

**Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i
Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim**
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku



Mariusz Rogucki

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Określenie profilu ekspresji oraz znaczenia
diagnostycznego microRNA w raku brodawkowatym
tarczycy**

Promotor

dr hab. n. med. Anna Popławska-Kita
*Klinika Endokrynologii, Diabetologii
i Chorób Wewnętrznych*
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Mentor

dr hab. n. med. Anna Wójcicka
Warsaw Genomics

Białystok 2022

Projekt pn. „Krajowe Międzysektorowe Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, nr POWR.03.02.00-00-I050/16-00.

*Chciałbym złożyć serdeczne podziękowanie Promotor
mojej pracy doktorskiej*

Pani dr hab. n. med. Annie Popławskiej-Kita

*za okazaną pomoc, wyrozumiałość, cierpliwość
oraz życzliwość*

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ.....	4
2. ZESTAWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	5
3. OŚWIADCZENIE O WDROŻENIOWYM CHARAKTERZE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	6
4. WYKAZ SKRÓTÓW.....	7
5. WSTĘP DOTYCZĄCY TEMATYKI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	8
6. OMÓWIENIE PRAC SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ.....	10
6.1. Cele pracy.....	10
6.2. Praca przeglądowa podsumowująca tematykę rozprawy doktorskiej.....	10
6.2.1. Materiał i metody.....	10
6.2.2. Wnioski.....	10
6.3. Publikacje oryginalne.....	11
6.3.1. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	11
6.3.2.1. Materiał badany.....	12
6.3.2.2. Oznaczenia laboratoryjne.....	12
6.3.2.3. Analiza statystyczna.....	12
6.3.3. Wyniki.....	13
6.3.4. Omówienie wyników.....	18
6.3.5. Wniosek.....	20
7. KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	20
8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	49
9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	50
10. PIŚMIENNICTWO.....	51
11. SUPLEMENT.....	53
11.1. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu każdego z nich oraz oświadczenia o zgodzie na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej.....	53
12. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	73

1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ
DOKTORSKĄ

Praca przeglądowa:

1. Mariusz Rogucki, Angelika Buczyńska, Adam Jacek Krętowski,
Anna Popławska-Kita
**The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis
of Papillary Thyroid Cancer**
Journal of Clinical Medicine, 2021,
10(20), 4738. Doi:
10.3390/jcm10204738
IF = 4.242; MNiSW = 140

Praca oryginalna:

1. Mariusz Rogucki, Iwona Sidorkiewicz, Magdalena Niemira, Janusz
Bogdan Dziecioł, Angelika Buczyńska, Agnieszka Adamska,
Katarzyna Siewko, Maria Kościuszko, Katarzyna Maliszewska,
Anna Wójcicka, Jakub Supronik, Małgorzata Szelachowska, Joanna
Reszeć, Adam Jacek Krętowski, Anna Popławska-Kita
**Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs
in Papillary Thyroid Cancer**
Cancers, 2022, 14(11), 2679. Doi:
10.3390/cancers14112679
IF = 6.639; MNiSW = 140

2. ZESTAWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	2	10,88	280
Prace niewłączone do rozprawy doktorskiej	1	4,38	140
Streszczenia zjazdowe	3	0	0
Razem	6	15,26	420

3. OŚWIADCZENIE O WDROŻENIOWYM CHARAKTERZE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Białystok, 15.06.2022

Lek. Mariusz Rogucki
IV rok
Międzysektorowe Studia Doktoranckie
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

W toku przeprowadzonych badań w ramach realizacji pracy doktorskiej pt. „Określenie profilu ekspresji oraz znaczenia diagnostycznego microRNA w raku brodawkowatym tarczycy” uzyskano wyniki pozwalające nadać pracy charakter wdrożeniowy.

W trakcie pracy zidentyfikowano 10 microRNA, które są deregulowane w raku brodawkowatym tarczycy: miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-222-3p, miR-34a-5p, miR-551b-3p, miR152-3p , miR-15a-5p, miR31-5p, miR-7-5p (FDR<0,05). Połączenie miR152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p, oraz miR-7-5p może być przydatne jako panel diagnostyczny w raku brodawkowatym tarczycy (AUC=0,841).

Rogucki Mariusz
dr hab. med. Anna Popławska-Kita
specjalista chorób wewnętrznych
endokrynolog, diabetolog
9473214

4. WYKAZ SKRÓTÓW

RBT – rak brodawkowy tarczycy

RT – rak tarczycy

miRNA - microRNA

AUC – ang. *Area Under Curve* – pole pod krzywą charakterystyki

ROC – ang. *Receiver Operating Characteristic*, krzywa charakterystyki

PCR – ang. *Polymerase Chain Reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy

TNM – ang. *Tumor-Nodus-Metastases* – klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworu

FC – ang. *Fold Change* – stopień wielkości zmiany między pomiarami

BACC – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana

PPI – ang. *Protein-Protein Interaction* – sieć oddziaływań między białkami

FDR – ang. *False Discovery Rate* – wskaźnik fałszywych odkryć

5. WSTĘP DOTYCZĄCY TEMATYKI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowalności na raka tarczycy (RT) [1], który jest najczęstszym nowotworem złośliwym wśród guzów endokrynych [2]. Szacowana zdiagnozowana ilość przypadków raka tarczycy w 2020 na całym wyniosła 586 000 [3]. Zgodnie z danymi Krajowego Rejestru Nowotworów, w Polsce w 2019 roku odnotowano ogólnie 4248 przypadków nowotworów złośliwych tarczycy. Na podstawie zmian demograficznych w zakresie zachorowalności i umieralności oczekuje się, że RT zastąpi raka jelita grubego jako czwarty najczęstszy nowotwór rozpoznawany w USA w 2030 roku [4]. Rak brodawkowaty tarczycy (RBT) stanowi 80-85% wszystkich nowotworów złośliwych tego narządu [5]. Wzrost wykrywalności RBT w ostatnich latach powiązany jest w szczególności z poprawą diagnostyki małych zmian ogniskowych uwidocznionych w badaniach obrazowych [6]. RBT jest nowotworem o dobrym rokowaniu [7], jednak nawet w około 30-80% przebiega z przerzutami do lokalnych węzłów chłonnych szyjnych [8], a około 10% pacjentów może mieć stwierdzone przerzuty do narządów odległych [9]. Jednocześnie należy podkreślić, że około 30% pacjentów doświadcza nawrotu RBT po przebytym leczeniu radykalnym [10].

Jedną z podstawowych, powszechnie stosowanych procedur w screeningu RBT jest badanie ultrasonograficzne. Zmiany ogniskowe uwidacznia się u około 68% pacjentów, u których wykonano USG tarczycy [11]. Złotym standardem w wykrywaniu RBT pozostaje jednak biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana (BACC) pod kontrolą USG [12]. BACC charakteryzuje się niskim ryzykiem powikłań, wysoką czułością i swoistością, jest procedurą stosunkowo niedrogą oraz małoinwazyjną [13]. Jednak, w zależności od doświadczenia ośrodka, nawet 10% przeprowadzonych BACC jest niediagnostycznych [14]. Ponadto BACC nie dostarcza pełnych informacji o klinicznym charakterze guza, takich jak np. obecność angioinwazji czy naciekania torebki, które mogą mieć wpływ na prognozę i dalsze postępowanie z chorym [15]. Z tego powodu postuluje się poszukiwanie nowych molekularnych biomarkerów RBT, których wczesna identyfikacja będzie miała wpływ na podejmowanie adekwatnych spersonalizowanych decyzji terapeutycznych [16,17,18].

miRNA są małymi, niekodującymi cząsteczkami RNA, które składają się z około 21-23 nukleotydów [19]. Cząsteczki miRNA występują powszechnie w świecie roślin oraz zwierząt [20] i są zaangażowane w regulację transkrypcyjnej ekspresji genów [21]. Dojrzałe miRNA odgrywają ważną rolę w procesie powstawania nowotworów i rozwijają się jako onkogeny lub supresory nowotworów [22]. Ekspresja miRNA jest skorelowana z proliferacją komórek, ich różnicowaniem, inwazyjnością oraz ma wpływ na proces apoptozy oraz przerzutowanie do

węzłów chłonnych i narządów odległych [23]. Ważną cechą miRNA jest jego trwałość w materiale biologicznym. Może być z powodzeniem izolowane z archiwizowanych parafinowych bloczków [24], jak również z osocza [25] oraz surowicy [26]. miRNA może być oznaczane przy użyciu techniki Sekwencjonowania Nowej Generacji, przy pomocy mikromacierzy miRNA, metody Northern Blot oraz RT-PCR [27]. Oznaczenie dysregulowanych miRNA może służyć jako nowy klinicznie znaczący biomarker diagnostyczny i prognostyczny dla różnych typów nowotworów [18].

Dotychczas opisano wiele miRNA, których ekspresja jest zaburzona w RBT. Jednymi z najlepiej poznanych miRNA są: miR-221, miR-222, miR-146b, miR-21, miR-181b [28]. Dostępne dane literaturowe wskazują na istnienie związku między ekspresją różnych miRNA, a ostateczną klasyfikacją TNM [29]. miR-146a oraz miR-146b mają modulujący wpływ na układ immunologiczny oraz zmniejszają posttranskrypcyjną ekspresję genów [30]. W RBT ekspresja miR-146b może być prawie 30 razy większa w porównaniu do tkanek nieobjętych procesem nowotworowym [31]. miR-221 i miR-222 są w wysokim stopniu homologiczne, ich nadekspresja została wykazana również w wielu innych nowotworach [32]. Nasiloną ekspresja miR-221 i miR-222 wiąże się ze zwiększonymi rozmiarami guza nowotworowego, większą skłonnością do naciekania naczyń krwionośnych, tkanek otaczających oraz przerzutowania do węzłów chłonnych i narządów odległych [33]. Z kolei zmniejszenie ekspresji miR-181b hamuje podział komórek, a jego nadekspresja znacząco zwiększa ryzyko nawrotu choroby nowotworowej oraz przerzutów do węzłów chłonnych [34]. W jednym z badań wykazano, że nadekspresja miR-21 i wspomnianego wcześniej miR-141b jest spowodowana brakiem metylacji DNA, co przekłada się na zaburzenie procesów transkrypcji i w efekcie promowanie proliferacji komórek nowotworowych [35]. Przeprowadzono wiele badań mających na celu znalezienie miRNA, które mogłyby zwiększyć czułość i swoistość BACC. W jednym z badań wykazano użyteczność panelu miRNA składającego się łącznie z miR-146b, miR-221, miR-222 w diagnozowaniu RBT przy pomocy BACC [36]. Z kolei *Mahmoudian-Sani* i wsp. wykazali, że miR-181b w połączeniu z miR-146b mogą być użyteczne w różnicowaniu zmian łagodnych oraz złośliwych [37].

Dotychczas przeprowadzone badania proponują określone zestawy miRNA, które mogłyby być użyteczne w procesie diagnostycznym RBT. Jednak istnieją niespójności, które wynikają z małej ilości tkanek włączonych do badania, niejednorodnych cech choroby oraz różnych metod przetwarzania danych. Włączenie panelu miRNA w proces diagnostyczny RBT wpisuje się w trend medycyny spersonalizowanej. Może również pozwolić na podejmowanie

bardziej adekwatnych decyzji diagnostycznych oraz terapeutycznych w wątpliwych przypadkach.

6. OMÓWIENIE PRAC SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

6.1. Cele pracy

Celem mojej pracy jest identyfikacja molekularnego panelu diagnostycznego opartego o badanie genetyczne, który może być użyteczny w procesie diagnostycznym raka brodawkowatego tarczycy.

1. Przeprowadzenie analizy bioinformatycznej w celu identyfikacji genów zaangażowanych w patogenezę raka brodawkowatego tarczycy.
2. Ocena przydatności poszczególnych miRNA w diagnostyce RBT.

6.2 Praca przeglądowa podsumowująca tematykę rozprawy doktorskiej

- „The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer”

6.2.1 Materiał i metody

Pracę przeglądową napisano w oparciu o 79 pozycji literaturowych, opublikowanych w latach 2007-2021. Do wyszukiwania artykułów użyto bazy PubMed oraz Scopus. W szczególności uwzględniono publikacje, które poruszały tematykę znaczenia miRNA w diagnostyce RBT. W tym celu, aby ocenić przydatność diagnostyczną potencjalnych biomarkerów RBT, wzięto pod uwagę wartości pola pod krzywą (AUC) na podstawie krzywych charakterystyki (ROC). Uwzględniono również znaczenie miRNA w prognozie przebiegu RBT.

