

**„VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT VII – INTERNAL MEDICINE II**

STREINU DIANA-RALUCA



PhD THESIS

**THE ROLE OF CYTOLOGICAL EVALUATION
IN THE DIAGNOSTIC ALGORITHM OF
THYROID NODULAR DISEASE**

ABSTRACT

Scientific Coordinator

PROF. UNIV. DR. STOIAN DANA LIANA

**Timișoara
2026**

INTRODUCTION

Fine-needle aspiration cytology (FNAC) represents the central diagnostic tool in the evaluation of thyroid nodules and plays a decisive role in guiding clinical management. Despite its established value, its diagnostic performance is influenced not only by cytomorphological interpretation but also by pre-analytical variables, including sampling technique, specimen adequacy, and methods of preservation.

A persistent limitation of FNAC is represented by indeterminate cytological categories, in which morphological overlap between benign and malignant lesions restricts diagnostic certainty. These categories frequently lead to additional investigations or surgical intervention performed primarily for diagnostic clarification. At the same time, conventional smear preparation may disrupt cellular architecture and introduce variability, while not being optimized for molecular testing.

In this context, the present research evaluates a commercial scaffold-based preservation system, CytoMatrix, designed to maintain structural integrity of cytological material and to support integration of molecular analysis. The study follows a translational approach, progressing from controlled experimental validation to clinical application, molecular feasibility, and assessment of diagnostic limitations.

GENERAL PART

The diagnostic approach to thyroid nodules integrates ultrasound-based risk stratification, cytological evaluation, and, in selected cases, molecular testing. While this framework has significantly improved clinical management, important limitations remain.

Fine-needle aspiration cytology, although highly specific, is inherently limited by its inability to assess invasive features and by the presence of indeterminate diagnostic categories. Sample adequacy represents a critical determinant of diagnostic yield, influenced by sampling conditions and pre-analytical handling.

Molecular testing has emerged as an adjunctive tool, particularly in indeterminate nodules, but its applicability depends on adequate preservation of nucleic acids.

Conventional cytological preparations, particularly smear-based methods, are not optimally suited for integrated molecular workflows.

Scaffold-based preservation systems aim to address these limitations by capturing aspirated material within a structured matrix and allowing processing in a formalin-fixed paraffin-embedded format. This approach facilitates preservation of cytomorphological detail while enabling ancillary testing, forming the conceptual basis for the present investigation.

STUDY I – EXPERIMENTAL EX VIVO ASSESSMENT OF CYTOMATRIX FOR THYROID FNAC SAMPLES

Objectives

The first study was conceived as a methodological validation step within the translational design of the thesis, aiming to evaluate the intrinsic diagnostic performance of the CytoMatrix scaffold system under controlled conditions. The primary objective was to determine whether scaffold-based preservation maintains cytomorphological detail and supports accurate cytological classification.

A secondary objective was to isolate the effect of the preservation method by minimizing confounding variables associated with in vivo sampling, thereby establishing the technical feasibility of the platform prior to clinical application.

Materials and Methods

This prospective ex vivo study included fifty patients undergoing total thyroidectomy for nodular thyroid disease. Following surgical excision, fine-needle aspiration was performed directly on the resected specimens, targeting nodules previously classified as EU-TIRADS 4 or 5.

Aspirated material was deposited onto the CytoMatrix scaffold, followed by formalin fixation and standard paraffin embedding. Sections obtained from the resulting blocks were stained and evaluated cytologically using criteria closely mirroring the Bethesda classification. Histopathological diagnosis served as the reference standard.

Results

All included cases (n = 50) yielded adequate material for evaluation. Histopathology identified 37 benign and 13 malignant lesions. CytoMatrix cytology showed high concordance, correctly classifying all 37 benign cases and 11 of 13 malignant lesions, with 2 malignant cases categorized as equivocal. This corresponded to a sensitivity of 84.61%, specificity of 100%, and an overall diagnostic accuracy of 96%, with no false-positive diagnoses observed. Morphologically, the scaffold preserved nuclear and cytoplasmic detail while supporting retention of architectural patterns, including microfollicular arrangements and cellular clustering, with features approaching histopathological organization.

Discussion

The findings indicate that CytoMatrix can provide reliable preservation of cytological features and supports accurate diagnostic interpretation. The absence of false-positive results suggests that the method does not promote overdiagnosis, which is particularly relevant in thyroid cytology.

The equivocal classification of two malignant cases reflects inherent diagnostic limitations rather than technical shortcomings, consistent with known challenges in lesions with overlapping features. The ex vivo design ensured optimal sampling and direct correlation with histopathology, although it does not fully replicate in vivo conditions.

Preservation of architectural relationships within the scaffold represents a relevant morphological feature, as such patterns are often disrupted in cytological preparations.

Conclusion

Consistent diagnostic performance and preservation of cytomorphological features were observed with CytoMatrix under controlled conditions. These findings support its technical feasibility and warrant further evaluation in clinical settings.

STUDY II – PROSPECTIVE CLINICAL VALIDATION OF THE CYTOMATRIX SCAFFOLD IN PREOPERATIVE THYROID FINE-NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY

Objective

The objective of this study was to evaluate the diagnostic performance of the CytoMatrix scaffold system in routine clinical practice and to directly compare its performance with conventional smear cytology. The study aimed to determine whether scaffold-based preservation maintains diagnostic reliability under real-world conditions and whether it introduces any systematic diagnostic bias.

