19V DNA, mRNA and capsid proteins not only in thyroid cancer cells but also in normal thyroid tissue cells with no statistically significant difference [10]. Moreover, in a recent study, B19V detection through immunohistochemistry (IHC) was found not to be statistically significant among Grave's disease thyroid tissue specimens and multinodular goiter thyroid tissue specimens [11].

Although an emerging number of studies during the last decade imply a possible role of B19V presence in thyroid disease, there is conflicting evidence considering the presence of B19V in thyroid cancer cells and normal thyroid epithelial cells. We sought to investigate the presence of Parvovirus B19 in thyroid tissue specimens after total thyroidectomy for both a cancerous or a benign diagnosis and



the extent that this phenomenon occurs in the population group referred to a tertiary surgical oncology department.

## **Methods**

The study was approved by the Ethics Committee of Saint Savvas Cancer Hospital, Athens, Greece.

### *Subjects and design of the study*

The study was approved by the Ethics Committee of Saint Savvas Cancer Hospital, Athens, Greece

In the present study, 41 patients who underwent total thyroidectomy at the surgical oncology department of the “Saint Savvas Cancer Hospital”, Athens, Greece, agreed to participate and were enrolled over a 3-year period (2016-2019). Thyroid tissue samples were obtained intra-operatively after total thyroidectomy and thyroid gland weight measurement was assessed. After close inspection, a sample of the abnormal thyroid tissue and the adjacent normal thyroid tissue was obtained and stored at -80°C, creating a pool of total 82 thyroid tissues samples. All abnormal tissue samples were re-examined by pathologists to confirm the diagnosis. Enrollment criteria were: suggestive fine needle aspiration (FNA)



cytology and an ultrasonography mapping of the thyroid gland. Exclusion criteria were: immunosuppression and glucocorticoid treatment during the last three months before surgery. All patients had good hormone functionality at the time of surgery.

Thirteen males (31.7%) and 28 (68.3%) females with a mean age of  $52.6 \pm 12.5$  years were fulfilling the inclusion criteria of the study. In respect of sex differences, the mean age of the males was  $50.7 \pm 12.4$  years whereas the mean age of the females was  $53.5 \pm 12.7$  years.

Twenty-six out of 41 patients (63.4%) were admitted to the operating room with a preoperative diagnosis of multinodular goiter and 11 patients (26.9%) were admitted to the operating room with a preoperative diagnosis of papillary thyroid cancer after a suggestive fine needle aspiration of the thyroid gland. Four patients (9.7%) presented with cellular atypia in the preoperative FNA cytology report.

The study was approved by the Scientific Board of the “Saint Savvas Cancer Hospital”, Athens, Greece and informed consent was obtained from all the patients that were assigned in this study. Helsinki declaration amendments and personal data safety are research priorities for all study phases, before and after data publication.

### *Nucleic acid isolation*



Thyroid tissue samples were homogenized and DNA extraction was carried out using the Genomic DNA Purification Kit (Genomed, Löhne, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was rehydrated with hydration buffer and stored at -20°C until use. RNA extraction was carried out using the Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY) protocol. Nucleic acid quality was confirmed by its absorption rate at 260/280nm using a ND1000D spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE).

#### *Real-time polymerase chain reaction*

Determination of the B19 presence was achieved by Real-Time PCR using the Parvovirus B19 Real-TM Quant kit (Sacace Biotechnologies Srl, Italy) according to the manufacturer's protocol [12]. Specifically, we used the following thermal cycling profil: 1 cycle at 95°C for 15 min; 5 cycles at 95°C for 5 s, at 60°C for 20 s, at 7 °C for 15 s; and 40 cycles at 95°C for 5 s, at 60°C for 30 s and 72 °C for 15 s. The internal control (IC) and negative control (NC) buffer included in the kit were used to validate the qualitative and quantitative analysis respectively.

#### *Statistics*

All categorical variables are summarized as number of counts and percentage. All numerical variables are being presented as median (min, max, Inter-quartile range [IQR]). Univariate comparisons between categorical variables were conducted



using Pearson's chi-square test and Fisher's exact test (reported in the Table). For comparisons between categories with many empty cells the p value for the linear-by-linear association is reported instead of the Chi-square (reported in the Table). Univariate comparisons in cases of numeric variables were performed using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. The level of significance was set to  $\alpha=0.05$  and the IBM SPSS Version 24.0 (Statistical Package for social Sciences for Windows 24 Inc., Chicago, IL, USA) was used for the analysis.