6.2.2. Wnioski

miRNA ma szansę stać się nowym biomarkerem zarówno diagnostycznym, jak i prognozującym przebieg RBT. W ostatnich latach obserwuje się wzrost ilości badań nad znaczeniem poszczególnych miRNA w rozwoju nowotworów złośliwych tarczycy, ale też innych narządów. Występowanie miRNA w tkankach, osoczu i surowicy daje szansę na powszechniejsze stosowanie badań molekularnych w chorobach rozrostowych. Dokładniejsze poznanie patomechanizmów działania miRNA w RBT może pozwolić na opracowanie nowych skuteczniejszych metod diagnostyki i leczenia, szczególnie nowotworów o agresywnym przebiegu. Dostępne dane literaturowe wskazują, że ocena ekspresji miRNA ma duży potencjał w diagnostyce RBT. Jednak małe grupy chorych biorących udział w przeprowadzanych badaniach, często niejednorodne cechy choroby powodują, że jest potrzeba wykonania

dalszych badań mających na celu zidentyfikowanie potencjalnego panelu diagnostycznego miRNA w RBT. W przyszłości wprowadzenie oznaczenia ekspresji miRNA do procedur diagnostycznych RBT poprawi różnicowanie między zmianami łagodnymi, potencjalnie złośliwymi i złośliwymi. Jednym z ograniczeń zastosowania pomiarów miRNA w rutynowym i codziennym postępowaniu klinicznym jest ich kosztochłonność; jednocześnie jednak ceny tych oznaczeń stale spadają wraz z rozwojem medycyny genetycznej. Oznaczenie miRNA w procedurach postępowania klinicznego będą w przyszłości personalizować strategie terapeutyczne.

6.3. Publikacje oryginalne

- „Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer”

6.3.1 Zgoda Komisji Bioetycznej

Badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej UMB o numerze R-I-002/491/2019.

6.3.2.1. Materiał badany

Próbki do badań uzyskano z pooperacyjnych bloczków utrwalonych w formalinie. Materiał został pobrany od pacjentów w różnych stopniach zaawansowania nowotworu zgodnie z klasyfikacją TNM; obecność raka brodawkowatego tarczycy w badanych skrawkach została potwierdzona niezależnie przez dwóch patomorfologów. Grupa kontrolna składała się z próbek pobranych od tych samych pacjentów, z prawidłowej tkanki tarczycy bez cech nowotworzenia. Tkanki kontrolne zostały potwierdzone przez dwóch patomorfologów i nie zawierały komórek RBT ani innych zmian patologicznych. Ze względu na szybką progresję nowotworu nie było możliwości uzyskania tkanek nienowotworowych od 2 pacjentów z RBT. Z badania wykluczono pacjentów bez rozpoznania RBT w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym oraz pacjentów z obecnymi przerzutami w węzłach chłonnych. Dodatkowe kryteria wykluczenia obejmowały inne choroby współistniejące, stany przewlekłe, leczenie immunosupresyjne i palenie papierosów. W związku z tym, do badania włączono 80 preparatów tkankowych (41 tkanek RBT i 39 tkanek kontrolnych bez zmian nowotworowych uzyskanych od tych samych pacjentów).

6.3.2.2 Oznaczenia laboratoryjne

miRNA zostało wyizolowane z 3 kolejnych skrawków o grubości 10 μm , które zostały uzyskane z odparafinowanych bloczków zawierających badane tkanki. W przypadku RBT zidentyfikowano obszary tkanki, które zawierały najwięcej komórek nowotworowych, aby zminimalizować ryzyko wyników fałszywie ujemnych. Całkowite RNA, w tym frakcję miRNA, wyizolowano przy użyciu roztworu do deparafinizacji i zestawu do ekstrakcji miRNeasy FFPE zgodnie z protokołem producenta (Qiagen, Hilden, Niemcy). Oceniono stężenie miRNA za pomocą fluorometru Qubit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Próbkę do profilowania ekspresji miRNA metodą Nanostring nCounter przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta (Nanostring Technologies, Seattle, WA, USA). W efekcie przygotowano 100 ng miRNA poprzez ligację specyficznego znacznika miR na końcu 3' każdego dojrzałego miRNA, a następnie przeprowadzono całonocną hybrydyzację w temperaturze 65°C, z zestawem sond reporterowych i wychwytyjących. W dalszych krokach próbki zostały umieszczone w nCounter Prep Station w celu automatycznego oczyszczania. Następnie w celu zebrania danych każda próbka została zeskanowana przy użyciu analizatora cyfrowego nCounter. Dane Nanostring zostały zdeponowane w bazie Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE191117).

W celu walidacji wyników użyto zestawu miRCURY LNA RT (Qiagen), zgodnie z protokołem producenta przeprowadzono odwrotną transkrypcję próbek miRNA (41 próbek RBT i 39 kontrolnych tkanek tarczycy) w termocyklerze BioRad S1000 (Mississauga, ON, Kanada). Następnie istotnie zmienione miRNA oznaczono ilościowo metodą qRT-PCR przy użyciu specyficznych starterów i zestawu miRCURY LNA SYBR Green PCR (Qiagen). Przebadano próbki w dwóch duplikatach w systemie LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche, Basel, Szwajcaria). Jako endogennej kontroli użyto miR-103a-3p i U6 snRNA, a do obliczenia ich stabilności zastosowano algorytm NormFinder (Department of Molecular Medicine (MOMA), Aarhus University Hospital, Aarhus N, Dania). Względą ekspresję miRNA obliczono przy użyciu qBase MSeExcel VBA na podstawie wielu próbek i wielu referencyjnych miRNA. Wartości zmiany krotności (FC) zostały obliczone za pomocą Centrum Analizy Danych GeneGlobe (Qiagen; geneglobe.qiagen.com).

6.3.2.3 Analiza statystyczna

Do analizy danych użyto oprogramowania nSolver 4.0 (Nanostring), które wykorzystano również do normalizacji, przy użyciu średniej geometrycznej 100 miRNA o

najwyższej ekspresji. Zastosowano korektę wskaźnika fałszywych odkryć (FDR) dla wielokrotnych porównań, ograniczoną do 0,5, aby zmniejszyć ryzyko fałszywie dodatnich istotności statystycznych. Wartość progowa bezwzględnej zmiany krotności (Fold Change – FC) ekspresji istotnie zmienionych miRNA wynosiła ponad 1,5.

Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu GraphPad PRISM (wersja 9.1.1.; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Wstępna analiza statystyczna (test Shapiro–Wilka) wykazała, że badane parametry nie miały rozkładu normalnego. Z tego względu przeprowadzono testy nieparametryczne między grupami badaną oraz kontrolną. Dla istotnie zmienionych miRNA obliczono wartości pola pod krzywą charakterystyki (AUC) na podstawie krzywych charakterystyki (ROC).

Przeprowadzono również analizę ontologii genów targetowych RBT. W tym celu użyto narzędzia MIENTURNET, które zostało zaprojektowane w celu uzyskania docelowych genów z baz TargetScan oraz miRTarBase. Aby uzyskać wgląd w znaczenie biomolekularne zidentyfikowanych genów docelowych dla istotnie zmienionych miRNA, przeprowadzono analizę ontologiczną z użyciem narzędzi: DAVID, GOrilla, Profiler, Metascape. Aby dokładniej zbadać interakcje białko-białko (ang. PPI) docelowych genów targetowych, zastosowano oprogramowanie Cytoscape oraz użyto algorytmu Maximal Clique Centrality (MCC). W wyniku przeprowadzonej analizy zidentyfikowano 10 genów centralnych w sieci PPI.

Użyto modelu regresji logistycznej łącząc ze sobą istotnie zmienione miRNA z wykorzystaniem oprogramowania WEKA (Weka, wersja 3.8.5, Hamilton, Nowa Zelandia). Utworzono modele oparte na regresji logistycznej, naiwnym modelu Bayesa i algorytmach wykorzystujących strukturę drzewa decyzyjnego - J48. Dla każdej kombinacji przygotowano tablice w celu oceny modelu. Zmierzono wydajność klasyfikatorów multi-miRNA za pomocą precyzji klasyfikacji i AUC.

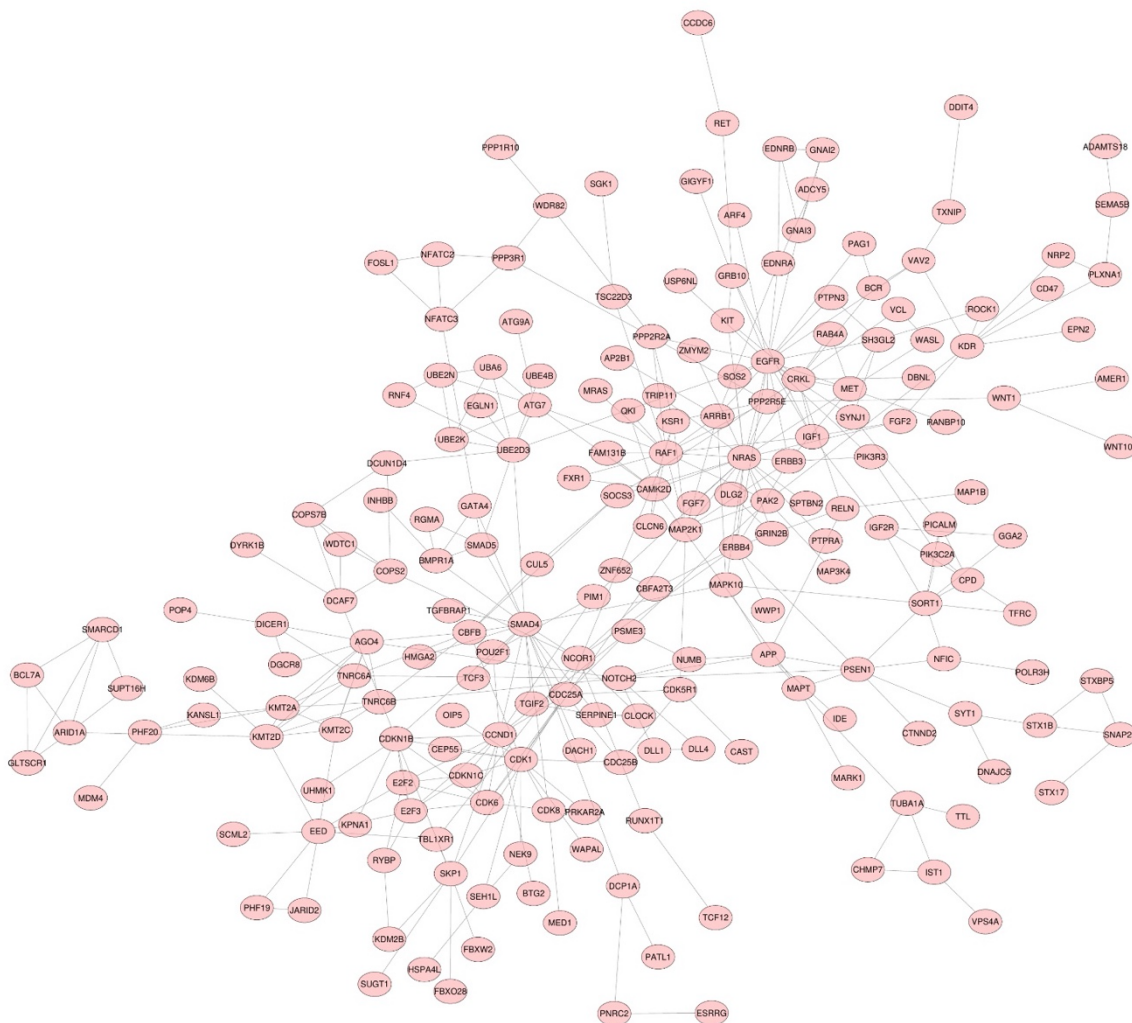
6.3.3 Wyniki

Przy użyciu platformy Nanostring Technology zostało wykonane profilowanie ekspresji 798 miRNA. Między badanymi grupami wykryto różnicę w ekspresji 10 miRNA (Tabela nr 1). Ekspresja 8 miRNA była wyższa, a 2 niższa w RBT w porównaniu z grupą kontrolną. Zastosowano progi $FDR < 0,05$ oraz $|\text{fold change (FC)}| \geq 1,5$.

miRNA	Fold Change (FC)	Wartość p	False Discovery Rate (FDR)
miR-146b-5p	6,62	0	0
miR-221-3p	3,23	0	0
miR-221-5p	2,36	0	0
miR-222-3p	2,94	0	0
miR-34a-5p	1,65	0	0
miR-551b-3p	2,63	0	0
miR-152-3p	-1,53	0	0,01
miR-15a-5p	1,57	0	0,01
miR-31-5p	1,6	0	0,02
miR-7-5p	-2,57	0	0,03