Materials and Methods

This study was designed as a prospective paired clinical investigation including eighty patients with thyroid nodules who subsequently underwent surgical treatment. For each nodule, fine-needle aspiration procedure was performed, and the obtained material was divided for parallel processing using conventional smears and the CytoMatrix scaffold.

Smears were prepared and stained according to standard cytological protocols, while the material allocated to CytoMatrix was fixed in formalin and processed as formalin-fixed paraffin-embedded sections. Cytological evaluation for both methods followed the Bethesda classification system, with CytoMatrix-based interpretations aligned as closely as possible with Bethesda criteria. Scaffold-based cytological preparations are not yet supported by a standardized reporting system, and their interpretation currently relies on adaptation of established cytological criteria.

Final histopathological diagnosis served as the reference standard. Diagnostic performance indicators, including sensitivity, specificity, and overall accuracy, were calculated for each method. Agreement and discordance between the two preparation techniques were also assessed.

Results

All included cases underwent paired cytological evaluation and histopathological confirmation, with 57 benign and 23 malignant lesions identified on final diagnosis. Non-diagnostic results were observed in 9 smear cases, of which 5 were also non-diagnostic on CytoMatrix, while 4 cases were diagnostic only on CytoMatrix; no case showed adequacy on smears alone.

Agreement between CytoMatrix and smear-based cytology was observed in 61 of 80 cases (76.2%), with 19 discordant cases and no directional bias ($p = 1.000$). Diagnostic performance for CytoMatrix showed a sensitivity of 78.26%, specificity

of 96.49%, positive predictive value of 90.0%, negative predictive value of 91.67%, and overall accuracy of 91.25%. In comparison, smears demonstrated a sensitivity of 69.57%, specificity of 94.74%, positive predictive value of 84.21%, negative predictive value of 88.52%, and accuracy of 87.5%.

Receiver operating characteristic analysis showed comparable performance, with an AUC of 0.943 (95% CI: 0.867–0.982) for CytoMatrix and 0.921 (95% CI: 0.839–0.970) for smears ($p = 0.5910$). Morphologically, scaffold-based preparations preserved cytological detail and architectural relationships, supporting consistent classification across Bethesda categories without introducing systematic diagnostic bias.

Discussion

This study shows that CytoMatrix can maintain diagnostic performance comparable to conventional cytology when applied in a real clinical setting. The higher sensitivity observed with the scaffold-based method suggests a potential improvement in detection of malignant lesions, although the difference did not reach statistical significance.

The absence of directional asymmetry in discordant cases indicates that CytoMatrix does not introduce systematic overclassification or underclassification. Instead, the bidirectional nature of reclassification suggests that the two methods may capture complementary aspects of the same lesion, reflecting differences in material distribution and structural preservation.

The lower rate of non-diagnostic samples observed with CytoMatrix is a relevant practical finding, particularly in the context of limited or suboptimal aspirates. The ability of the scaffold to retain and concentrate cellular material may contribute to improved adequacy and more consistent evaluation.

From a clinical perspective, these findings support the interpretation that CytoMatrix can be integrated into routine practice without disrupting established diagnostic workflows. Its role is best understood as complementary to conventional cytology, with potential advantages in selected cases, particularly those characterized by low cellularity or architectural ambiguity.

At the same time, the study highlights that improvements in preservation do not eliminate the fundamental biological limitations of cytology. Diagnostic uncertainty

persists in indeterminate lesions, underscoring the need for integrated approaches combining morphology, clinical context, and ancillary testing.

Conclusion

CytoMatrix demonstrates diagnostic performance comparable to conventional smear cytology in routine clinical practice, with a tendency toward improved sensitivity and sample adequacy. The absence of systematic diagnostic bias supports its use as a complementary preservation method within the existing diagnostic algorithm of thyroid nodular disease.

STUDY III – INTEGRATED CYTOMORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS WITHIN THE SYNTHETIC THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLD-BASED CYTOMATRIX PLATFORM

Objectives

The objective of this study was to evaluate the feasibility of performing molecular analysis on CytoMatrix-preserved material and to determine whether cytological and molecular assessment can be integrated within a single diagnostic workflow. The study focused on nodules with indeterminate or suspicious cytology, where molecular testing has the greatest potential clinical impact.

Materials and Methods

This prospective study included thirty-three patients with thyroid nodules classified cytologically within Bethesda categories III, IV, and V, who subsequently underwent surgical treatment. Fine-needle aspiration material was processed using the CytoMatrix scaffold and embedded as formalin-fixed paraffin-embedded blocks.

10-micron sections were selected for DNA extraction, and molecular analysis was performed using real-time polymerase chain reaction targeting the BRAF V600E mutation. The adequacy of DNA samples was assessed based on predefined criteria, including concentration and amplification capability.

Cytological findings and molecular results were correlated with final histopathological diagnosis in order to evaluate the biological relevance of the detected mutations and the overall reliability of the integrated approach.