## Results

We investigated the B19V presence in both the abnormal thyroid tissue and normal adjacent thyroid tissue in 41 patients. In Table 1, the demographic data in respect to B19V presence are presented.

B19V was detected in thyroid tissue samples in 21 (51.2%) patients in at least one of the paired thyroid tissue samples. We furthermore subdivided the B19V presence group into three subgroups regarding the specific presence of B19V in either the abnormal thyroid tissue alone, the normal adjacent thyroid tissue alone and in both the abnormal and normal adjacent thyroid tissue, as shown in Table 2. In 2 out of 21 (9.5%) patients, B19V was present in the abnormal thyroid tissue alone whereas in eleven out of 21 (52.4%) patients B19V was present in the



normal adjacent thyroid tissue alone. In the remaining 8 out of 21 (38.1%) patients, B19V was detected in both the abnormal thyroid tissue and the normal adjacent thyroid tissue.

As a next step, we sought to investigate the correlation between B19V and the sex of the patients. Parvo B18 was not detected in 15 out of 28 (53.5%) females and in 5 out of 13 (38.4%) males. No statistically significant difference was noted regarding the sex of the patients ( $p=0.811$ ).

As regards the age, in the B19V absence group, the median age was 57.5 (range:21-79) years old and in the B19V presence group the median age was 53.0 years old (range:27-68). Although there was noted a positive trend towards the likelihood of B19V presence as age increases, the difference was not statistically significant despite a tendency towards significance ( $p=0.070$ ).

Regarding the postoperative diagnosis and after obtaining the definite histopathology report, we categorized the patients into three groups: a) of multinodular goiter (MNG) with a total of 19 out of 41 (46.4%) patients, b) papillary thyroid cancer (PTC) with a total of 22 out of 41 (51.2%) patients and c) a benign thyroid nodule in 1 (2.4%) patient. Our statistical analysis retrieved no significant correlation among the patients groups in respect to the definite postoperative diagnosis.



We next investigated the thyroid's gland total weight in grams. The median thyroid weight for the B19V presence group was 22 gr (range:10-210) and for the B19V absence group was 33.5 gr (range:10-114). The statistical analysis showed that the difference was not statistically significant ( $p=0.175$ ).

Our analysis was further expanded in investigating the maximum diameter of the predominant thyroid nodule and its correlation with the B19V status. The median value of the maximum thyroid nodule diameter for the B19V presence group was 12 mm and for the B19V absence group was 18.5 mm. Our analysis showed that the difference was not statistically significant ( $p=0.32$ ).

Regarding the multifocality of the disease in the PTC thyroid specimens, our statistical analysis has showed that the multifocality of the disease was noted in a total of 5 (25.0%) patients in the B19V absence group and in 4 (19.0%) patients in the B19V presence group, however, the difference was not statistically significant.

Finally, we studied the role of Hashimoto's thyroiditis and its correlation with B19V presence in our thyroid tissue samples. Hashimoto's thyroiditis was diagnosed in a total of 6 (30.0%) patients in the group of patients with no detection of B19V and in only one (4.8%) patient in the B19V presence group. Interestingly, our statistical analysis showed that there is a statistically significant difference in Hashimoto's thyroiditis presence and B19V absence ( $p=0.045$ ).





## Discussion

In the present study, we examined the Parvovirus B19 presence in postoperative thyroid tissue specimens of 41 patients who underwent total thyroidectomy under a cancerous or a benign preoperative diagnosis, in a tertiary surgical oncology department. We tested both the abnormal thyroid tissue and the adjacent normal thyroid tissue of each patient. Within half of the samples examined detection of B19V has been reported.