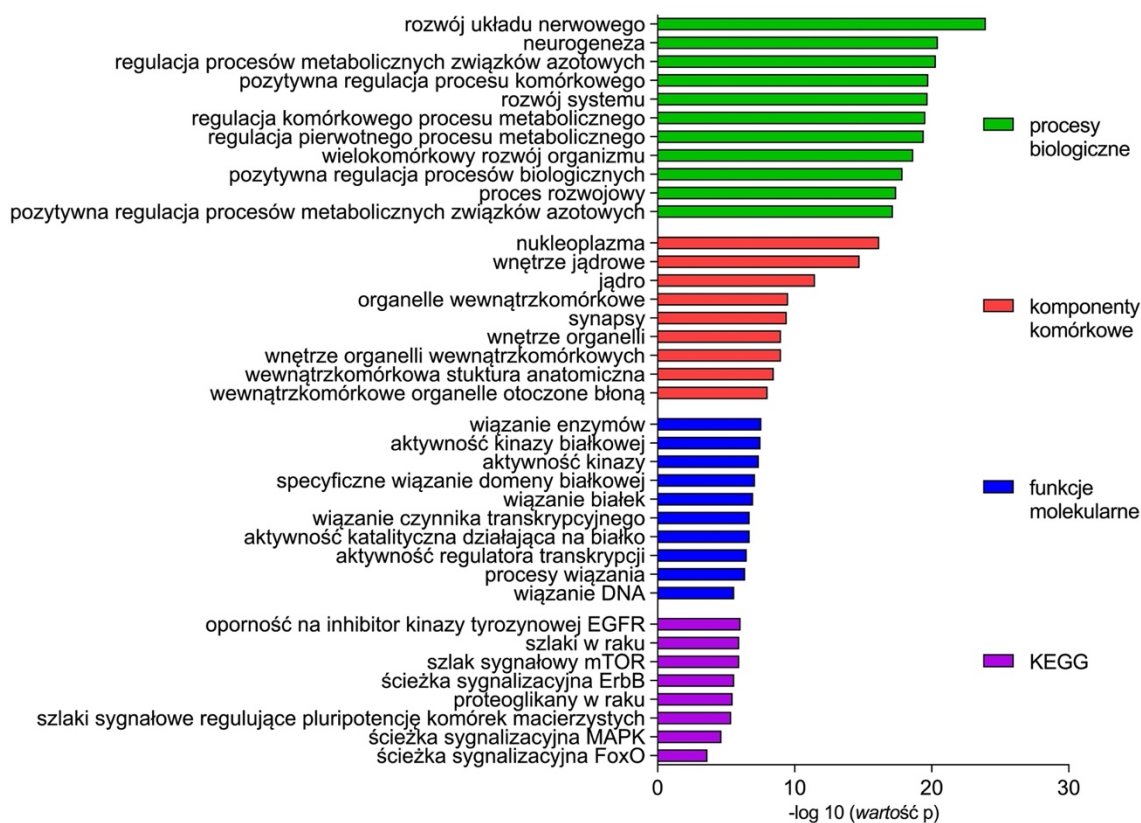
Tabela nr 1. Istotna statystycznie różnica w ekspresji miRNA między RBT a grupą kontrolną (FDR <0,05 i |FC| ≥ 1,5).

Przeprowadzono również analizę ontologii genów targetowych RBT. W tym celu użyto narzędzia MIENTURNET, które zostało zaprojektowane w celu uzyskania docelowych genów z TargetScan oraz miRTarBase. Wyniki wskazały 725 przypuszczalnych genów docelowych dla miRNA w oparciu o minimalny próg dwóch interakcji miRNA-cel. Baza danych STRING została wykorzystana do wizualizacji relacji między białkami (Rycina nr 1).



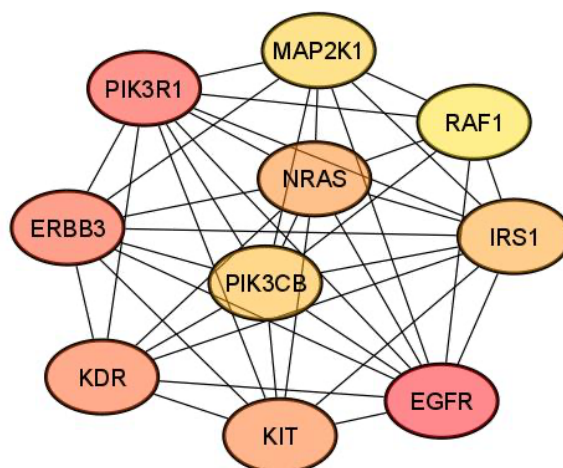
Rycina nr 1. Połączenia między docelowymi genami istotnie zmienionych miRNA ukazane przy użyciu bazy danych STRING. Przedstawiono wyłącznie połączone węzły. Pokazane są tylko interakcje z wysokimi wynikami interakcji ($> 0,9$). Przewidywana wartość PPI wyniosła $8,44e-15$.

Analiza ontologii genów targetowych istotnie zmienionych miRNA wykazała dominującą rolę następujących kategorii: „rozwój układu nerwowego”, „neurogeneza” i „regulacja procesu metabolicznego związków azotowych”. Dokładny wynik analizy ontologicznej przedstawia Rycina nr 2.



Rycina nr 2. Analiza ontologiczna genów docelowych istotnie zmienionych miRNA, które są zaangażowane w patogenezę RBT.

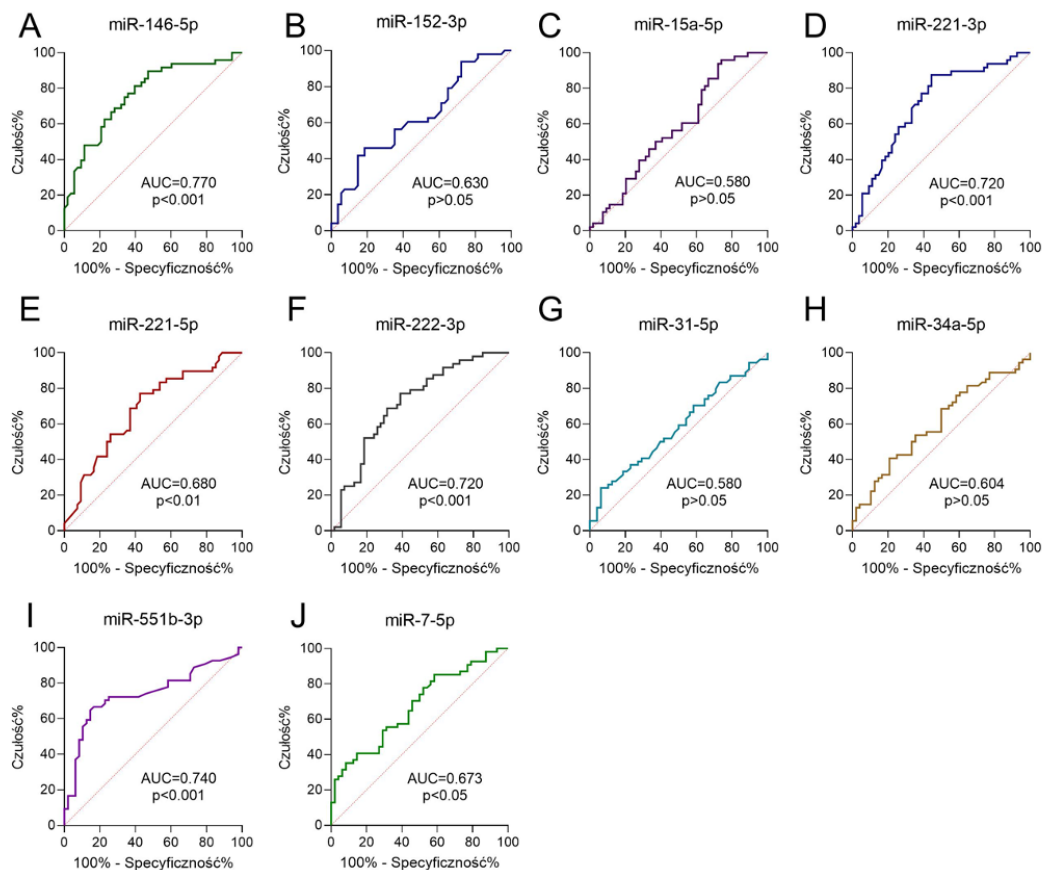
W wyniku przeprowadzonej analizy zidentyfikowano 10 kluczowych genów centralnych w sieci PPI (Rycina nr 3).



Rycina nr 3. Sieć PPI zawierająca 10 kluczowych genów zaangażowanych w rozwój RBT.

Przy użyciu AUC oceniono wartość diagnostyczną istotnie zmienionych miRNA jako kandydujących biomarkerów RBT. Wszystkie istotnie zmienione miRNA wykazywały istotnie

wyższe AUC w porównaniu z AUC=0,500, z wyłączeniem miR-31-5p ($p>0,05$). Najwyższe AUC, wskazujące na możliwą przydatność kliniczną w diagnostyce RBT, zaobserwowano dla miR-146-5p (AUC=0,770), miR-551-3p (AUC=0,740) i miR-222-3p (AUC=0,720) (Rycina nr 4).



Rycina nr 4. Wyniki analizy ROC przeprowadzonej w celu oceny wartości wybranych miRNA jako diagnostycznych biomarkerów RBT: (A) miR-146-5p; (B) miR-152-3p; (C) miR-15a-5p; (D) miR-221-3p; (E) miR-221-5p; (F) miR-222-3p; (G) miR-31-5p; (H) miR-34a-5p; (I) miR-551b-3p; (J) miR-7-5p.

Następnie używając modelu regresji logistycznej dla panelu składającego się miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551-3p, miR-7-5p uzyskano AUC wynoszące 0,841. Podsumowanie danych modelu regresji logistycznej przedstawia Tabela nr 2. Wyróżniona stała regresji oraz współczynniki są częścią modelu – stała regresji to logarytm szans, gdy zmienna wynosi 0, co oznacza brak RBT. Współczynniki opisują, jak bardzo zmienia się logarytm szans w obecności RBT. Wartości prawdziwie dodatnie, fałszywie dodatnie, precyzja i AUC opisują przydatność diagnostyczną modelu.

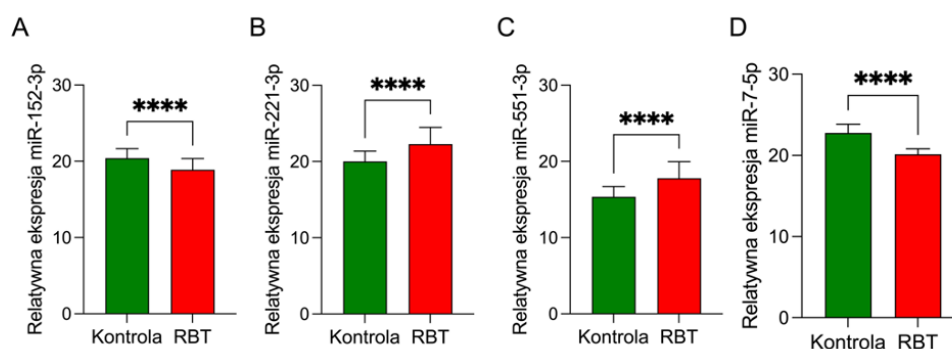
Podczas analizy wybrano cztery istotnie zmienione miRNA o najwyższych wartościach diagnostycznych i skonstruowano model regresji logistycznej. Wartość AUC uzyskana dla

kombinacji miR-152-3p + miR-221-3p + miR-551b-3p + miR-7-5p (AUC=0,841) miała wyższą wartość diagnostyczną niż najwyższa wartość AUC dla miRNA użytego oddzielnie — miR-146-5p (AUC=0,770) (Tabela nr 2).

	PD	FU	Precyzja	AUC	Stała regresji	Współczynnik
x1= miR-152-3p x2= miR-221-3p x3= miR-551b-3p x4= miR-7-5p	0.769	0.227	0.774	0.841	-1.8033	a1=-1.2104 a2=0.8173 a3=0.5172 a4=-0.0178

Tabela nr 2. Zestawienie podstawowych parametrów modelu regresji logistycznej. PD – prawdziwie dodatnie, FU – fałszywie ujemne

Wyniki uzyskane metodą Nanostring potwierdzono z użyciem RT-PCR (****, $p < 0,0001$) (Rycinsdada nr 5).



Rycina nr 5. Względna ekspresja istotnie zmienionych miRNA zawartych w modelu regresji logistycznej w próbkach kontrolnych (N=39) i RBT(N=41): (A) miR-152-3p (zmiana krotności (FC)=0,37); (B) miR-221-3p (FC=5,78); (C) miR-551b-3p (FC=5,68); (D) miR-7-5p (FC=0,18). Każdy słupek przedstawia średnią geometryczną ± błąd standardowy średniej stosunku ekspresji miRNA i miRNA referencyjnego (miR-103a-3p i U6 snRNA) obliczonego przy użyciu qBase MExcel VBA na podstawie wielu próbek i wielu referencyjnych miRNA.

Gwiazdki wskazują poziomy istotności różnic (**** $p < 0,0001$).

6.3.4 Omówienie wyników

W przeprowadzonym badaniu zidentyfikowano 10 miRNA (miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-221-5p, miR-34-5p, miR-551b-3p, miR-152-3p, miR-15a-5p, miR-31-5p i miR-7-5p), których ekspresja była istotnie różna w RBT w porównaniu z prawidłową tkanką tarczycy. Zgodnie z dostępną literaturą, wszystkie istotnie zmienione miRNA uwzględnione w

badaniu są zaangażowane w rozwój RBT lub progresję raka, co wskazuje na spójność uzyskanych wyników z dotychczasowymi badaniami. Dodatkowo zidentyfikowano kluczowe geny docelowe istotnie zmienionych miRNA, przeprowadzono analizę funkcjonalną oraz skonstruowano sieć PPI. Poprzez analizę KEGG zidentyfikowano najbardziej istotne szlaki w patogenezie RBT. Uzyskana analiza może również pozwolić na opracowanie nowych opcji terapeutycznych w leczeniu RBT. Wszystkie istotnie zmienione miRNA wykazały wysoką wartość diagnostyczną (z wyjątkiem miR-31-5p). Największą możliwą przydatność kliniczną w diagnostyce RBT zaobserwowano dla miR-146-5p (AUC=0,770), miR-551-3p (AUC=0,740) i miR-222-3p (AUC=0,720). W szczególności ekspresja miR-146-5p (AUC=0,770) wykazała najwyższą użyteczność diagnostyczną. Aby zwiększyć dokładność diagnostyczną stosowania miRNA, oceniono kombinację czterech miRNA (miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p i miR-7-5p) z obliczonym AUC wynoszącym 0,841. Taka wartość AUC pozwala na możliwość wprowadzenia zaproponowanego połączenia 4 miRNA jako panelu diagnostycznego RBT.