Results

In Study III, 33 cases met the inclusion criteria for molecular feasibility assessment, of which 30 of 33 (90%) yielded sufficient DNA for downstream analysis, with a mean DNA concentration of 5.68 ± 3.48 ng/ μ L (range 1.6–13.7 ng/ μ L). Among the DNA-adequate cases, histopathology identified 17 malignant lesions (56.7%) and 13 benign lesions (43.3%), including 10 papillary thyroid carcinomas, 6 follicular variants of papillary thyroid carcinoma, 1 medullary carcinoma, 11 nodular goiters, and 2 follicular adenomas. The BRAF V600E mutation was detected in 3 of 30 cases (10.0%), all corresponding to classic papillary thyroid carcinoma and all cytologically classified as Bethesda V, while no mutations were detected in benign lesions, follicular variant papillary carcinoma, or medullary carcinoma. Cytologically, the analyzed cases were distributed as 17 Bethesda III, 2 Bethesda IV, and 14 Bethesda V, with malignancy rates increasing across categories; all 14 Bethesda V nodules were malignant, whereas 4 of 17 Bethesda III nodules were malignant and none of the 2 Bethesda IV cases proved malignant. Overall, the findings showed that CytoMatrix-derived FFPE material supported preservation of diagnostic morphology together with successful DNA extraction and targeted molecular testing from the same specimen.

Discussion

The findings of this study demonstrate that CytoMatrix-preserved material can be suitable for molecular analysis, supporting the feasibility of integrating cytomorphological and genetic evaluation within a single sample. The high rate of DNA adequacy indicates that the scaffold-based preservation method maintains nucleic acid integrity sufficiently for routine molecular testing.

The restriction of BRAF mutation positivity to papillary thyroid carcinoma cases is consistent with established molecular patterns and supports the biological validity of the results. This concordance suggests that the preservation process does not introduce degradation or contamination that would compromise molecular interpretation.

An important aspect of this study is the observation that molecular analysis can be performed without compromising cytological evaluation. The use of formalin-fixed paraffin-embedded sections allows for sequential analysis from the same specimen, facilitating correlation between morphology and molecular findings.

However, the study also highlights inherent limitations. DNA yield and quality remain dependent on cellularity, particularly in indeterminate nodules where cellular content may be limited. In such cases, the absence of detectable mutations does not exclude malignancy, reflecting the well-known constraints of targeted molecular testing.

From a clinical perspective, the integration of molecular analysis within the CytoMatrix workflow represents a potential advantage, particularly in cases where conventional cytology alone does not provide definitive classification. At the same time, the results should be interpreted within the broader diagnostic context, without overreliance on a single molecular marker.

Conclusion

CytoMatrix enables successful molecular analysis from cytological material, supporting the integration of morphological and genetic evaluation within a unified diagnostic workflow. This approach is feasible in routine practice and may provide additional diagnostic value, particularly in indeterminate thyroid nodules.

STUDY IV – RIEDEL'S THYROIDITIS AS A DIAGNOSTIC CHALLENGE IN THYROID CYTOLOGY: A CASE-BASED ANALYSIS WITHIN THE CONTEXT OF CYTOMATRIX SAMPLE PROCESSING

Objectives

The objective of this study was to evaluate the limitations of cytological diagnosis, including scaffold-based preservation, in the context of a rare fibroinflammatory thyroid condition. The study aimed to determine to what extent advanced preservation techniques can compensate for reduced cellularity and altered tissue architecture, using Riedel's thyroiditis as a model of extreme fibrosis.

Case presentation

The study was conducted as a case-based analysis of a patient presenting with a clinically and radiologically suspicious thyroid process involving the entire gland, characterized by a hard, infiltrative mass with features suggestive of malignancy. Fine-needle aspiration was performed and the obtained material was processed using both conventional smear cytology and the CytoMatrix scaffold system.

Cytological evaluation followed standard criteria on conventional smears, while CytoMatrix samples were assessed using an adapted interpretative approach. Conventional smear cytology suggested a suspicious lesion, raising concern for malignancy, whereas the CytoMatrix preparation yielded markedly hypocellular material composed predominantly of fibrotic stroma with scarce epithelial elements.

Given the clinical suspicion of malignancy, surgical intervention was undertaken. Intraoperative frozen section analysis did not support malignancy and suggested Riedel's thyroiditis. This diagnosis was subsequently confirmed on definitive histopathological examination, which demonstrated dense fibrosis extending beyond the thyroid capsule with an associated chronic inflammatory infiltrate.

Discussion

This case illustrates a fundamental limitation of cytological diagnosis that is independent of the preservation method used. The extensive fibrosis characteristic of Riedel's thyroiditis significantly reduces the availability of follicular cells, which are essential for cytological interpretation. As a result, both conventional smears and scaffold-based preparations are constrained by the same biological limitation.

The discrepancy between smear-based suspicion and the hypocellular CytoMatrix findings reflects differences in material distribution rather than true diagnostic superiority of one method over the other. Smears may occasionally emphasize isolated atypical cells that raise suspicion, while scaffold-based processing may provide a more representative view of the overall low cellularity of the lesion.

Importantly, this case underscores that improvements in preservation and processing cannot compensate for the absence of representative cellular material. In such contexts, cytology alone is insufficient for definitive diagnosis, and additional diagnostic modalities, including intraoperative assessment and histopathological examination, become essential.

From a broader perspective, this study provides a necessary counterbalance to the preceding investigations by defining the limits of applicability of scaffold-based cytology. It reinforces the principle that diagnostic performance can be constrained by the biological characteristics of the lesion, rather than solely by technical factors.