Although Parvovirus B19 is considered to be an apoptosis inducing virus (13), recent studies have shown a possible effect in thyroid disease and particularly in thyroid cancer [8,14]. Parvovirus B19 sequences were first reported in 2008 by Wang et al. in PTC paraffin-embedded thyroid samples using immunohistochemistry (IHC), nested PCR and *in situ* hybridization (ISH) methods in 63%, 83.3% and up to 97% of cases. In 2011, Parvovirus B19 presence was reported by Adamson et al in both anaplastic thyroid carcinoma (ATC) and Hashimoto's thyroiditis (HT) in archived thyroid tissue samples [9]. The same authors showed in 2014, the presence of B19V DNA, mRNA and capsid proteins not only in thyroid cancer cells but also in normal thyroid tissue cells with no statistically significant difference [10]. Parvovirus B19 is an obligatory human



pathogen and studies have shown that it persists in other than thyroid, human tissue such as the heart and the testis. This relatively frequent presence of B19V in these tissues was reported not to be a disease related [16-18]. Adamson et al [10] showed the presence in normal thyroid tissue and that normal thyroid epithelial cells express the receptors needed for the B19V. This is an important first step towards the theory of Mori et al [19] for the innocent bystander B19V in thyroid tissue and that its presence is not affecting or triggering pathologic mechanisms in thyroid gland. Indeed in our prospectively designed study it is shown that B19V is present not only in abnormal thyroid tissue samples but also in the adjusting normal thyroid tissue in thyroid glands, after total thyroidectomy for a cancerous or a benign disease state. The host cell for Parvovirus B19 is the bone marrow erythroid progenitor cell although it may persist in various other human tissues. In a recent study, the authors argue that the detection of B19V DNA in blood by PCR could refer to DNA strands released from tissues without active replication [19]. The authors state that the B19V presence, although it has been confirmed in non-permissive for B19V cells, these tissues have been reported to contain B19V DNA and the persistence could be episomal, due to the lack of certain mechanisms to degrade this viral DNA. Our subgroup analysis revealed that B19V was present in both the abnormal and the normal adjacent thyroid tissue in 8 out of 21 (38.1%) patients. Moreover, in 11/21 (52.4%) patients B19V was detected in only the



normal adjacent thyroid tissue but not in the abnormal thyroid tissue. Finally, in 2/21 (9.5%) patients, B19V was detected in the abnormal thyroid tissue but not in the adjacent normal thyroid tissue. It is difficult to yet describe which hypotheses could explain viral persistence within normal and abnormal tissues.

It has been reported that nodule incidence increases as age increases and particularly in women and the nodule size is inversely correlated to the malignancy risk [21-23]. In our study although there was noted a positive trend towards the likelihood of B19V presence as age increases, a greater size of sample collection may be needed.

Although various reports during the last two decades have shown B19V presence in thyroid specimens with thyroiditis, a clear link is yet to be established (14,19,24,25). In a study of Mori et al. [26] the authors introduced the non-structural protein 1 (NS1) gene of B19 into C57BL/6 mice and provoked thyroiditis via thyroglobulin (Tg) immunization. Thyroiditis was induced in a quarter of the NS1-transgenic subjects, but failed to be induced in wild-type subjects and this difference was did not statistically significant. In our present study we examined Hashimoto's thyroiditis presence and its correlation with the B19V presence. B19V was present in only one patient (4.8%) with Hashimoto's thyroiditis whereas B19V was not detected in 6 (30%) patients with Hashimoto's thyroiditis. Extremely careful assumptions should be made because of the small



number of enrolled patients, especially when environmental or socio-demographic determinants may lead to further sub-grouping of not easily collected surgical samples [27]. Geo-spatial observations based on numerically more robust research initiatives are needed to confirm our hypothesis.

It is obviously a demanding task to link a virus which is an obligatory human pathogen with cancer, since animal models and *in vitro* analysis in cell lines can only raise the suspicion. However, its presence within normal tissue at an ‘innocent’ time point can be easily shown. A hypothesis that could explain discrepancies across all models of investigation may possess more plausibility. Additional studies in human thyroid tissue specimens are needed to elucidate the role of B19V in thyroid disease.



### **Authors' contributions**

DN performed the experiments and wrote the manuscript. AZ designed and performed experiments while he also contributed to the manuscript. EKS and AB statistically analysed the results and contributed to the manuscript, SD performed experiments, DAS conceived experiments and edited the manuscript, GS surgically obtained the biological material and GS conceived and designed experiments as well as he edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **References**