Należy również podkreślić, że wartości AUC uzyskane w trakcie badań są porównywalne z wcześniej publikowanymi w piśmiennictwie [28,29]. Wprowadzenie panelu diagnostycznego miRNA w RBT może skutkować dokładniejszą diagnozą w trudnych i wątpliwych przypadkach, umożliwić bardziej trafne decyzje terapeutyczne, pomóc w identyfikacji pacjentów wymagających niestandardowego postępowania klinicznego lub bardziej agresywnego leczenia oraz być częścią bardziej spersonalizowanego podejścia. Z powodu niejednorodności RBT preferowane byłoby wprowadzenie panelu diagnostycznego, a nie ocenę ekspresji pojedynczych miRNA, co pokazuje zwiększona wartość AUC kombinacji różnych miRNA w porównaniu z oznaczeniem ekspresji pojedynczego miRNA.

Wyniki przeprowadzonego badania są zgodne z aktualną wiedzą na temat miRNA w patogenezie RBT oraz wykazały ich potencjał diagnostyczny w RBT. Co więcej, dotychczasowe badania nad rolą miRNA w RBT miały na celu ustanowienie nowych nieinwazyjnych paneli diagnostycznych, ale wyniki były niewystarczające. Dlatego zaproponowano panel diagnostyczny miRNA RBT składający się z miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p i miR-7-5p. Szeroka gama badanych miRNA oraz walidacja wyników uzyskanych za pomocą testów PCR zwiększają wartość przeprowadzonego badania. Jednak ze względu na ograniczoną liczebność grupy eksperymentalnej wymagana jest dalsza ocena i walidacja danych przy użyciu większej kohorty, aby potwierdzić przydatność diagnostyczną proponowanego panelu miRNA.

Podsumowując, wykonana analiza wskazuje na przydatność oceny wzorców ekspresji miRNA w diagnostyce RBT. Ponadto jako panel diagnostyczny u pacjentów z RBT można wprowadzić kombinację czterech miRNA – miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p i miR-7-5p. Również charakterystyka sieci regulacyjnej istotnie zmienionych miRNA i ich genów docelowych jest istotna dla badania szlaków prowadzących do progresji choroby. Niemniej jednak konieczne są dodatkowe badania, aby zrozumieć rolę rozregulowanych miRNA w mechanizmach molekularnych leżących u podstaw patogenezy RBT.




6.3.5 Wniosek

Analiza ekspresji miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p oraz miR-7-5p (AUC=0,841) może stanowić molekularny panel diagnostyczny, użyteczny w procesie diagnostycznym raka brodawkowego tarczycy.

7. KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Review

The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer

Mariusz Rogucki ^{1,*} , Angelika Buczyńska ² , Adam Jacek Krętowski ^{1,2}  and Anna Popławska-Kita ¹

¹ Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; adamkretowski@wp.pl (A.J.K.); annapoplawsakita@op.pl (A.P.-K.)

² Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; angelika.buczynska@umb.edu.pl

* Correspondence: mariusz.rogucki2@gmail.com; Tel.: +48-509-866-455

Abstract: In recent years, the global incidence of thyroid cancer has been increasing. Despite the significant progress in the diagnostic tools applied for papillary thyroid cancer (PTC) diagnosis, commonly used methods require undergoing invasive diagnostic procedures, such as liquid biopsy, which still, in some cases, remains imprecise. In this case, novel screening and diagnostic biomarkers are still being evaluated using highly specialized techniques, which could increase PTC detection. Currently, a number of genes and proteins associated with PTC development are currently under investigation to assess their clinical utility. Accordingly, a literature search was undertaken to collect novel information about the diagnosis of and prognosis for PTC with a particular emphasis on the role of microRNA (miRNA) evaluation. The early identification of novel biomarkers is essential for facilitating appropriate therapeutic decisions. Moreover, the evaluation of plasma- and serum-derived miRNA measurements could be considered as equivalent thyroid cancer screening tools in the future. On the other hand, the PTC pathogenesis could be evaluated further with the use of miRNA evaluation, which may bring novel insights for potential medical target determination.

Keywords: miRNA; papillary thyroid cancer; diagnosis; screening



Citation: Rogucki, M.; Buczyńska, A.; Krętowski, A.J.; Popławska-Kita, A. The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4738. <https://doi.org/10.3390/jcm10204738>

Academic Editors: Andrzej Lewinski and Renata Stawerska

Received: 13 September 2021

Accepted: 12 October 2021

Published: 15 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, incidences of thyroid cancer have been increasing worldwide [1]. Between 1992 and 2017, the incidence of TC in the USA increased from 5.7 to 13.3 cases per 100,000 people [2]. Worldwide, nearly 300,000 cases of TC are diagnosed annually, causing nearly 40,000 deaths [3]. The estimated median age of onset is 50 years [3]. TC is much more common in women than in men [4]. Based on demographic changes in morbidity and mortality, TC is expected to replace colorectal cancer as the fourth leading cancer diagnosed in the US in 2030 [5].

The most common histological type of TC is papillary thyroid cancer (PTC), accounting for approximately 80–90% of all TC cases [6,7]. For the diagnosis of PTC, the analysis of medical history, physical examinations, laboratory tests (the determination of thyrotropin (TSH), thyroid hormones, thyroglobulin and calcitonin levels), ultrasound evaluation, fine-needle aspiration biopsies (FNABs), and molecular tests detecting specific gene mutations are included in the clinical management procedure [8]. Despite beneficial treatment results, 10% of PTC patients are diagnosed with relapses or distant metastases that may lead to worse clinical prognoses [9].

The introduction of FNAB into routine clinical management processes became the diagnostic tool of choice for the initial evaluation of solitary thyroid nodules because of its accuracy, safety, and cost effectiveness. Although patients undergoing FNAB are informed of several complication risks, ranging from the minor, such as hematoma at the injection site or pain via ecchymosis, to the major, such as clinically significant hematoma and swelling;

inadvertent punctures of the trachea, carotid artery, or jugular vein occur rarely (approximately less than 2–5% per FNAB) [10]. However, several studies have reported that the side effects are inadequate to the invasiveness of this procedure. Cappelli et al. described focal carotid intramural hematoma and cancer dissemination along the needle track observed after FNAB performance [11]. On the other hand, Zhu et al. note that the frequency of acute thyroid swelling is considered a rare complication of FNAB [12]. Undoubtedly, the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of FNAB are extremely high, estimated at 90–95%. Thus, consistently obtaining adequate tissue and processing the specimens to achieve accurate cytopathological interpretation requires expertise and experience [13]. Unfortunately, up to 10% of the FNABs that are performed are undiagnostic [14].

Therefore, there is still a need to find a cost-effective and noninvasive PTC diagnostic method characterized by high sensitivity and specificity, determined using specific novel techniques, such as genetics, and that subsequently reduce the occurrence of unnecessary invasive procedures. In this case, many proteins and genes involved in the etiopathogenesis of PTC are under investigation for their potential diagnostic uses [15]. In this review, we outline considerations of miRNA profiling with potential applications to routine frameworks of PTC diagnosis and prognosis. As it is estimated that up to 50% of PTC surgeries are unnecessary [16], the use of miRNAs may help to increase the sensitivity and specificity of FNAB, simultaneously becoming an equivalent malignant cancer screening tool measurement in the future [15]. Moreover, the currently proposed utilization of a plasma miRNA profile expression can be a valuable component of a liquid biopsy [16]. Clearly, the identification of novel PTC biomarkers remains necessary, which would increase the accuracy of both diagnostic procedures and clinical treatment decisions while introducing the assumption of personalized medicine.

2. PTC miRNA-Mediated Regulation of Gene Transcription

Many studies have suggested the importance of miRNA abnormalities during PTC development [17–20]. Moreover, many studies have shown differences in the deregulation of various miRNAs in thyroid cancer, depending on its type [18–21]. In PTC, the deregulation of miR-146b, miR-221, miR-222, miR-181b, and miR-21 is particularly emphasized [22–26]. MiR-146a and miR-146b have modulating effects on the immune system and reduce post-transcriptional gene expressions [27]. In PTC, miR-146b expressions in neoplastic tissues may be almost 30 times higher compared to non-neoplastic tissues [28]. Increased expressions of miR-146a and miR-146b have an inhibitory effect on beta retinoic acid receptor (RAR β) expression, promoting the proliferation of cancer cells [28]. It has also been shown that the overexpression of miR-146b modulates the transforming growth factor β (TGF- β) pathway through the mother, and against the decapentaplegic (SMAD) transcription factor family, via member homolog 4 (SMAD4) repression, which influences the formation of thyroid tumors [29]. A study performed by Al-Abdallah et al. showed that the tissue overexpression of miR-146b reduced the expression of the major histocompatibility complex (MHC), the class I polypeptide-related sequence A (MICA), and an activating receptor (transmembrane protein) belonging to the NKG2 family of C-type lectin-like receptors (NKG2D), which is a type C lectin receptor for natural killer (NK) T cells [30]. These disturbances in mRNA synthesis may reduce the immunogenicity of PTC [30]. Moreover, increased expressions of miR-146b were previously reported among patients with the BRAF-V600E mutation [31], which suggests a correlation between the serine/threonine kinase proto-oncogene (BRAF) and miRNA expressions [22]. MiR-146b deregulation increases the risk of angioinvasion, capsular infiltration, and metastases to lymph nodes and distant organs, which result in worse survival prognoses [32]. Other studies also indicate a significant impact of miR-146b deregulation on PTC development. It was proved that a significant increase in miRNA-146b expressions in PTC resulted in worse clinical prognoses [33–35].

The deregulation of miR-221 and miR-222 has been observed to have a significant impact on carcinogenesis [36]. MiR-221 and miR-222 are highly homologous [37]. MiR-221 increases the movement and invasion of PTC cells by inhibiting the transcription of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK), which is a metastasis suppressor that disrupts the epithelial–mesenchymal transition [38]. MiR-221 and miR-222 affect the transformation and proliferation of thyrocytes by inhibiting p27kip1, a cell-cycle regulator [36]. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) is a pro-inflammatory cytokine that increases miR-221 and miR-222 expression, thus promoting carcinogenesis [39]. Many other studies have confirmed that the increased expression of miR-221 and miR-222 is associated with increased tumor dimensions and a greater tendency for the cancer to infiltrate blood vessels with surrounding tissues, which simultaneously increases the probability of metastasis to lymph nodes and distant organs [19,38,40,41]. Furthermore, the study performed by Dai et al. underlined that miR-221 overexpression should be considered a PTC recurrence risk factor (hazard ratio (HR) 1.41; 95%CI 1.14–1.95, $p = 0.007$) [23]. Accordingly, these features are associated with a worse prognosis.

Another miRNA whose expression is increased in PTC cells is miRNA-181b [42]. A study performed by Dengfeng Li et al. showed that a reduction in miR-181b expression inhibits cell division and stimulates apoptosis by upregulating lysine 63 deubiquitinase (CYLD). Moreover, the expression of miR-181b was almost 8-fold higher in cancerous tissue compared to in healthy tissue expression [43]. In addition, the overexpression of miR-181b significantly increases the risk of cancer recurrence and lymph-node metastases [44].

One of the key miRNAs implicated in the etiopathogenesis of PTC is miR-21. The expression of this miRNA was proved to be deregulated in neoplastic tissues [45]. A study conducted by Ortiz et al. showed that the overexpression of miR-21 and the aforementioned miR-141b was caused by a lack in DNA methylation, which resulted in insufficient transcription of miR-21 and miR-141b targets [46]. The study was conducted on 50 PTC and 50 tumor-free tissues, and the miRNAs were analyzed. MiR-21 overexpression may promote tumor-cell proliferation by disrupting the Von Hippel-Lindau/phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (VHL/PI3K/AKT) signaling pathways [26]. In addition, the inhibition of phosphatase and tensin homolog (PTEN) expressions by miR-21 promotes cancer development [47]. In a study conducted by Sondermann et al., an increased PTC recurrence rate was found to be positively correlated with decreased miR-21 expression. The authors identified miR-9 and miR-21 with as strong a predicting value as PTC recurrence [48]. In contrast, another study indicated that decreased expressions of miR-21, which is influenced by the long noncoding RNA bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2) interferon-stimulated positive regulator (BISPR lncRNA), increased the invasiveness of PTC cells [49].

The following study, performed by Wang et al., showed that miR-599 increases apoptosis and decreases PTC proliferation through the downregulation of Hey2-dependant Notch signaling pathways [50]. Accordingly, Ma et al. showed that miR-199a-5p inhibits the snail family zinc finger 1 (SNAIL). Increased expressions of SNAIL resulted in increased PTC proliferation [51] (Table 1).