Conclusion

Riedel's thyroiditis represents a model of intrinsic limitation for cytological diagnosis, in which severe fibrosis restricts cellular yield and compromises interpretability. CytoMatrix, while effective in preserving available material, does not fully overcome these inherent biological constraints. This finding emphasizes the need for integrated diagnostic approaches in complex thyroid pathology.

Final Conclusions and Personal Contributions

This doctoral research evaluated the diagnostic role of a three-dimensional commercial preservation platform (CytoMatrix) in thyroid fine-needle aspiration cytology through a structured approach including ex vivo assessment, prospective clinical application, molecular analysis, and evaluation of diagnostic limitations.

The ex vivo phase, based on a controlled model with direct cytology–histopathology correlation, showed that the CytoMatrix platform preserves cytomorphological detail and maintains architectural organization compatible with established diagnostic frameworks.

Prospective clinical evaluation indicated comparable diagnostic performance to conventional smear cytology, with similar specificity, balanced classification behavior, and no evidence of systematic diagnostic bias, supporting its use as a complementary approach within Bethesda-based interpretation.

In indeterminate nodules, particularly Bethesda III lesions, CytoMatrix showed potential to improve interpretative consistency through better preservation of architectural and spatial context, but without overcoming intrinsic limitations such as the inability to assess capsular or vascular invasion in follicular-patterned lesions.

DNA extraction from CytoMatrix-derived formalin-fixed paraffin-embedded material, followed by targeted molecular analysis, indicated that DNA of adequate quality can be obtained, supporting integration of morphological and molecular assessment from a single specimen.

Evaluation of extensively fibrosing pathology, exemplified by Riedel's thyroiditis, showed that diagnostic yield is constrained by cellular scarcity regardless of

preservation technique, highlighting the distinction between biological limitations and technical performance.

Integration of findings across experimental, clinical, and molecular stages supports a coherent interpretation of scaffold-based cytology, distinguishing its technical capabilities from biologically determined constraints.

Overall, CytoMatrix represents a technically feasible and diagnostically coherent adjunct in thyroid cytopathology, preserving architectural relationships in a histology-compatible format and supporting integration with molecular analysis while remaining aligned with established diagnostic frameworks.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINA
DEPARTAMENTUL VII – MEDICINĂ INTERNĂ II**

STREINU DIANA-RALUCA



TEZĂ DE DOCTORAT

**ROLUL EXAMENULUI CITOLOGIC
ÎN ALGORITMUL EVALUĂRII
BOLII NODULARE TIROIDIENE**

REZUMAT

Conducător de doctorat

STOIAN DANA LIANA

**Timișoara
2026**

INTRODUCERE

Punctia aspirativa cu ac fin (FNAC) reprezintă un instrument diagnostic central în evaluarea nodulilor tiroidieni și joacă un rol decisiv în ghidarea managementului clinic. În ciuda valorii sale consacrate, performanța diagnostică este influențată nu doar de interpretarea citomorfologică, ci și de variabile preanalitice, inclusiv tehnica de recoltare, calitatea probei și metodele de conservare.

O limitare persistentă a FNAC este reprezentată de categoriile citologice indeterminate, în care suprapunerea morfologică între leziunile benigne și cele maligne restricționează certitudinea diagnosticului. Aceste categorii conduc frecvent la investigații suplimentare sau la intervenții chirurgicale efectuate în principal în scop de clarificare diagnostică. În același timp, preparatele citologice convenționale de tip frotiu pot perturba arhitectura celulară și pot introduce variabilitate, nefiind optimizate pentru testare moleculară.

În acest context, prezenta cercetare evaluează un sistem comercial de conservare a materialului obținut prin FNAC, cunoscut sub denumirea de CytoMatrix, conceput pentru a menține integritatea structurală a materialului citologic și pentru a facilita integrarea analizei moleculare. Studiul urmează o abordare translatională, progresând de la validare experimentală controlată la aplicație clinică, evaluarea fezabilității moleculare și analiza limitărilor diagnostice.

PARTEA GENERALĂ

Abordarea diagnostică a nodulilor tiroidieni integrează stratificarea riscului bazată pe ecografie, evaluarea citologică și, în cazuri selectate, testarea moleculară. Deși acest cadru a îmbunătățit semnificativ managementul clinic, persistă limitări importante.

Citologia prin aspirație cu ac fin, deși prezintă o specificitate ridicată, este limitată în mod inerent de incapacitatea de a evalua caracteristicile de invazie și de prezența categoriilor diagnostice indeterminate. Calitatea probei reprezintă un determinant critic al randamentului diagnostic, fiind influențată de condițiile de recoltare și de manipularea preanalitică.

Testarea moleculară a apărut ca instrument adjuvant, în special în nodulii indeterminați, însă aplicabilitatea sa depinde de conservarea adecvată a acizilor nucleici. Preparatele citologice convenționale, în special cele bazate pe frotiuri, nu sunt optim adaptate pentru fluxuri integrate de analiză moleculară.

Sistemele de conservare de tipul CytoMatrixului urmăresc să depășească aceste limitări prin captarea materialului aspirat într-o matrice structurată și procesarea acestuia în format de tip formol-fixat și inclus în parafină (FFPE). Această abordare facilitează conservarea detaliilor citomorfologice și permite efectuarea testelor auxiliare, constituind baza conceptuală a prezentei cercetări.