1. Haugen BR , Alexander EK , Bible KC et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016, Jan 1; 26(1): 1–133



2. Gandolfi PP, Frisina A, Raffa M, et al. The incidence of thyroid carcinoma in multinodular goiter: retrospective analysis. *Acta Biomed* 2004;75:114-17.
3. Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Young NS. Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev* 2017;30:43-113.
4. Chorba, T., Coccia, P., Holman, RC et al. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J Infect* 1986;Dis. 154:383-93.
5. Simpson KE, Storch GA, Lee CK, Ward KE, Danon S, Simon CM et al. High frequency of detection by pcr of viral nucleic acid in the blood of infants presenting with clinical myocarditis. *Pediatr Cardiol* 2016;37:399-404.
6. Adamson-Small LA, Ignatovich IV, Laemmerhirt MG Hobbs, JA. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res* 2014;190:8-16.
7. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:485-505.
8. Wang JH, Zhang WP, Liu HX et al. Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid. *Br J Cancer* 2008;98:611-8.



9. Adamson LA, Fowler LJ, Clare-Salzler MJ, Hobbs JA. Parvovirus B19 infection in Hashimoto's thyroiditis, papillary thyroid carcinoma, and anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid* 2011;21:411-7.
10. Adamson LA, Fowler LJ, Ewald AS, Clare-Salzler MJ, Hobbs JA. Infection and Persistence of Erythrovirus B19 in Benign and Cancerous Thyroid Tissues. *J Med Virol.* 2014;86:1614-20
11. Page C, Hoffmann TW, Benzerdjeb N, Duverlie G, Sevestre H, Desailoud R., Detection of Erythrovirus B19 in Thyroidectomy Specimens From Graves' Disease Patients: A Case–Control Study. *J Med Virol* 2013;85:1414-9.
12. Parvovirus B19 real-TM Quant, Sacace Biotechnologies Srl, Italy, url :<https://sacace.com/manuals.htm>, last accessed : July 2020.
13. Chen AY, Qiu J, Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest. *Fut Virol* 2010;5:731-43.
14. Wang J, Zhang W, Liu H et al. Parvovirus B19 infection associated with Hashimoto's thyroiditis in adults. *J Infection* 2010;60:360-70.
15. Li Y, Wang J, Zhu G et al. 2007. Detection of Parvovirus B19 Nucleic Acids and Expression of Viral VP1/VP2 Antigen in Human Colon Carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1489-98.



16. Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Anderson A, Akre O. 2002. No association between human parvovirus B19 and testicular germ cell cancer. *J Gen Virol* 83:2321-4.
17. Kueth F, Sigusch HH, Hilbig K et al. 2007. Detection of viral genome in the myocardium: Lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 153:850-8.
18. Kueth F, Lindner J, Matschke K et al. 2009. Prevalence of Parvovirus B19 and Human Bocavirus DNA in the Heart of Patients with no Evidence of Dilated Cardiomyopathy or Myocarditis. *Clin Infect Dis* 2009;49:1660-6.
19. Mori K, Yoshida K. Viral infection in induction of Hashimoto's thyroiditis: A key player or just a bystander? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:418-24.
20. Molenaar-de Backer MWA, Russcher A, Kroes ACM et al. Detection of parvovirus B19 DNA in blood: Viruses or DNA remnants? *J Clin Virol* 2016;84:19-23.
21. Kwong N, Medici M, Angell TE et al, The Influence of Patient Age on Thyroid Nodule Formation, Multinodularity, and Thyroid Cancer Risk, *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:4434-40.
22. Dean DS, Gharib H. Epidemiology of Thyroid Nodules, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:901-11.





23. Cavallo A, Johnson DN, White MG et al. Thyroid Nodule Size at Ultrasound as a Predictor of Malignancy and Final Pathologic Size. *Thyroid* 2017;27:641-50.
24. Lehmann HW, Lutterbuse N, Plentz A et al. Association of parvovirus B19 infection and Hashimoto's thyroiditis in children. *Viral Immunol* 2008;21:379-83.
25. Mori K, Munakata Y, Saito T et al. Intrathyroidal persistence of human parvovirus B19 DNA in a patient with Hashimoto's thyroiditis. *J Infect* 2007;55, e29-3.
26. Mori K, Yoshida K, Ishii K, Morohoshi K, Nakagawa Y, Hoshikawa S, Ozaki H, Takahashi Y, Ito S. Experimental autoimmune thyroiditis in human parvovirus B19 transgenic mice. *Autoimmunity* 2011;44:483-9,
27. Symvoulakis EK, Zaravinos A, Panutsopoulos D et al. Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2007;22:12-8.