Zhang et al. suggested that miR-145 promotes apoptosis and also inhibits proliferation and migration of PTC cells. The potential medical intervention target mapped on miR-145 could result in a direct suppression of Ras-Related Protein Rab-5C (RAB5C). Ras proteins are members of a superfamily of small hydrolase enzymes that bind to the nucleotide guanosine triphosphates (GTPases) that are involved in many aspects of cell growth control, and may be a beneficial target in future medical intervention studies [52]. In turn, overexpressions of miR-643 observed during the study performed by Yin H et al. increased PTC proliferation and inhibited apoptosis. This effect was suggested due to downregulation of the cytochrome P450 family member 11B1 [53]. Furthermore, as shown by Zhao et al., targeting insulin receptor substrate 2 and regulating the PI3K/Akt pathway is a mechanism of the function of miR-766. Its underexpression promotes PTC progression [54].

A study that was recently performed by Hu et al. has found that miR-122-5p, through dual specificity phosphatase 4 (DUSP4) inhibition, suppresses PTC oncogenesis [55] (Table 2).

Table 1. The influence of miRNAs on PTC.

miRNA	Influence	Reference
miR-221	Overexpression is a risk factor for PTC recurrence (HR 1.41; 95%CI 1.14–.95, $p = 0.007$)	[23]
miR-222	Overexpression increases frequency of central neck metastasis and lateral neck metastasis ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively)	[41]
miR-9 and miR-21	Reduced expression of miR-9 and miR-21 increases the risk of PTC recurrence (HR = 1.48; 95% CI 1.24–1.77, $p < 0.001$; and HR = 1.52; 95% CI 1.18–1.94, $p = 0.001$; respectively).	[48]
miR-146a and miR-146b	Overexpression predicts lymph node metastasis and PTC recurrence	[34]
miR-199a-3p	Downregulation promotes the PTC proliferation	[51]

Table 2. Overexpressed and underexpressed miRNAs in PTC tissues.

Overexpressed miRNAs	Underexpressed miRNAs	Origin of Samples	Reference
miR-146b-5p, miR-146b-3p		Tissues	[28]
miR-146b-5p, miR-146b-3p, miR-221-3p, miR-222-5p, miR-222-3p	miR-1179, miR-486-5p, miR-204-5p, miR-7-2-3p, miR-144-5p, miR-140-3p	Tissues	[18]
	miR-9 and miR-21	Tissues	[48]
	miR-599	Tissues	[50]
	miR-199a-5p	Tissues	[51]
	miR-145	Tissues	[52]
miR-643		Tissues and serum	[53]
	miR-766	Tissues and cell lines	[54]
	miR-122-5p	Tissues	[55]

Due to the rapid development of promising miRNA evaluations when using advanced technology for the comprehensive and comparative analysis of genomes, knowledge of the potentially disturbed metabolic pathways that are related to PTC development could be enhanced. Accordingly, the knowledge of disturbances of metabolic pathways involved in PTC development may lead to the discovery of novel screening and diagnostic biomarkers. Thus, the miRNA profiling could improve PTC screenings, clinical management, treatment evaluations, and individual patient prognosis assessments by introducing personalized medicine assumptions.

3. The Role of miRNAs in Fine-Needle Aspiration Biopsies

FNAB is the most frequently used diagnostic method, characterized by simplicity, high specificity, a low complication rate, and low cost [56]. However, it also has disadvantages, such as non-diagnostic or abnormal results and undefined significance in describing lesions [57]. In this case, the routine analysis of specific miRNAs would increase the sensitivity and specificity of FNAB when used for PTC diagnoses [58].

Castagna et al. demonstrated that a PTC diagnostic miRNA panel consisting of miR-146b, miR-221, and miR-222 would increase the diagnostic utility of FNAB [58]. The study was conducted on 174 samples obtained during FNABs from 168 patients. Another study showed that miR-181b, in combination with miR-146b, might be useful in differentiating between benign thyroid lesions and PTC lesions [59]. In a study performed on 20 malignant lesion samples and 20 samples containing benign lesions, Chen et al.

showed that miR-146b could be a useful PTC-screening biomarker [60]. Santos et al. created a panel consisting of 11 miRNAs, including let-7a, miR-103, miR-125a-5p, let-7b, miR145, RNU48, miR-146b, miR152, miR-155, miR200b, and miR-181, and proved its diagnostic utility for differentiating between undefined changes obtained by FNAB examination [61]. The authors named this test mir-THYpe (miRNA-based thyroid molecular classifier for precision endocrinology). In order to validate this diagnostic procedure, 58 samples from benign tissues and 39 samples from malignant tissues were used. The proposed panel was characterized by 94.6% sensitivity, 81% specificity, a 95.9% positive predictive value, and a 76.1% negative predictive value. These results suggest that the mir-THYpe test is useful for differentiating between lesions of an undefined nature, which may reduce the number of unnecessary surgeries.

In a similar study, Mazeh et al. [62] identified a panel of miRNAs with potential diagnostic utility for differentiating between undefined lesions in FNABs. The research material consisted of 274 samples collected from 102 patients, and the miRNA expression levels were examined using Next Generation Sequencing (NGS). The Panel consisted of 19 miRNAs: miR-146b, miRNA-146, miR-222, miR-221, miR-134, miR-34a, miR-101, miR-143, miR-144, miR-615, miR-375, miR-181b, miR-194, miR-130a, miR-199a-3p, miR-30a, miR-424, miR-148a, and miR-24. Its diagnostic usefulness was proved by its 91% sensitivity and 100% specificity, and the positive and negative predictive values were estimated at 94% and 100%, respectively. The limitations of the study included the analysis of ex vivo tissues, the selective use of malignant PTC tissues, and the coexistence of other thyroid diseases among the studied patients, which may have interfered with the obtained results.

In a subsequent study, Labourier et al. combined DNA, mRNA, and miRNA analyses into a specific PTC diagnostic panel [63]. The research was performed on 638 samples obtained during FNABs. Samples were evaluated to detect the presence of 17 genes and 10 miRNAs: miR-29b-1-5p, miR-31-5p, miR-138-1-3p, miR-139-6p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375, and miR-551b-3p. The authors demonstrated that the effectiveness of molecular analysis was increased when genetic and miRNA tests were combined. The diagnostic usefulness of this panel was proved by its sensitivity and specificity, which were 89% and 85%, respectively.

The cited studies indicate that miRNA evaluations have a promising role in PTC diagnoses when combined with FNAB. It is important to underline that malignant tissues could also be differentiated from benign thyroid lesions using PTC miRNA diagnostic panels. Accordingly, a specific miRNA panel would increase both the sensitivity and specificity of FNAB, decreasing the number of undiagnostic results, and relatedly, the number of unnecessary surgeries. However, these studies are still considered preliminary. Further comparison with results obtained in groups with other thyroid malignancies and thyroid comorbidities, which may have an important impact on the isolated panel of miRNAs and subsequent diagnoses, should be performed.

4. PTC Screening Utility of Selected Plasma and Serum miRNAs

miRNAs can also be efficiently isolated from plasma and serum, and a specific miRNA can be investigated for potential PTC-screening utility. In a study performed by Wang et al., a panel consisting of three miRNAs isolated from plasma—miR-346, miR-34a-5p, and miR-10a-5p—was proposed as a useful tool for PTC screening [64]. The study was conducted on 30 samples obtained from PTC patients and 30 samples collected from healthy volunteers. The area under the ROC curve (AUC) of these three-miRNA panels was calculated at 0.816, which proved its great screening utility. Moreover, this study identified three miRNAs that were consistently upregulated in the exosomes obtained from PTC-patient plasma.

Another study performed by Liang et al. proposed two combined, plasma-isolated miRNA screening panels. The first consisted of two miRNAs: miR-16-2-3p and miR-223-5p; the second consisted of six miRNAs: miR-16-2-3p, miR34c-5p, miR223 -3p, miR223-5p, miR182-5p, and miR146b-5 [65]. The study included 24 patients during the testing phase and 91 patients during validation. This study revealed that a panel consisting of miR-223-

5p, miR-34c-5p, miR101-3p, and miR-16-2-3 may be particularly useful in differentiating between malignant and benign lesions. The AUC was estimated at 0.735, with 71.43% sensitivity and 73.33% specificity.

Dai et al. analyzed the plasma of 119 PTC patients, 51 healthy subjects, and 82 patients with benign thyroid nodules. The study showed the potential PTC-screening utility of a panel consisting of miR-485-3p and miR-4433a-5p [66]. Additionally, it has been shown that the level of miR-485-3p expression could be considered as a prognostic marker, differentiating low-risk cancer from high-risk cancer. Another study performed by Li et al. confirmed the diagnostic usefulness of these measurements, demonstrating 92.8% sensitivity and 88.9% specificity [67]. The study sample was comprised of 56 patients with PTC and 95 patients with benign thyroid nodules. The control group consisted of 10 healthy volunteers, which was a notable limitation of this research.

Many authors have emphasized the potential measurement of plasma miR-222 and miR-146b levels in the PTC screening [68–70]. Kondrotiene et al. analyzed the plasma levels of five miRNAs—miR-221, miR-222, miR-146b, miR-21, and miR-181b—of which miR-222 had the highest screening utility. The study included 49 patients with PTC, 23 patients with benign thyroid nodules, and 57 healthy individuals. The study showed the significant overexpression of miR-221, miR-222, miR-146b, miR-21, and miR-181b [71].

Furthermore, the study performed by Perdas et al. suggested that the screening panel, consisting of four miRNAs, such as let-7a, let-7c, let-7d, and let-7f, whose levels were elevated in plasma, have a higher PTC screening utility [72]. Accordingly, Ricarte-Filho et al. showed that the let-7 family affects growth and differentiation of PTCs. In particular, let-7f might attenuate a neoplastic process of RET/PTC papillary thyroid oncogenesis through impairment of MAPK signaling pathway activation [73]. Table 3 shows plasma-delivered downregulated and overregulated miRNAs than may be considered for PTC screening (Table 3).

Table 3. Novel potential screening biomarkers determined by miRNA profiling.

Overexpressed miRNA	Underexpressed miRNA	Origin of Samples	Reference
miR-221, miR-222, miR-146b, miR-21 and miR-181b		Plasma	[71]
miR-346, miR-34a-5p, miR-10a-5p		Plasma and tissues	[73]
miR-16-2-3p, miR-223-5p	miR-34c-5p, miR-101-3p, miR-381-3p	Plasma	[65]
let-7a, let-7c, let-7d, let-7f		Plasma	[72]

Due to the rapid development of promising miRNA evaluation methods, the clinical effectiveness of PTC screening could be improved. These measurement methods are characterized by high sensitivity, specificity, and reproducibility. Due to differences in the types of miRNAs reported by different authors and the relatively small number of samples and difficulties in validating the tests, there is still a need for further investigations of the PTC screening utility of miRNAs. Due to the increasing number of thyroid lesions found on ultrasound, the use of miRNA as a biomarker of PTC may help to accelerate diagnosis and treatment of PTC patients. However, additional plasma/serum measurement of miRNAs would be a practical, noninvasive method for screening and for follow-up observations after thyroidectomy.

5. The Importance of miRNAs in the Prognosis of the Course of Papillary Thyroid Cancer

Despite a good prognosis, the frequency of PTC recurrence is estimated at 20% [74]. Many studies indicate the potential importance of miRNAs in the prognostic assessment of

PTC. In the study performed by Chen-Kai Chou et al., it was shown that the overexpression of miR-146b was associated with a significant deterioration of overall survival rates. Moreover, the overexpression of miR-146b was further correlated with an increased percentage of nodal metastases and tumor invasiveness [75]. Furthermore, the polymorphism of miR-146a-3p among patients with an increased mortality rate was observed [76]. In this study, the HR of death (after adjustments for age) was 6.21 (95% CI, 1.38-27.93; $p = 0.006$).

Moreover, miR-221 and miR-222 dysregulation was observed to be more common in patients with PTC who were also diagnosed with distant metastases [77]. The study performed by Lei et al. included 78 patients diagnosed with PTC as the study group, which was subsequently divided into two subgroups: the first group consisted of 54 patients diagnosed with relapses; the second group consisted of 24 patients with no cancer recurrence. The authors identified miR-221 as a potential biomarker for PTC relapse [23]. A study performed by Pamedityde et al. on 400 PTC tissue samples obtained from paraffin blocks showed that the overexpression of five miRNAs—miR-146b, miR-222, miR-21, miR-221, and miR-181b—occurred more frequently in recurrent PTC [78].

Certainly, in a meta-analysis of 18 studies concerned on the role of miRNA in PTC screening, Silaghi et al. showed that miR-146b, miR-221, and miR-222 could be considered as potential screening/prognostic biomarkers of recurrent TC, and are particularly useful when referred to PTC [79]. The authors of these studies underlined the beneficial prognostic role of miRNAs in PTC screening, diagnosis and prognosis.

6. Conclusions

miRNA evaluation is a promising tool in the discovery of novel diagnostic and prognostic PTC biomarkers. In recent years, genetic determination has become one of the most rapidly developing methods, characterized by increasing diagnostic utility.