STUDIUL I – EVALUAREA EXPERIMENTALĂ EX VIVO A SISTEMULUI CYTOMATRIX PENTRU PROBELE OBTINUTE PRIN PUNCȚIE TIROIDIANĂ

Obiective

Primul studiu a fost conceput ca o etapă de validare metodologică în cadrul designului translational al tezei, având ca scop evaluarea performanței diagnostice intrinseci a sistemului de tip CytoMatrix în condiții controlate. Obiectivul principal a fost de a determina dacă metoda de conservare bazată pe CytoMatrix menține detaliile citomorfologice și susține o clasificare citologică corectă.

Un obiectiv secundar a fost izolarea efectului metodei de conservare prin minimizarea variabilelor asociate recoltării in vivo, în vederea stabilirii fezabilității tehnice a platformei înainte de aplicarea clinică.

Material și metode

Acest studiu prospectiv ex vivo a inclus 50 de pacienți supuși tiroidectomiei totale pentru boală nodulară tiroidiană. După excizia chirurgicală, s-a efectuat aspirație cu ac fin direct pe piesele rezecate, fiind țintiți noduli anterior clasificați ca EU-TIRADS 4 sau 5.

Materialul aspirat a fost depus pe CytoMatrix, urmat de fixare în formol și includere standard în parafină. Secțiunile obținute din blocurile rezultate au fost colorate și evaluate citologic utilizând criterii care reflectă îndeaproape clasificarea Bethesda. Diagnosticul histopatologic a fost utilizat ca standard de referință.

Rezultate

Toate cazurile incluse (n = 50) au furnizat material adecvat pentru evaluare. Examinarea histopatologică a identificat 37 de leziuni benigne și 13 leziuni maligne. Citologia pe preparate CytoMatrix a demonstrat o concordanță ridicată, clasificând corect toate cele 37 de cazuri benigne și 11 din cele 13 cazuri maligne, 2 cazuri maligne fiind încadrate ca echivoce.

Aceste rezultate au corespuns unei sensibilități de 84,61%, unei specificități de 100% și unei acurateți diagnostice globale de 96%, fără a fi înregistrate rezultate fals pozitive. Din punct de vedere morfologic, CytoMatrix a permis conservarea detaliilor nucleare și citoplasmatică, precum și menținerea patternurilor arhitecturale, inclusiv aranjamente microfoliculare și agregate celulare, cu caracteristici apropiate de organizarea histopatologică.

Discuții

Rezultatele indică faptul că CytoMatrix asigură o conservare fiabilă a caracteristicilor citologice și susține o interpretare diagnostică corectă. Absența rezultatelor fals pozitive sugerează că metoda nu favorizează supradiagnosticarea, aspect deosebit de relevant în citologia tiroidiană.

Clasificarea echivocă a două cazuri maligne reflectă limitări diagnostice inerente, mai degrabă decât deficiențe tehnice, fiind în concordanță cu dificultățile cunoscute în leziunile cu caracteristici suprapuse. Designul ex vivo a asigurat condiții optime de recoltare și corelare directă cu histopatologia, însă nu reproduce în totalitate condițiile in vivo.

Păstrarea relațiilor arhitecturale în cadrul CytoMatrixului reprezintă un aspect morfologic relevant, întrucât aceste patternuri sunt frecvent alterate în preparatele citologice convenționale.

Concluzie

CytoMatrix a demonstrat performanță diagnostică constantă și capacitate de conservare a caracteristicilor citomorfologice în condiții controlate. Aceste rezultate susțin fezabilitatea tehnică a metodei și justifică evaluarea sa ulterioară în contexte clinice.

STUDIUL II – VALIDARE CLINICĂ PROSPECTIVĂ A SCAFFOLD-ULUI CYTOMATRIX ÎN CITOLOGIA PREOPERATORIE PRIN ASPIRAȚIE CU AC FIN TIROIDIANĂ

Obiective

Obiectivul acestui studiu a fost evaluarea performanței diagnostice a sistemului CytoMatrix în practica clinică de rutină și compararea directă a acesteia cu citologia convențională pe frotiuri. Studiul a urmărit să determine dacă metoda de conservare bazată pe scaffold menține fiabilitatea diagnostică în condiții reale și dacă introduce un bias diagnostic sistematic.

Material și metode

Acest studiu a fost conceput ca o investigație clinică prospectivă de tip pereche, incluzând 80 de pacienți cu noduli tiroidieni care au fost ulterior supuși tratamentului chirurgical. Pentru fiecare nodul, s-a efectuat aspirație cu ac fin, iar materialul obținut a fost divizat pentru procesare paralelă prin metoda convențională pe frotiuri și prin utilizarea scaffold-ului CytoMatrix.

Frotiurile au fost preparate și colorate conform protocoalelor citologice standard, în timp ce materialul alocat CytoMatrix a fost fixat în formol și procesat sub formă de secțiuni incluse în parafină (FFPE). Evaluarea citologică pentru ambele metode a urmat sistemul de clasificare Bethesda, interpretările bazate pe CytoMatrix fiind aliniate cât mai fidel criteriilor Bethesda. Preparatele citologice bazate pe scaffold nu sunt încă susținute de un sistem standardizat de raportare, iar interpretarea lor se bazează în prezent pe adaptarea criteriilor citologice consacrate.