**Table 1.** Patients and thyroid tissue demographic data in respect to B19V presence

<i>Demographic data</i>	<i>B19V absence</i> (n=20)	<i>B19V presence</i> (n=21)	<i>p value</i>
Gender			0.368
Females, n (%)	15 (75.0)	13 (61.9)	
Males, n (%)	5 (25.0)	8 (38.1)	
Age (years)			0.070
Median (min,max,IQR)	57.5 (21,79;14)	53.0 (27,66;18)	
Post-op diagnosis			0.548
MNG, n (%)	9 (45.0)	10 (47.6)	
PTC, n (%)	10 (50.0)	11 (52.4)	
Benign nodule, n (%)	1 (5.0)	0 (0.0)	
Weight (gr)			0.175
Median (min,max,IQR)	33.5 (10,114;26)	22 (10,210;15)	
Hashimoto's	© Δημήτριος Κ. Νασίκας, Διδακτορική Διατριβή		0.045*



Thyroiditis			
Yes, n (%)	6 (30.0)	1 (4.8)	
Max diameter (mm)			0.320
Median (min,max,IQR)	18.5 (6,50;16)	12 (3,40;11)	
Multifocal disease			0.719
Yes, n (%)	5 (25.0)	4 (19.0)	
*Fisher's exact test			



**Table 2.** Patients and thyroid tissue demographic data in respect to B19V presence among specific subgroups

	<i>B19V absent in both abnormal and normal tissue (n=20)</i>	<i>B19V present</i>			<i>p value</i>
		<i>in abnormal tissue only (n=2)</i>	<i>in normal tissue only (n=11)</i>	<i>in both abnormal and normal tissue(n=8)</i>	
Sex					0.811
Females, n (%)	15 (75.0)	1 (50.0)	7 (63.6)	5 (62.5)	
Males, n (%)	5 (25.0)	1 (50.0)	4 (36.4)	3 (37.5)	
Age (years)					0.279
Median (min,max,IQR)	57.5 (21,79;14)	54.0 (48,60;12)	53.0 (37,66;20)	51.0 (27, 61;21)	
Post-op diagnosis					0.930
MNG, n (%)	9 (45.0)	1 (50.0)	6 (54.5)	3 (37.5)	
PTC, n (%)	10 (50.0)	1 (50.0)	5 (45.5)	5 (62.5)	



Benign nodule, n (%)	1 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Weight (gr)					0.350
Median (min,max,IQR)	33.5 (10,114;26)	34.0 (22,46;24)	22.0 (10,33;15)	39.8 (12,220;20)	
Hashimoto's thyroiditis					0.039*
Yes, n (%)	6 (30.0)	0 (0.0)	1 (9.1)	0 (0.0)	
Max diameter (mm)					
Median (min,max,IQR)	18.5 (6,50;16)	18.5 (15,22;7)	12.0 (3,30,14)	14 (8,40;11)	0.656
Multi-focal disease					0.736
Yes, n (%)	5 (25.0)	0 (0.0)	2 (27.3)	1 (12.5)	
*linear-by-linear association					





1. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al.: 2015 American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016, Jan 1; 26(1): 1–133
2. Gandolfi PP, Frisina A, Raffa M, et al. The incidence of thyroid carcinoma in multinodular goiter: retrospective analysis. *Acta Biomed.* 2004 Aug;75(2):114–117
3. Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., and Young, N. S. (2017). Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 43–113.
4. Chorba, T., Coccia, P., Holman, R. C., Tattersall, P., Anderson, L. J., Sudman, J., et al. (1986). The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J. Infect. Dis.* 154, 383–393.
5. Simpson, K.E., Storch, G.A., Lee, C.K., Ward, K.E., Danon, S., Simon, C. M., et al. (2016). High frequency of detection by pcr of viral nucleic acid in the blood of infants presenting with clinical myocarditis. *Pediatr. Cardiol.* 37, 399–404.
6. Adamson-Small, L. A., Ignatovich, I. V., Laemmerhirt, M. G., and Hobbs, J. A. (2014). Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res.* 190, 8–16.
7. Heegaard ED, Brown KE 2002 Human parvovirus B19. *ClinMicrobiol Rev* 15:485–505.