The introduction of miRNAs to PTC diagnostic procedures will improve the differentiation between benign and potentially malignant lesions. Moreover, the evaluation of plasma- and serum-derived miRNAs would be particularly beneficial in PTC screening, which is, accordingly, important to the increasing number of PTC cases. On the other hand, a more detailed understanding of the pathomechanism of miRNA activity during PTC development may lead to the discovery of novel potential medical targets, which is especially necessary for the clinical management of aggressive neoplasms. One of the limitations of the application of miRNA measurements in routine and daily clinical management is the requirement for large expenditures; simultaneously, however, the prices of these procedures are constantly decreasing alongside the development of genetic medicine. The miRNAs applied in the patients' clinical management procedures will personalize therapeutic strategies in the future.

Author Contributions: Conceptualization, M.R. and A.P.-K.; resources, M.R.; writing—original draft preparation, M.R.; writing—review and editing, A.B., A.J.K. and A.P.-K.; visualization, A.B.; supervision, A.P.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by internal financing of the Medical University of Białystok (SUB/1/DN/21/006/1150).

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Morris, L.G.; Tuttle, R.M.; Davies, L. Changing Trends in the Incidence of Thyroid Cancer in the United States. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2016**, *142*, 709–711. [[CrossRef](#)]
2. Cancer Stat Facts: Thyroid Cancer in U.S. Population. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html> (accessed on 13 November 2020).
3. Liao, D.; Lv, G.; Wang, T.; Min, J.; Wang, Y.; Liu, S. Prognostic value of long non-coding RNA BLACAT1 in patients with papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*, 47. [[CrossRef](#)]

4. Katoh, H.; Yamashita, K.; Enomoto, T.; Watanabe, M. Classification and General Considerations of Thyroid Cancer. *Ann. Clin. Pathol.* **2015**, *3*, 1045.
5. Rahib, L.; Smith, B.D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A.B.; Fleshman, J.M.; Matrisian, L.M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2913–2921. [[CrossRef](#)]
6. Schneider, D.F.; Chen, H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA Cancer J. Clin.* **2013**, *63*, 373–394. [[CrossRef](#)]
7. Davies, L.; Welch, H.G. Current Thyroid Cancer Trends in the United States. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2014**, *140*, 317–322. [[CrossRef](#)]
8. Durante, C.; Grani, G.; Lamartina, L.; Filetti, S.; Mandel, S.J.; Cooper, D.S. MD3The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *JAMA* **2018**, *319*, 914–924. [[CrossRef](#)]
9. Bai, Y.; Kakudo, K.; Nakamura, M.; Ozaki, T.; Li, Y.; Liu, Z.; Mori, I.; Miyauchi, A.; Zhou, G. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma and periostin expression. *Cancer Lett.* **2009**, *281*, 188–195. [[CrossRef](#)]
10. Polyzos, S.A.; Anastasilakis, A.D. Clinical complications following thyroid fine-needle biopsy: A systematic review. *Clin. Endocrinol.* **2009**, *71*, 157–165. [[CrossRef](#)]
11. Cappelli, C.; Pirola, I.; Agosti, B.; Tironi, A.; Gandossi, E.; Incardona, P.; Marini, F.; Guerini, A.; Castellano, M. Complications after fine-needle aspiration cytology: A retrospective study of 7449 consecutive thyroid nodules. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2017**, *55*, 266–269. [[CrossRef](#)]
12. Zhu, T.; Yang, Y.; Ju, H.; Huang, Y. Acute thyroid swelling after fine needle aspiration—A case report of a rare complication and a systematic review. *BMC Surg.* **2021**, *21*, 175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gharib, H.; Goellner, J.R.; Johnson, D.A. Fine-Needle Aspiration Cytology of the Thyroid: A 12-Year Experience With 11,000 Biopsies. *Clin. Lab. Med.* **1993**, *13*, 699–709. [[CrossRef](#)]
14. Alshaiikh, S.; Harb, Z.; Aljufairi, E.; Almahari, S.A. Classification of thyroid fine-needle aspiration cytology into Bethesda categories: An institutional experience and review of the literature. *CytoJournal* **2018**, *15*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chengfeng, X.; Gengming, C.; Junjia, Z.; Yunxia, L. MicroRNA signature predicts survival in papillary thyroid carcinoma. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 17050–17058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Perdas, E.; Stawski, R.; Nowak, D.; Zubrzycka, M. Potential of Liquid Biopsy in Papillary Thyroid Carcinoma in Context of miRNA, BRAF and p53 Mutation. *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 1721–1729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Nikiforova, M.N.; Chiosea, S.I.; Nikiforov, Y.E. MicroRNA Expression Profiles in Thyroid Tumors. *Endocr. Pathol.* **2009**, *20*, 85–91. [[CrossRef](#)]
18. Rosignolo, F.; Memeo, L.; Monzani, F.; Colarossi, C.; Pecce, V.; Verrienti, A.; Durante, C.; Grani, G.; Lamartina, L.; Forte, S.; et al. MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2017**, *50*, 1767–1777. [[CrossRef](#)]
19. Yoruker, E.E.; Terzioglu, D.; Teksoz, S.; Uslu, F.E.; Gezer, U.; Dalay, N. MicroRNA Expression Profiles in Papillary Thyroid Carcinoma, Benign Thyroid Nodules and Healthy Controls. *J. Cancer* **2016**, *7*, 803–809. [[CrossRef](#)]
20. Santiago, K.; Chen Wongworawat, Y.; Khan, S. Differential MicroRNA-Signatures in Thyroid Cancer Sub-types. *J. Oncol.* **2020**, *2020*, 2052396. [[CrossRef](#)]
21. Zhu, G.; Xie, L.; Miller, D. Expression of MicroRNAs in Thyroid Carcinoma. *Adv. Struct. Saf. Stud.* **2017**, *1617*, 261–280. [[CrossRef](#)]
22. Chou, C.-K.; Liu, R.-T.; Kang, H.-Y. MicroRNA-146b: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Papillary Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dai, L.; Wang, Y.; Chen, L.; Zheng, J.; Li, J.; Wu, X. MiR-221, a potential prognostic biomarker for recurrence in papillary thyroid cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2017**, *15*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lee, J.C.; Zhao, J.-T.; Gundara, J.; Serpell, J.; Bach, L.A.; Sidhu, S. Papillary thyroid cancer-derived exosomes contain miRNA-146b and miRNA-222. *J. Surg. Res.* **2015**, *196*, 39–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sun, Y.; Yu, S.; Liu, Y.; Wang, F.; Liu, Y.; Xiao, H. Expression of miRNAs in Papillary Thyroid Carcinomas Is Associated with BRAF Mutation and Clinicopathological Features in Chinese Patients. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, *2013*, 128735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zang, C.; Sun, J.; Liu, W.; Chu, C.; Jiang, L.; Ge, R. 1miRNA-21 promotes cell proliferation and invasion via VHL/PI3K/AKT in papillary thyroid carcinoma. *Hum. Cell* **2019**, *32*, 428–436. [[CrossRef](#)]
27. Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Chang, K.-J.; Baltimore, D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12481–12486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Czajka, A.A.; Wójcicka, A.; Kubiak, A.; Kotlarek, M.; Bakula-Zalewska, E.; Koperski, Ł.; Wiechno, W.; Jażdżewski, K. Family of microRNA-146 Regulates RAR β in Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Geraldo, M.V.; Yamashita, A.S.; Kimura, E.T. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene* **2011**, *31*, 1910–1922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Al-Abdallah, A.; Jahanbani, I.; Mehdawi, H.; Ali, R.H.; Al-Brahim, N.; Mojiminiyi, O.; Junaid, T.A. Down-regulation of the human major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) and its receptor is mediated by microRNA-146b-5p and is a potential mechanism of immunoeediting in papillary thyroid carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* **2020**, *113*, 104379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. miR-146b is Highly Expressed in Adult Papillary Thyroid Carcinomas with High Risk Features Including Ex-trathyroidal Invasion and the BRAFV600E Mutation. *Thyroid* **2010**, *20*, 489–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Acibucu, F.; Dökmetaş, H.S.; Tutar, Y.; Elagoz, Ş.; Kilicli, F. Correlations between the Expression Levels of Micro-RNA146b, 221, 222 and p27Kip1 protein mRNA and the Clinicopathologic Parameters in Papillary Thyroid Cancers. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2014**, *122*, 137–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Deng, X.; Wu, B.; Xiaoping, Z.; Kang, J.; Xie, J.; Zhang, X.; Fan, Y. MiR-146b-5p Promotes Metastasis and Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Thyroid Cancer by Targeting ZNF3. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *35*, 71–82. [[CrossRef](#)]
34. Qiu, Z.; Li, H.; Wang, J.; Sun, C. miR-146a and miR-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 2735–2740. [[CrossRef](#)]
35. Lima, C.R.; Geraldo, M.V.; Fuziwara, C.S.; Kimura, E.T.; Santos, M.F. MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different Papillary Thyroid Carcinoma cells. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Visone, R.; Russo, L.; Pallante, P.; De Martino, I.; Ferraro, A.; Leone, V.; Borbone, E.; Petrocca, F.; Alder, H.; Croce, C.M.; et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr. Relat. Cancer* **2007**, *14*, 791–798. [[CrossRef](#)]
37. Garofalo, M.; Quintavalle, C.; Romano, G.; Croce, C.M.; Condorelli, G. R221/222 in cancer: Their role in tumor progression and response to therapy. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 27–33. [[CrossRef](#)]
38. Wei, Z.-L.; Gao, A.-B.; Wang, Q.; Lou, X.-E.; Zhao, J.; Lu, Q.-J. MicroRNA-221 promotes papillary thyroid carcinoma cells migration and invasion via targeting RECK and regulating epithelial-mesenchymal transition. *Oncotargets Ther.* **2019**, *12*, 2323–2333. [[CrossRef](#)]
39. Mardente, S.; Mari, E.; Consorti, F.; Di Gioia, C.; Negri, R.; Etna, M.P.; Zicari, A.; Antonaci, A. HMGB1 induces the overexpression of miR-222 and miR-221 and increases growth and motility in papillary thyroid cancer cells. *Oncol. Rep.* **2012**, *28*, 2285–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tetzlaff, M.T.; Liu, A.; Xu, X.; Master, S.R.; Baldwin, D.A.; Tobias, J.W.; Livolsi, V.A.; Baloch, Z.W. Differential Expression of miRNAs in Papillary Thyroid Carcinoma Compared to Multinodular Goiter Using Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues. *Endocr. Pathol.* **2007**, *18*, 163–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Xiang, D.; Tian, B.; Yang, T.; Li, Z. miR-222 expression is correlated with the ATA risk stratifications in papillary thyroid carcinomas. *Medicine* **2019**, *98*, e16050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nikiforova, M.N.; Tseng, G.C.; Steward, D.; Diorio, D.; Nikiforov, Y.E. MicroRNA Expression Profiling of Thyroid Tumors: Biological Significance and Diagnostic Utility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 1600–1608. [[CrossRef](#)]
43. Li, D.; Jian, W.; Wei, C.; Song, H.; Gu, Y.; Luo, Y.; Fang, L. Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 7672–7680.
44. Pamedytyte, D.; Simanaviciene, V.; Dauksiene, D.; Leipute, E.; Zvirbliene, A.; Kazokaite, M.; Sarauskas, V.; Dauksa, A.; Verkauskienė, R.; Zilaitienė, B. SAT-LB096 Relationship between MicroRNA Expression Levels and Clinicopathological Parameters and Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. *J. Endocr. Soc.* **2019**. [[CrossRef](#)]
45. Samsonov, R.; Burdakov, V.; Shtam, T.; Radzhabova, Z.; Vasilyev, D.; Tsyrlina, E.; Titov, S.; Ivanov, M.; Berstein, L.; Filatov, M.; et al. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 12011–12021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ortiz, I.M.D.P.; Camargo Barros-Filho, M.; Bisarro Dos Reis, M.; Moraes Beltrami, C.; Albuquerque Marchi, F.; Kuasne, H.; Matos do Canto, L.; Homem de Mello, J.B.; Abildgaard, C.; Lopes Pinto, C.A.; et al. Loss of DNA methylation is related to increased expression of miR-21 and miR-146b in pa-pillary thyroid carcinoma. *Clin. Epigenetics* **2018**, *10*, 144. [[CrossRef](#)]
47. Zhao, L.; Zhang, X.; Cui, S. Matrine inhibits TPC-1 human thyroid cancer cells via the miR-21/PTEN/Akt pathway. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 2965–2970. [[CrossRef](#)]
48. Sondermann, A.; Andreghetto, F.M.; Moullet, A.C.B.; Victor, E.D.S.; De Castro, M.G.; Nunes, F.D.; Brandão, L.G.; Severino, P. MiR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 521–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhang, H.; Cai, Y.; Zheng, L.; Zhang, Z.; Lin, X.; Jiang, N. LncRNA BISPR promotes the progression of thyroid papillary carcinoma by regulating miR-21-5p. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2018**, *32*. [[CrossRef](#)]
50. Wang, D.; Tang, X.; Liang, Q.; Zeng, X.; Yang, J.; Xu, J. microRNA-599 promotes apoptosis and represses proliferation and epithelial-mesenchymal transition of papillary thyroid carcinoma cells via downregulation of Hey2-dependent Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 2492–2505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Ma, S.; Jia, W.; Ni, S. miR-199a-5p inhibits the progression of papillary thyroid carcinoma by targeting SNAI1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *497*, 181–186. [[CrossRef](#)]
52. Zhang, W.; Ji, W.; Li, T.; Liu, T.; Zhao, X. MiR-145 functions as a tumor suppressor in Papillary Thyroid Cancer by inhibiting RAB5C. *Int. J. Med. Sci.* **2020**, *17*, 1992–2001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yin, H.; Shao, J. MicroRNA-643 promotes proliferation and inhibits apoptosis of papillary thyroid carcinoma by down-regulating the cytochrome P450 family member 11B1. *Transl. Cancer Res.* **2020**, *9*, 1465–1475. [[CrossRef](#)]
54. Zhao, J.; Li, Z.; Chen, Y.; Zhang, S.; Guo, L.; Gao, B.; Jiang, Y.; Tian, W.; Hao, S.; Zhang, X. MicroRNA-766 inhibits papillary thyroid cancer progression by directly targeting insulin receptor substrate 2 and regulating the PI3K/Akt pathway. *Int. J. Oncol.* **2018**, *54*, 315–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hu, N.; Tian, Y.; Song, Y.; Zang, L. miR-122-5p suppresses the oncogenesis of PTC by inhibiting DUSP4 expression. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *23*, 368. [[CrossRef](#)]