Diagnosticul histopatologic final a fost utilizat ca standard de referință. Pentru fiecare metodă au fost calculați indicatorii de performanță diagnostică, inclusiv sensibilitatea, specificitatea și acuratețea globală. De asemenea, au fost evaluate concordanța și discordanța dintre cele două tehnici de preparare.

Rezultate

Toate cazurile incluse au beneficiat de evaluare citologică pereche și confirmare histopatologică, fiind identificate 57 de leziuni benigne și 23 de leziuni maligne.

Rezultate non-diagnostice au fost observate în 9 cazuri evaluate pe frotiuri, dintre care 5 au fost de asemenea non-diagnostice pe CytoMatrix, în timp ce 4 cazuri au fost diagnostice exclusiv pe CytoMatrix; niciun caz nu a fost adecvat doar pe frotiuri.

Concordanța între citologia pe CytoMatrix și cea pe frotiuri a fost observată în 61 din 80 de cazuri (76,2%), cu 19 cazuri discordante și fără bias direcțional ($p = 1,000$). Performanța diagnostică pentru CytoMatrix a evidențiat o sensibilitate de 78,26%, o specificitate de 96,49%, o valoare predictivă pozitivă de 90,0%, o valoare predictivă negativă de 91,67% și o acuratețe globală de 91,25%. În comparație, frotiurile au prezentat o sensibilitate de 69,57%, o specificitate de 94,74%, o valoare predictivă pozitivă de 84,21%, o valoare predictivă negativă de 88,52% și o acuratețe de 87,5%.

Analiza curbei ROC a evidențiat performanțe comparabile, cu o arie de sub curbă (AUC) de 0,943 (IC 95%: 0,867–0,982) pentru CytoMatrix și 0,921 (IC 95%: 0,839–0,970) pentru frotiuri ($p = 0,5910$). Din punct de vedere morfologic, preparatele bazate pe CytoMatrix au conservat detaliile citologice și relațiile arhitecturale, susținând o clasificare consistentă în cadrul categoriilor Bethesda, fără introducerea unui bias diagnostic sistematic.

Discuții

Acest studiu arată că CytoMatrix poate menține o performanță diagnostică comparabilă cu citologia convențională atunci când este utilizat în condiții clinice reale. Sensibilitatea mai mare observată în cazul metodei bazate pe CytoMatrix sugerează o posibilă îmbunătățire în detectarea leziunilor maligne, deși diferența nu a atins semnificație statistică.

Absența asimetriei direcționale în cazurile discordante indică faptul că CytoMatrix nu introduce o tendință sistematică de supra- sau subclasificare. Caracterul bidirecțional al reclasificării sugerează că cele două metode pot surprinde aspecte complementare ale aceleiași leziuni, reflectând diferențe în distribuția materialului și în conservarea structurii.

Rata mai scăzută a probelor non-diagnostice observată în cazul CytoMatrix reprezintă un aspect practic relevant, în special în contextul aspiratelor cu celularitate redusă sau suboptimă. Capacitatea CytoMatrixului de a reține și

concentra materialul celular poate contribui la îmbunătățirea calității probelor și la o evaluare mai consistentă.

Din perspectivă clinică, aceste rezultate susțin ideea că CytoMatrix poate fi integrat în practica de rutină fără a perturba fluxurile diagnostice existente. Rolul său este cel mai bine înțeles ca fiind complementar citologiei convenționale, cu potențiale avantaje în cazuri selectate, în special cele caracterizate prin celularitate redusă sau ambiguitate arhitecturală.

În același timp, studiul evidențiază faptul că îmbunătățirile în metodele de conservare nu elimină limitările biologice fundamentale ale citologiei. Incertitudinea diagnostică persistă în leziunile indeterminate, subliniind necesitatea unor abordări integrate care să combine morfologia, contextul clinic și testele auxiliare.

Concluzie

CytoMatrix demonstrează o performanță diagnostică comparabilă cu citologia convențională pe frotiuri în practica clinică de rutină, cu o tendință către îmbunătățirea sensibilității și a calității probelor. Absența unui bias diagnostic sistematic susține utilizarea sa ca metodă de conservare complementară în cadrul algoritmului diagnostic existent al bolii nodulare tiroidiene.

STUDIUL III – ANALIZA INTEGRATĂ CITOMORFOLOGICĂ ȘI MOLECULARĂ ÎN CADRUL PLATFORMEI CYTOMATRIX

Obiective

Obiectivul acestui studiu a fost evaluarea fezabilității efectuării analizei moleculare pe material conservat prin CytoMatrix și determinarea posibilității integrării evaluării citologice și moleculare într-un flux diagnostic unic. Studiul s-a concentrat pe noduli cu citologie indeterminată sau suspectă, în care testarea moleculară are cea mai mare relevanță clinică.

Material și metode

Acest studiu prospectiv a inclus 33 de pacienți cu noduli tiroidieni încadrați citologic în categoriile Bethesda III, IV și V, care au fost ulterior supuși tratamentului chirurgical. Materialul obținut prin aspirație cu ac fin a fost procesat utilizând scaffold-ul CytoMatrix și inclus sub formă de blocuri fixate în formol și incluse în parafină (FFPE).

Secțiuni de 10 micrometri au fost selectate pentru extracția ADN-ului, iar analiza moleculară a fost realizată prin reacție de polimerizare în lanț în timp real (real-time PCR), având ca țintă mutația BRAF V600E. Calitatea probelor de ADN a fost evaluată pe baza unor criterii predefinite, incluzând concentrația și capacitatea de amplificare.