8. Wang JH, Zhang WP, Liu HX, Wang D, Li YF, Wang WQ, Wang L, He FR, Wang Z, Yan QG, Chen LW, Huang GS 2008 Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid. *Br J Cancer* 98:611–618.
9. Adamson, L.A., Fowler, L.J., Clare-Salzler, M.J., Hobbs, J.A., 2011. Parvovirus B19 infection in Hashimoto's thyroiditis, papillary thyroid carcinoma, and anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid* 21(4), 411-417
10. Adamson LA, Fowler LJ, Ewald AS, Clare-Salzler MJ, HobbsJA, Infection and Persistence of Erythrovirus B19 in Benign and Cancerous Thyroid Tissues, *J Med Virol.* 2014;86:1614-20
11. Page C, Hoffmann TW, Benzerdjeb N, Duverlie G, Sevestre H, Desailoud R., Detection of Erythrovirus B19 in Thyroidectomy Specimens From Graves' Disease Patients: A Case–Control Study, *J. Med. Virol.* 85:1414–1419, 2013
12. Giddings A E: The history of Thyroidectomy; *J R SOC . MED* 1998: 91 (SUPP33) 3-6
13. Harold Ellis: *A History of Surgery.* 2001, Chapter 13. page 199- 205.
14. Diefenbach JF. *Die Operative Chirurgie II.* Leipzig: F.A. Brockhaus; 1848. p. 331
15. Liston R, Mutter TD. *Lectures on the operations of surgery and on diseases and accidents requiring operations.* Philadelphia: Lea & Blanchard; 1846. p. 318
16. McGreevy PS, Miller FA. *Biography of Theodor Kocher, Surgery* 1969;65:990.





17. Kocher TE. Zur pathologie und therapie de kropfes.Dtsch ZChir (Leipzig)1874;4:417
18. Graves RJ. Newly observed affection of the thyroid gland infemales.Lond Med Surg J1835;7:516
19. Mayo CH. Surgery of the thyroid: observations on 5000 operations.JAMA1913;61:10
20. Halsted WS. The operative story of goiter: the author's operation.Johns Hopkins Hosp Rep1920;19:71
21. Takanashi Y, Honkura Y, Rodriguez-Vazquez JF, et al. Pyramidal lobe of the thyroid gland and the thyroglossal duct remnant: A study using human fetal sections. *Ann Anat.* 2015 Jan. 197:29-37
22. Guerra G, Cinelli M, Mesolella M, et al. Morphological, diagnostic and surgical features of ectopic thyroid gland: a review of literature. *Int J Surg.* 2014. 12 Suppl 1:S3-11
23. Johansson E, Andersson L, Ornros J, et al. Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. *Development.* 2015 Oct 15. 142 (20):3519-28.
24. Nilsson M, Fagman H. Mechanisms of thyroid development and dysgenesis: an analysis based on developmental stages and concurrent embryonic anatomy. *Curr Top Dev Biol.* 2013. 106:123-70.



25. Standring S, ed. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st ed. New York: Elsevier Limited; 2016. 618.
26. Henry JF. Applied embryology of the thyroid and parathyroid glands. Randolph GW, ed. *Surgery of the Thyroid and Parathyroid Glands*. Philadelphia: Saunders; 2003. 12-20.
27. Thompson NW, Eckhauser FE, Harness JK. The anatomy of primary hyperparathyroidism. *Surgery*. 1982 Nov. 92(5):814-21
28. Cummings CW, et al. Thyroid anatomy. Cummings CW, ed. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 3rd ed. St. Louis, Mo: Mosby; 1998. 2445-49.
29. Thyroid gland. Williams PL, Bannister LH, et al. *Gray's Anatomy*. 38th ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1995. 1891-6.
30. Naidoo D, Boon JM, Mieny CJ, et al. Relation of the external branch of the superior laryngeal nerve to the superior pole of the thyroid gland: an anatomical study. *Clin Anat*. 2007 Jul. 20(5):516-20
31. Reed AF. Relations of inferior laryngeal nerve to inferior thyroid artery. *Anatomical Record*. 1943. 85:17.
32. Gravante G, Delogu D, Rizzello A, et al. The Zuckerkandl tubercle. *Am J Surg*. 2007 Apr. 193(4):484-5.
33. Lennquist S: Thyroidectomy. In: Textbook of Endocrine Surgery, eds Clark OH and Duh QY, Philadelphia, WB Saunders Company, 1997; 147-153