56. Haugen, B.R.; Alexander, E.K.; Bible, K.C.; Doherty, G.M.; Mandel, S.J.; Nikiforov, Y.E.; Pacini, F.; Randolph, G.W.; Sawka, A.M.; Schlumberger, M.; et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* **2016**, *26*, 1–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Pantanowitz, L.; Thompson, L.D.; Jing, X.; Rossi, E.D. Is thyroid core needle biopsy a valid complement to fine-needle aspiration? *J. Am. Soc. Cytopathol.* **2020**, *9*, 383–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Castagna, M.G.; Marzocchi, C.; Pilli, T.; Forleo, R.; Pacini, F.; Cantara, S. MicroRNA expression profile of thyroid nodules in fine-needle aspiration cytology: A con-firmatory series. *J. Endocrinol. Investig.* **2019**, *42*, 97–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Mahmoudian-Sani, M.-R.; Amrollahi-Sharifabadi, M.; Taheri, A.; Hosseini, S.M.; Tahmasebi, K.; Mobini, G.-R. Diagnostic value of the candidate microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy (FNAB) samples. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2020**, *41*, 20190027. [[CrossRef](#)]
60. Chen, Y.-T.; Kitabayashi, N.; Zhou, X.K.; Fahey, T.J.; Scognamiglio, T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. *Mod. Pathol.* **2008**, *21*, 1139–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Santos, M.T.D.; Buzolin, A.L.; Ribeiro Gama, R.; Albino da Silva, E.C.; Mucha Dufloth, R.; Livingstone Alves Figueiredo, D.; Lopes Carvalho, A. Molecular Classification of Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: Development and Validation of a Highly Sensitive and Specific New miRNA-Based Classifier Test Using Fine-Needle Aspiration Smear Slides. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **2018**, *28*, 1618–1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Mazeh, H.; Deutch, T.; Karas, A.; Bogardus, K.A.; Mizrahi, I.; Gur-Wahnon, D.; Ben-Dov, I.Z. Next-Generation Sequencing Identifies a Highly Accurate miRNA Panel That Distinguishes Well-Differentiated Thyroid Cancer from Benign Thyroid Nodules. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2018**, *27*, 858–863. [[CrossRef](#)]
63. Labourier, E.; Shifrin, A.; Busseniers, A.E.; Lupo, M.A.; Manganelli, M.L.; Andrus, B.; Wylie, D.; Beaudenon-Huibregtse, S. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 2743–2750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wang, Z.; Lv, J.; Zou, X.; Huang, Z.; Zhang, H.; Liu, Q.; Jiang, L.; Zhou, X.; Zhu, W. A three plasma microRNA signature for papillary thyroid carcinoma diagnosis in Chinese patients. *Gene* **2019**, *693*, 37–45. [[CrossRef](#)]
65. Liang, M.; Yu, S.; Tang, S.; Bai, L.; Cheng, J.; Gu, Y.; Li, S.; Zheng, X.; Duan, L.; Wang, L.; et al. A Panel of Plasma Exosomal miRNAs as Potential Biomarkers for Differential Diagnosis of Thyroid Nodules. *Front. Genet.* **2020**, *11*, 449. [[CrossRef](#)]
66. Dai, D.; Tan, Y.; Guo, L.; Tang, A.; Zhao, Y. Identification of exosomal miRNA biomarkers for diagnosis of papillary thyroid cancer by small RNA sequencing. *Eur. J. Endocrinol.* **2020**, *182*, 111–121. [[CrossRef](#)]
67. Li, M.; Song, Q.; Li, H.; Lou, Y.; Wang, L. Circulating miR-25-3p and miR-451a May Be Potential Biomarkers for the Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132403.
68. Lee, J.C.; Zhao, J.T.; Clifton-Bligh, R.J.; Gill, A.; Gundara, J.S.; Ip, J.C.; Glover, A.; Sywak, M.S.; Delbridge, L.W.; Robinson, B.G.; et al. MicroRNA-222 and MicroRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer* **2013**, *119*, 4358–4365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Lee, Y.S.; Lim, Y.S.; Lee, J.-C.; Wang, S.-G.; Park, H.-Y.; Kim, S.Y.; Lee, B.-J. Differential expression levels of plasma-derived miR-146b and miR-155 in papillary thyroid cancer. *Oral Oncol.* **2015**, *51*, 77–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Jiang, K.; Li, G.; Chen, W.; Song, L.; Wei, T.; Li, Z.; Gong, R.; Lei, J.; Shi, H.; Zhu, J. Plasma Exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are Potential Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinomas. *Oncotargets Ther.* **2020**, *13*, 1311–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kondrotienė, A.; Daukša, A.; Pamedytytė, D.; Kazokaitė, M.; Žvirblienė, A.; Daukšienė, D.; Simanavičienė, V.; Klimaitė, R.; Golubickaitė, I.; Stakaitis, R.; et al. Plasma-Derived miRNA-222 as a Candidate Marker for Papillary Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Perdas, E.; Stawski, R.; Kaczka, K.; Zubrzycka, M. Analysis of Let-7 Family miRNA in Plasma as Potential Predictive Biomarkers of Diagnosis for Papillary Thyroid Cancer. *Diagnostics* **2020**, *10*, 130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Ricarte-Filho, J.C.M.; Fuziwara, C.S.; Shimura Yamashita, A.; Rezende, E.; Januário da-Silva, M.; Teruko Kimura, E. Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer. *Transl. Oncol.* **2009**, *2*, 236–241. [[PubMed](#)]
74. Xing, M.; Alzahrani, A.S.; Carson, K.A.; Shong, Y.K.; Kim, T.Y.; Viola, D.; Elisei, R.; Bendlová, B.; Yip, L.; Mian, C.; et al. Association Between BRAF V600E Mutation and Recurrence of Papillary Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 42–50. [[CrossRef](#)]
75. Chou, C.K.; Yang, K.D.; Chou, F.-F.; Huang, C.-C.; Lan, Y.-W.; Lee, Y.-H.; Kang, H.-Y.; Liu, R.-T. Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E196–E205. [[CrossRef](#)]
76. Kotlarek, M.; Kubiak, A.; Czetwertyńska, M.; Świerniak, M.; Gierlikowski, W.; Kolanowska, M.; Bakuła-Zalewska, E.; Jhiang, S.M.; Jażdżewski, K.; Wójcicka, A. The rs2910164 Genetic Variant of miR-146a-3p Is Associated with Increased Overall Mortality in Patients with Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Jikuzono, T.; Kawamoto, M.; Yoshitake, H.; Kikuchi, K.; Akasu, H.; Ishikawa, H.; Hirokawa, M.; Miyauchi, A.; Tsuchiya, S.; Shimizu, K.; et al. The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2013**, *42*, 1858–1868. [[CrossRef](#)]

78. Pamedylyte, D.; Simanaviciene, V.; Dauksiene, D.; Leipute, E.; Zvirbliene, A.; Sarauskas, V.; Dauksa, A.; Verkauskiene, R.; Zilaitiene, B. Association of MicroRNA Expression and BRAF(V600E) Mutation with Recurrence of Thyroid Cancer. *Biomolecules* **2020**, *10*, 625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Silaghi, C.A.; Lozovanu, V.; Silaghi, H.; Georgescu, R.D.; Pop, C.; Dobrea, A.; Georgescu, C.A. The Prognostic Value of MicroRNAs in Thyroid Cancers-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers* **2020**, *12*, 2608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer

Mariusz Rogucki ¹, Iwona Sidorkiewicz ², Magdalena Niemira ², Janusz Bogdan Dziecioł ³, Angelika Buczyńska ², Agnieszka Adamska ¹, Katarzyna Siewko ¹, Maria Kościuszko ¹, Katarzyna Maliszewska ¹, Anna Wójcicka ⁴, Jakub Supronik ¹, Małgorzata Szlachowska ¹, Joanna Reszeć ⁵, Adam Jacek Krętowski ^{1,2,†} and Anna Popławska-Kita ^{1,*,†}

¹ Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; mariusz.rogucki@sd.umb.edu.pl (M.R.); ak001@wp.pl (A.A.); katarzynasiewko@o2.pl (K.S.); maria.kosciuszko@umb.edu.pl (M.K.); katarzyna.maliszewska2@umb.edu.pl (K.M.); jakubsupronik@uskwb.pl (J.S.); mszelachowska@poczta.onet.pl (M.S.); adam-kretowski@wp.pl (A.J.K.)

² Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; iwona.sidorkiewicz@umb.edu.pl (I.S.); magdalena.niemira@umb.edu.pl (M.N.); angelika.buczynska@umb.edu.pl (A.B.)

³ Department of Human Anatomy, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland; janusz.dzieciol@umb.edu.pl

⁴ Warsaw Genomics Inc., 01-682 Warszawa, Poland; anna.wojcicka@warsawgenomics.pl

⁵ Department of Medical Pathomorphology, Faculty of Medicine, Medical University of Białystok, 15-269 Białystok, Poland; joasia@umb.edu.pl

* Correspondence: annapoplawskakita@op.pl; Tel.: +48-858318239

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Rogucki, M.; Sidorkiewicz, I.; Niemira, M.; Dziecioł, J.B.;

Buczyńska, A.; Adamska, A.; Siewko, K.; Kościuszko, M.; Maliszewska, K.; Wójcicka, A.; et al. Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 2679. <https://doi.org/10.3390/cancers14112679>

Academic Editors: Borson-Chazot Françoise and Christelle De La Fouchardière

Received: 30 March 2022

Accepted: 25 May 2022

Published: 28 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: In recent years, the incidence of papillary thyroid cancer (PTC) has increased in many countries worldwide. MicroRNAs appear to be important regulators of PTC, but a better understanding of their role is needed to develop novel diagnostic tools and identify potential vulnerabilities. In this study, we aimed to gain insight into the microRNA profile of PTC tissue. Consequently, crucial pathways in PTC were highlighted. A panel of four microRNAs (miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p, and miR-7-5p) was proposed as a PTC diagnostic biomarker. Our analysis indicated that microRNAs are a potential diagnostic tool for PTC patients.

Abstract: The incidence of papillary thyroid cancer (PTC) has increased in recent years. To improve the diagnostic management of PTC, we propose the use of microRNAs (miRNAs) as a biomarker. Our aim in this study was to evaluate the miRNA expression pattern in PTC using NanoString technology. We identified ten miRNAs deregulated in PTC compared with reference tissue: miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-34-5p, miR-551b-3p, miR-152-3p, miR-15a-5p, miR-31-5p, and miR-7-5p (FDR < 0.05; |fold change (FC)| ≥ 1.5). The gene ontology (GO) analysis of differentially expressed miRNA (DEM) target genes identified the predominant involvement of epidermal growth factor receptor (EGFR), tyrosine kinase inhibitor resistance, and pathways in cancer in PTC. The highest area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) for DEMs was found for miR-146-5p (AUC = 0.770) expression, indicating possible clinical applicability in PTC diagnosis. The combination of four miRNAs (miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p, and miR-7-5p) showed an AUC of 0.841. Validation by real-time quantitative polymerase chain reactions (qRT-PCRs) confirmed our findings. The introduction of an miRNA diagnostic panel based on the results of our study may help to improve therapeutic decision making for questionable cases. The use of miRNAs as biomarkers of PTC may become an aspect of personalized medicine.

Keywords: microRNA; papillary thyroid cancer; biomarker

1. Introduction

Thyroid cancer remains the most common malignancy among endocrine tumors. In 2020, an estimated 586,000 cases of thyroid cancer were diagnosed worldwide [1]. In addition, the estimated number of papillary thyroid cancer (PTC) cases in 2022 in the United States was 43,800 [2]. PTC accounts for the majority of all differentiated thyroid cancer diagnoses [3] and is the most common type of thyroid malignancy, with its incidence notably increasing in recent decades [4]. The increase in the rate of diagnosed PTC cases is primarily due to detection improvements, even in small, indolent thyroid nodules [5]. Despite having a good prognosis, up to 10% of identified PTC cases metastasize or contribute to death during cancer progression [6]. Nevertheless, the prognosis for the majority of PTCs is favorable in terms of long-term survival, although recurrence occurs in 25–30% of PTC patients [7–9].