Rezultatele citologice și moleculare au fost corelate cu diagnosticul histopatologic final, în vederea evaluării relevanței biologice a mutațiilor detectate și a fiabilității globale a abordării integrate.

Rezultate

În cadrul Studiului III, 33 de cazuri au îndeplinit criteriile de includere pentru evaluarea fezabilității moleculare, dintre care 30 din 33 (90%) au furnizat ADN suficient pentru analiza ulterioară, cu o concentrație medie de $5,68 \pm 3,48$ ng/ μ L (interval 1,6–13,7 ng/ μ L).

Dintre cazurile cu ADN adecvat, examenul histopatologic a identificat 17 leziuni maligne (56,7%) și 13 leziuni benigne (43,3%), incluzând 10 carcinoame papilare tiroidiene, 6 variante foliculare ale carcinomului papilar tiroidian, 1 carcinom medular, 11 guși nodulare și 2 adenoame foliculare.

Mutația BRAF V600E a fost detectată în 3 din 30 de cazuri (10,0%), toate corespunzând carcinomului papilar tiroidian clasic și toate fiind încadrate citologic în categoria Bethesda V. Nu au fost identificate mutații în leziunile benigne, în varianta foliculară a carcinomului papilar sau în carcinomul medular.

Din punct de vedere citologic, cazurile analizate au fost distribuite astfel: 17 Bethesda III, 2 Bethesda IV și 14 Bethesda V, cu o creștere a ratei de malignitate între categorii; toți cei 14 noduli Bethesda V au fost maligni, în timp ce 4 din 17 noduli Bethesda III au fost maligni, iar niciunul dintre cele 2 cazuri Bethesda IV nu s-a dovedit malign.

În ansamblu, rezultatele au arătat că materialul FFPE derivat din CytoMatrix permite conservarea morfologiei diagnostice, împreună cu extracția eficientă a ADN-ului și realizarea testării moleculare țintite din același specimen.

Discuții

Rezultatele acestui studiu demonstrează că materialul conservat prin CytoMatrix este adecvat pentru analiza moleculară, susținând fezabilitatea integrării evaluării citomorfologice și genetice în cadrul aceleiași probe. Rata ridicată de extracție cu succes a ADN-ului indică faptul că metoda de conservare bazată pe CytoMatrix menține integritatea acizilor nucleici la un nivel suficient pentru testare moleculară.

Limitarea pozitivității mutației BRAF la cazurile de carcinom papilar tiroidian este în concordanță cu profilele moleculare cunoscute și susține validitatea biologică a rezultatelor. Această concordanță sugerează că procesul de conservare nu introduce degradare sau contaminare care ar putea compromite interpretarea moleculară.

Un aspect important al studiului este observația că analiza moleculară poate fi efectuată fără a compromite evaluarea citologică. Utilizarea secțiunilor incluse în parafină permite analiza secvențială din același specimen, facilitând corelarea dintre morfologie și rezultatele moleculare.

Cu toate acestea, studiul evidențiază și limitări inerente. Randamentul și calitatea ADN-ului rămân dependente de celularitate, în special în nodulii indeterminați, unde conținutul celular poate fi redus. În astfel de cazuri, absența mutațiilor detectabile nu exclude malignitatea, reflectând limitările bine cunoscute ale testării moleculare țintite.

Din perspectivă clinică, integrarea analizei moleculare în fluxul CytoMatrix reprezintă un potențial avantaj, în special în cazurile în care citologia convențională nu permite o clasificare definitivă. Totodată, rezultatele trebuie interpretate în context diagnostic larg, evitând supraevaluarea unui singur marker molecular.

Concluzie

CytoMatrix permite realizarea cu succes a analizei moleculare pe material citologic, susținând integrarea evaluării morfologice și genetice într-un flux diagnostic unificat. Această abordare este fezabilă în practica de rutină și poate aduce valoare diagnostică suplimentară, în special în nodulii tiroidieni indeterminați.

STUDIUL IV – TIROIDITA RIEDEL CA PROVOCARE DIAGNOSTICĂ ÎN CITOLOGIA TIROIDIANĂ: ANALIZĂ DE CAZ ÎN CONTEXTUL PROCESĂRII PROBELOR PRIN CYTOMATRIX

Obiective

Obiectivul acestui studiu a fost evaluarea limitărilor diagnosticului citologic, inclusiv în contextul conservării bazate pe CytoMatrix, în cadrul unei afecțiuni tiroidiene fibroinflamatorii rare. Studiul a urmărit să determine în ce măsură tehnici avansate de conservare pot compensa celularitatea redusă și arhitectura tisulară alterată, utilizând tiroidita Riedel ca model de fibroză extremă.

Prezentare de caz

Studiul a fost realizat sub forma unei analize de caz, având ca obiect o pacientă cu o patologie tiroidiană suspectă din punct de vedere clinic și imagistic, implicând întreaga glandă, caracterizată printr-o masă dură, infiltrativă, cu trăsături sugestive pentru malignitate. S-a efectuat puncție aspirativă cu ac fin, iar materialul obținut a fost procesat atât prin citologie convențională pe frotiuri, cât și utilizând sistemul CytoMatrix.