34. Moosman DA, De Weese MS: The external laryngeal nerve as related to thyroidectomy. *Surg Gynecol Obstet.* 1968; 127(5): 1011-1016.
35. Coller FA, Boyden AM: The development of the technique of thyroidectomy. *Surg Gynecol Obstet.* 1937; 65: 495-504
36. Ellenhorn JDI, Shah JP, Brennan MF: Impact of therapeutic regional lymph node dissection for medullary carcinoma of the thyroid gland. *Surgery*, 1993; 114: 1078-1081
37. Núñez A, Bedregal P, Becerra C, Grob L F. [Neurodevelopmental assessment of patients with congenital hypothyroidism]. *Rev Med Chil.* 2017 Dec;145(12):1579-1587.
38. Schweizer U, Köhrle J. Function of thyroid hormone transporters in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jul;1830(7):3965-73
39. Mallya M, Ogilvy-Stuart AL. Thyrotropic hormones. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018 Jan;32(1):17-25.
40. Singer PA. Thyroiditis. Acute, subacute, and chronic. *Med Clin North Am.* 1991 Jan;75(1):61-77.
41. Clemens PC, Neumann RS. The Wolff-Chaikoff effect: hypothyroidism due to iodine application. *Arch Dermatol.* 1989 May;125(5):705.
42. Leung A, Pearce EN, Braverman LE. Role of iodine in thyroid physiology. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2010 Jul;5(4):593-602



43. Nguyen CT, Mestman JH. Postpartum Thyroiditis. *Clin Obstet Gynecol.* 2019 Jun;62(2):359-364
44. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):391-7.
45. Rizzo LFL, Mana DL, Serra HA. Drug-induced hypothyroidism. *Medicina (B Aires).* 2017;77(5):394-404.
46. Nayak B, Burman K. Thyrotoxicosis and thyroid storm. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006 Dec;35(4):663-86, vii.
47. Bogazzi F, Tomisti L, Di Bello V, Martino E. [Amiodarone-induced thyrotoxicosis]. *G Ital Cardiol (Rome).* 2017 Mar;18(3):219-229
48. Cooper DS. Antithyroid drugs. *N Engl J Med.* 2005 Mar 03;352(9):905-17.
49. Siegel RD, Lee SL. Toxic nodular goiter. Toxic adenoma and toxic multinodular goiter. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Mar;27(1):151-68
50. Frates MC, CB Benson, JW Charboneau, et al.: Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology.* 237:794-800 2005
51. Castro MR, H Gharib: Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med.* 142:926-931 2005
52. Bongarzone I, P Vigneri, L Mariani, et al.: RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: Correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 4:223-228 1998



53. Wells SA Jr, M Santoro: Update: The status of clinical trials with kinase inhibitors in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 99:1543-1555 2014
54. Garcia-Rostan G , Zhao H, RL Camp, et al.: ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 21:3226-3235 2003
55. Sherman SI: Thyroid carcinoma. *Lancet.* 361:501-511 2003
56. Kloos, RT, C Eng, DB Evans, et al.: Medullary thyroid cancer: Management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid.* 19:565-612 2009
57. Agbandje, M., S. Kajigaya, R. McKenna, N. S. Young, and M. G. Rossmann. 1994. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology* 203:106–115.
58. Anand, A., E. S. Gray, T. Brown, J. P. Clewley, and B. J. Cohen. 1987. Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. *N. Engl. J. Med.* 316:183–186.
59. Anderson, L. J., S. M. Gillespie, T. J. Torok, E. S. Hurwitz, C. J. Tsou, and G. W. Gary. 1990. Risk of infection following exposures to human parvovirus B19. *Behring Inst. Mitt.* 85:60–63.
60. Anderson, M. J., L. R. Davis, J. Hodgson, S. E. Jones, L. Murtaza, J. R. Pattison, C. E. Stroud, and J. M. White. 1982. Occurrence of infection with a parvovirus-like agent in children with sickle cell anaemia during a two year period. *J. Clin. Pathol.* 35:744–749.