Evaluarea citologică a urmat criteriile standard pe frotiurile convenționale, în timp ce probele CytoMatrix au fost analizate utilizând o abordare interpretativă adaptată. Citologia pe frotiuri a sugerat o leziune suspectă, ridicând suspiciunea de malignitate, în timp ce preparatul CytoMatrix a evidențiat material marcat hipocelular, compus predominant din stromă fibroasă, cu elemente foliculare rare.

Având în vedere suspiciunea clinică de malignitate, s-a decis intervenția chirurgicală. Examenul extemporanu intraoperator nu a susținut malignitatea și a

sugerat diagnosticul de tiroidită Riedel. Acest diagnostic a fost ulterior confirmat prin examen histopatologic definitiv, care a evidențiat fibroză densă extinsă dincolo de capsula tiroidiană, asociată cu infiltrat inflamator cronic.

Discuții

Acest caz ilustrează o limitare fundamentală a diagnosticului citologic, independentă de metoda de conservare utilizată. Fibroza extensivă caracteristică tiroiditei Riedel reduce semnificativ disponibilitatea celulelor foliculare, esențiale pentru interpretarea citologică. Ca urmare, atât frotiurile convenționale, cât și preparatele bazate pe scaffold sunt supuse aceleiași limitări biologice.

Discrepanța dintre suspiciunea bazată pe frotiuri și rezultatele hipocelulare obținute prin CytoMatrix reflectă diferențe în distribuția materialului, mai degrabă decât o superioritate diagnostică reală a uneia dintre metode. Frotiurile pot evidenția ocazional celule atipice izolate care generează suspiciune, în timp ce procesarea pe CytoMatrix oferă o imagine mai reprezentativă a celularității globale reduse.

Acest caz subliniază faptul că îmbunătățirile în metodele de conservare și procesare nu pot compensa absența unui material celular reprezentativ. În astfel de situații, citologia singură este insuficientă pentru stabilirea unui diagnostic definitiv, fiind necesare metode diagnostice suplimentare, inclusiv evaluarea intraoperatorie și examenul histopatologic.

Dintr-o perspectivă mai largă, acest studiu oferă un contrapunct necesar investigațiilor anterioare, prin definirea limitelor de aplicabilitate ale citologiei bazate pe CytoMatrix. El reafirmă principiul conform căruia performanța diagnostică poate fi limitată de caracteristicile biologice ale leziunii, și nu exclusiv de factori tehnici.

Concluzie

Tiroidita Riedel reprezintă un model de limitare intrinsecă a diagnosticului citologic, în care fibroza severă reduce randamentul celular și compromite interpretabilitatea. CytoMatrix, deși eficient în conservarea materialului disponibil, nu depășește complet aceste constrângeri biologice. Acest aspect evidențiază necesitatea unor abordări diagnostice integrate în patologia tiroidiană complexă.

Concluzii finale și contribuții personale

Această cercetare doctorală a analizat rolul diagnostic al unei platforme comerciale tridimensionale de preservare celulară (CytoMatrix) în citologia prin aspirație cu ac fin a tiroidei, printr-o abordare etapizată care a inclus evaluare ex vivo, aplicare clinică prospectivă, analiză moleculară și studierea limitărilor diagnostice.

Evaluarea ex vivo, realizată într-un cadru controlat cu corelare directă citologie–histopatologie, a evidențiat capacitatea platformei CytoMatrix de a conserva atât detaliile citomorfologice, cât și organizarea arhitecturală, într-un mod compatibil cu criteriile diagnostice utilizate în practică.

În context clinic, integrarea prospectivă a platformei CytoMatrix a arătat o performanță diagnostică similară citologiei convenționale pe frotiu, cu menținerea specificității și fără tendințe sistematice de supra- sau subclasificare. Aceste rezultate susțin utilizarea sa ca metodă complementară în cadrul sistemului Bethesda.

În cazul nodulilor cu citologie indeterminată, în special Bethesda III, utilizarea platformei CytoMatrix a sugerat o mai bună consistență a interpretării prin păstrarea contextului arhitectural și a relațiilor spațiale celulare. Totuși, această abordare nu depășește limitările intrinseci ale citologiei, în special imposibilitatea evaluării invaziei capsulare sau vasculare în leziunile cu pattern folicular.

Analiza moleculară, realizată pe material derivat din CytoMatrix și procesat în blocuri de tip FFPE, a arătat că se poate obține ADN de calitate adecvată pentru testare țintită, susținând posibilitatea unei evaluări integrate morfologice și moleculare din același specimen.

Studiul leziunilor extensiv fibrozante, ilustrat de tiroidita Riedel, a evidențiat limitele biologice ale citologiei, arătând că în condiții de celularitate redusă, randamentul diagnostic este limitat indiferent de metoda de procesare. Acest aspect subliniază faptul că tehnicile avansate de conservare pot optimiza utilizarea materialului disponibil, dar nu pot compensa absența substratului celular.

Prin corelarea rezultatelor obținute în etapele experimentale, clinice și moleculare, lucrarea oferă o imagine integrată asupra utilizării platformei CytoMatrix în

citologia tiroidiană, delimitând clar performanța tehnică de constrângerile impuse de caracteristicile biologice ale leziunilor. În ansamblu, CytoMatrix se conturează ca un instrument complementar în citopatologia tiroidiană, capabil să conserve relațiile arhitecturale într-un format compatibil cu histologia și să faciliteze integrarea cu analiza moleculară, fără a modifica paradigmele diagnostice existente.