61. Azzi, A., R. Fanci, S. Ciappi, K. Zakrzewska, and A. Bosi. 1993. Humanparvovirus B19 infection in bone marrow transplantation patients. *Am. J. Hematol.* 44:207–209.
62. Balfour, H. H. J. 1969. Erythema infectiosum (fifth disease). Clinical review and description of 91 cases seen in an epidemic. *Clin. Pediatr. (Philadelphia)* 8:721–727.
63. Dorsch, S., B. Kaufmann, U. Schaible, E. Prohaska, H. Wolf, and S. Modrow. 2001. The VP1-unique region of parvovirus B19: amino acid variability and antigenic stability. *J. Gen. Virol.* 82:191–199.
64. Simpson, K.E., Storch, G.A., Lee, C.K., Ward, K.E., Danon, S., Simon, C. M., et al. (2016). High frequency of detection by pcr of viral nucleic acid in the blood of infants presenting with clinical myocarditis. *Pediatr. Cardiol.* 37, 399–404.
65. Parvovirus B19 real-TM Quant, Sacace Biotechnologies Srl, Italy, <https://sacace.com/manuals.htm>, (accessed July 2020)
66. Chen AY and Qiu J, Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest, *Future Virol.* 2010 November; 5(6): 731–743.
67. Wang J, Zhang W, Liu H, Wang D, Wang W, Li Y, Wang Z, Wang L, Zhang W, Huang G, Parvovirus B19 infection associated with Hashimoto’s thyroiditis in adults, *Journal of Infection* (2010) 60, 360e370



68. Li Y, Wang J, Zhu G, Zhang X, Zhai H, Zhang W, et al. 2007. Detection of Parvovirus B19 Nucleic Acids and Expression of Viral VP1/VP2 Antigen in Human Colon Carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 102: 1489-1498.
69. Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Anderson A, Akre O. 2002. No association between human parvovirus B19 and testicular germ cell cancer. *J Gen Virol* 83:2321–2324
70. Kuethe F, Sigusch HH, Hilbig K, Tresselt C, Glck B, Egerer R, Figulla HR. 2007. Detection of viral genome in the myocardium: Lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 153:850–858.
71. Kuethe F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K, Schaal S, Kamvissi V, Bornstein SR, Schwanebeck U, Modrow S. 2009. Prevalence of Parvovirus B19 and Human Bocavirus DNA in the Heart of Patients with no Evidence of Dilated Cardiomyopathy or Myocarditis. *Clin Infect Dis* 49:1660–1666.
72. Mori K, Yoshida K. 2010. Viral infection in induction of Hashimoto's thyroiditis: A key player or just a bystander? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:418–424.
73. Molenaar-de Backer M.W.A., Russcher A., Kroes A.C.M., M.H.G.M. Koppelmana M.H.G.M., Lanfermeijer M., Zaaijer H.L., Detection of parvovirus



- B19 DNA in blood: Viruses or DNA remnants?, *Journal of Clinical Virology* 84 (2016) 19–23
74. Kwong N, Medici M, Angell TE, Liu X, Marqusee E, Cibas ES, Krane JF, Barletta JA, Kim MI, Larsen PR, Alexander EK, The Influence of Patient Age on Thyroid Nodule Formation, Multinodularity, and Thyroid Cancer Risk, *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Dec; 100(12): 4434–4440.
75. Dean DS, Gharib H, Epidemiology of Thyroid Nodules, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008 Dec; 22(6):901-11.
76. Cavallo A, Johnson DN, White MG, Siddiqui S, Antic T, Mathew M, Grogan RH, Angelos P, Kaplan EL, Cipriani NA, Thyroid Nodule Size at Ultrasound as a Predictor of Malignancy and Final Pathologic Size, *Thyroid* 2017 May; 27(5):641-650.
77. Lehmann HW, Lutterbuse N, Plentz A, et al. Association of parvovirus B19 infection and Hashimoto's thyroiditis in children. *Viral Immunol* 2008; 21, 379-383
78. Mori K, Munakata Y, Saito T, et al. Intrathyroidal persistence of human parvovirus B19 DNA in a patient with Hashimoto's thyroiditis. *J Infect* 2007; 55, e29-3
79. Mori K, Yoshida K, Ishii K, Morohoshi K, Nakagawa Y, Hoshikawa S, Ozaki H, Takahashi Y, Ito S. Experimental autoimmune thyroiditis in human parvovirus B19 transgenic mice. *Autoimmunity* 44(6):483-489, 2011





- 80.Symvoulakis EK, Zaravinos A, Panutsopoulos D, Zoras O, Papalambros E, Sigala F, Spandidos DA, Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer, Int J Biol Markers Jan-Mar 2007;22(1):12-8