Ultrasound, commonly used in screening PTC, has detected thyroid nodules in up to 68% of examined patients [10]. However, the gold standard for detecting PTC is fine-needle aspiration biopsy (FNAB) performed under ultrasound guidance [11]. FNAB is inexpensive, highly accurate, minimally invasive, and safe, with a low complication rate [12]. However, up to 10% of the obtained FNAB results are nondiagnostic [13]. In addition, FNAB does not provide complete information about the clinical nature of tumors, such as the presence of angioinvasion features, which may affect further management [14]. As such, novel diagnostic biomarkers that are equivalent thyroid cancer diagnostic tools need to be identified [15,16].

Numerous molecular alterations, such as changes in microRNA (miRNA) expression, are associated with the clinicopathological features of PTCs [17]. Moreover, miRNAs are implicated in many tumor-promoting gene deregulations in PTC [18,19]. Several miRNAs, their effect on PTC cells, and the potential utility as therapeutic targets and/or prognostic markers have been studied [20]. Nevertheless, there is still a need to identify the pathways that could be possibly targeted and be considered useful for facilitating PTC diagnosis. Considering PTC is a heterogeneous neoplasm from both morphological and molecular points of view, comprehensive research on epigenetic alterations as potential diagnostic markers in PTC is of high importance [21]. Introducing miRNA expression patterns to the diagnostic protocol may also aid personalized clinical management. Undoubtedly, miRNA diagnostic applications may improve PTC detection, thus reducing the need for patients to undergo invasive procedures. Therefore, our broad goal in the current study was to evaluate miRNA expression patterns in early PTC compared to normal thyroid gland tissue. Consequently, the results of this study highlight the new molecular features of PTC and provide insight into the events underlying its development and progression. Moreover, we assessed the diagnostic significance of selected miRNAs as possible PTC biomarkers.

2. Materials and Methods

2.1. Study Subjects

We conducted this study using postoperative material from the Department of Endocrinology Diabetology and Internal Medicine at the Medical University of Białystok in Poland. We collected PTC tissues from patients with different tumor stages according to tumor-node-metastasis (TNM) classification and confirmed by a histopathological examination. We obtained the specimens from postoperative formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks. The control group consisted of specimens from the same patients with normal nontumor tissues. Control tissues were confirmed by a pathomorphologist and did not contain PTC cells or other lesions. Due to rapid tumor progression, we could not obtain nontumor tissues from 2 patients with PTC. Patients without a diagnosis of PTC upon postoperative histopathological examination and patients with metastatic PTC in the lymph nodes were excluded from the study. Additional exclusion criteria included other comorbidities, chronic conditions, immunosuppressive treatment, and cigarette smoking. Consequently, we included 80 FFPE tissue samples (41 PTC tissues and 39 reference tissues without malignant processes) in the study (Table 1). The study protocol was approved in

advance by the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (approval number: R-I-002/491/2019), and written informed consent was obtained from each participant.

Table 1. Characteristics of the study group.

Characteristic	Samples of PTC
Total	41
Men/women	8/33
pT1	31
pT2	5
pT3	2
pT4	3
Men: Age at diagnosis—mean (range)	59.7 (41–77)
Women: Age at diagnosis—mean (range)	53.1 (30–77)
Diameter of the tumor—mean (mm)	10.5
Number of samples with features of angioinvasion	12
Number of samples with multifocal features	27

PTC- Papillary Thyroid Cancer.

2.2. Detection of the miRNA Profiles

We extracted miRNAs from 3 consecutive 10 μm -thick FFPE sections. A pathologist identified tumor-rich regions (at least 50% of the tissue area evaluated was PTC cells) of interest to minimize the risk of false-negative results. The total RNA, including the miRNA fraction, was isolated using a deparaffinization solution and an miRNeasy FFPE extraction kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). We assessed the miRNA concentration using a Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). We prepared the samples for nCounter miRNA expression profiling according to the manufacturer's recommendations (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA). Briefly, we prepared 100 ng of miRNA samples by ligating a specific miR tag onto the 3' end of each mature miRNA, followed by an overnight hybridization (65 °C) with nCounter Reporter and Capture probes. Subsequently, the samples were placed into the nCounter Prep Station for automated sample purification and reporter capture. Each sample was scanned on an nCounter Digital Analyzer for data collection. We deposited the NanoString data in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE191117).

2.3. Validation of the NanoString Results by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

For the validation experiments, we used a miRCURY LNA RT Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol, to reverse transcribe the miRNA samples (41 PTC samples and 39 control thyroid tissues) on a BioRad S1000 thermal cycler (Mississauga, ON, Canada). Then, the candidate miRNAs were quantified by qRT-PCR using specific primers and a miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen). We ran the samples in duplicate on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland). We used miR-103a-3p and U6 snRNA as the endogenous controls, and the NormFinder algorithm (Department of Molecular Medicine (MOMA), Aarhus University Hospital, Aarhus N, Denmark) was used to calculate their stability. The relative miRNA expression was calculated using qBase MSExcels VBA based on multiple samples and multiple reference miRNAs. The qBase converts the Ct values from all runs within one experiment to normalized and rescaled quantities that can be visualized in graphs [22]. Fold change (FC) values were provided using the GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen; geneglobe.qiagen.com, accessed on 23 February 2022).

2.4. Data Analysis

We used the nSolver 4.0 Analysis software (NanoString) for data analysis and normalization using the average geometric mean of the top 100 probes detected. We used a false discovery rate (FDR) correction for multiple comparisons, limited to 0.5, to adjust the p values. The threshold value for the significance used to define differentially expressed miRNAs (DEMs) was $|\text{fold change (FC)}| \geq 1.5$.

Statistical analyses were performed with GraphPad PRISM (v. 9.1.1.; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Preliminary statistical analysis (Shapiro–Wilk test) revealed that the studied parameters did not follow a normal distribution. Consequently, we performed nonparametric tests between groups. All the data are presented as medians and ranges. The areas under the receiver operating characteristic (ROC) curves (AUCs) for DEMs were calculated.

We prepared a logistic regression model by combining the DEMs, and we used the WEKA tool (Weka, version 3.8.5, Hamilton, New Zealand) to discriminate between PTC and the control tissue. For the comparison of PTC vs. control, we chose specific miRNAs for the feature selection. Models based on logistic regression, naive Bayes, and tree-based J48 algorithms were established. For each combination, confusion matrices were prepared to evaluate the model. We measured the performance of the multi-miRNA classifiers using the classification precision and the AUC.

2.5. miRNA Target Prediction and Functional Annotation of the Selected miRNA Targets

To examine the functions of the identified miRNAs, miRNA target prediction was performed using MicroRNA ENrichment TURned NETwork (MIENTURNET, Rome, Italy) [23]. We used the following online databases and carried out Gene Ontology (GO) analysis and functional annotation clustering to examine the functions of the identified target genes: the Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool (GORilla; <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>, accessed on 2 February 2022), DAVID (GO and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Enrichment Analysis: <https://david.ncifcrf.gov/>, accessed on 2 February 2022, g: Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gos>, accessed on 2 February 2022), and Metascape (<https://metascape.org>, accessed on 2 February 2022). To identify highly connected hub genes in protein–protein interactions, we used the Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) database (with an interaction score > 0.4) [24] and the CytoHubba plugin based on Cytoscape version 3.8.2 (<http://cytoscape.org/>, accessed on 30 March 2022) [25].

3. Results

3.1. miRNA Profile in Papillary Thyroid Cancer

To determine the tumor-specific miRNA expression pattern, we profiled the tissue expression of 798 miRNAs using the NanoString Technology platform. The differential expression of ten miRNAs was detected between the studied groups (Table 2). Specifically, eight miRNAs were upregulated and two were downregulated in PTC compared to controls based on a threshold $\text{FDR} < 0.05$ and an $|\text{FC}| \geq 1.5$.

3.2. miRNA Target Genes

We predicted the DEMs' target genes using MIENTURNET, a web tool designed to obtain computationally predicted and/or experimentally validated target genes from TargetScan and miRTarBase. The results indicated 725 putative target genes for the miRNAs based on a minimum threshold of two miRNA–target interactions. The STRING database was used to visualize the protein relationships (Figure 1).

Table 2. miRNAs with significantly different expression between PTC and the control group (FDR < 0.05 and |FC| ≥ 1.5).

miRNA	FC	p-Value	FDR
miR-146b-5p	6.62	0.00000001	0.00
miR-221-3p	3.23	0.00000001	0.00
miR-221-5p	2.36	0.00000016	0.00
miR-222-3p	2.94	0.00000001	0.00
miR-34a-5p	1.65	0.00002568	0.00
miR-551b-3p	2.63	0.00000003	0.00
miR-152-3p	−1.53	0.00040006	0.01
miR-15a-5p	1.57	0.00031352	0.01
miR-31-5p	1.60	0.00051338	0.02
miR-7-5p	−2.57	0.00108612	0.03

FC, fold change; FDR, false discovery rate.

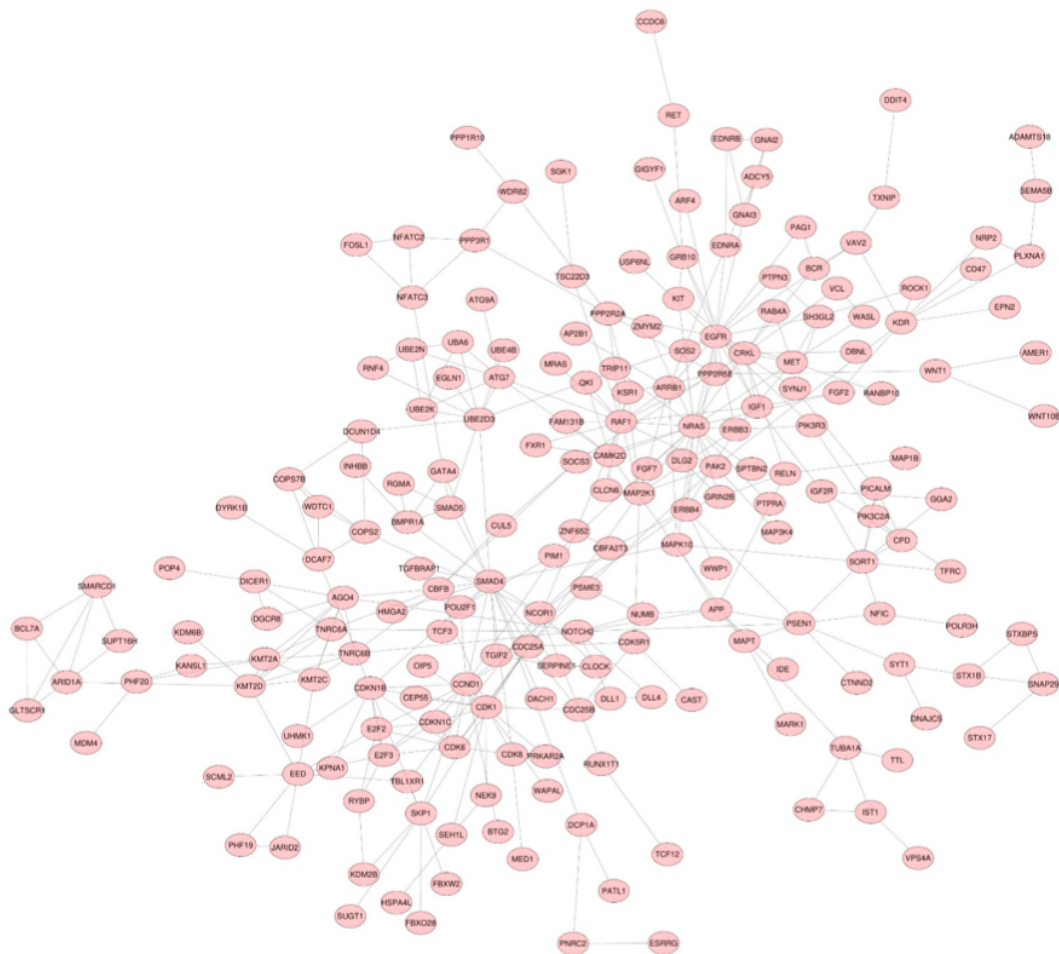


Figure 1. Target genes of DEMs rendered using STRING database. Only connected nodes are present. Only interactions with high confidence interaction scores (>0.9) are shown. The PPI enrichment value was predicted to be 8.44×10^{-15} .

3.3. Functional Enrichment Analysis

To obtain insights into the biomolecular significance of the identified target genes of the DEMs, we performed GO analysis with various databases and obtained enriched GO terms. The GO analysis of the PTC network biological process revealed a predominant role of the following categories: ‘nervous system development’, ‘neurogenesis’, and ‘regulation of nitrogen compound metabolic process’. ‘Nucleoplasm’, ‘nuclear lumen’, and ‘intracellular organelle’ were among the significantly associated cellular component categories. Furthermore, the genes of the GO molecular functions are involved in ‘enzyme binding’, ‘protein kinase binding’, and ‘protein binding’. Additionally, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis confirmed that ‘epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor resistance’, ‘pathways in cancer’, and ‘mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway’ are predominantly involved in PTC’s pathogenesis (Figure 2).

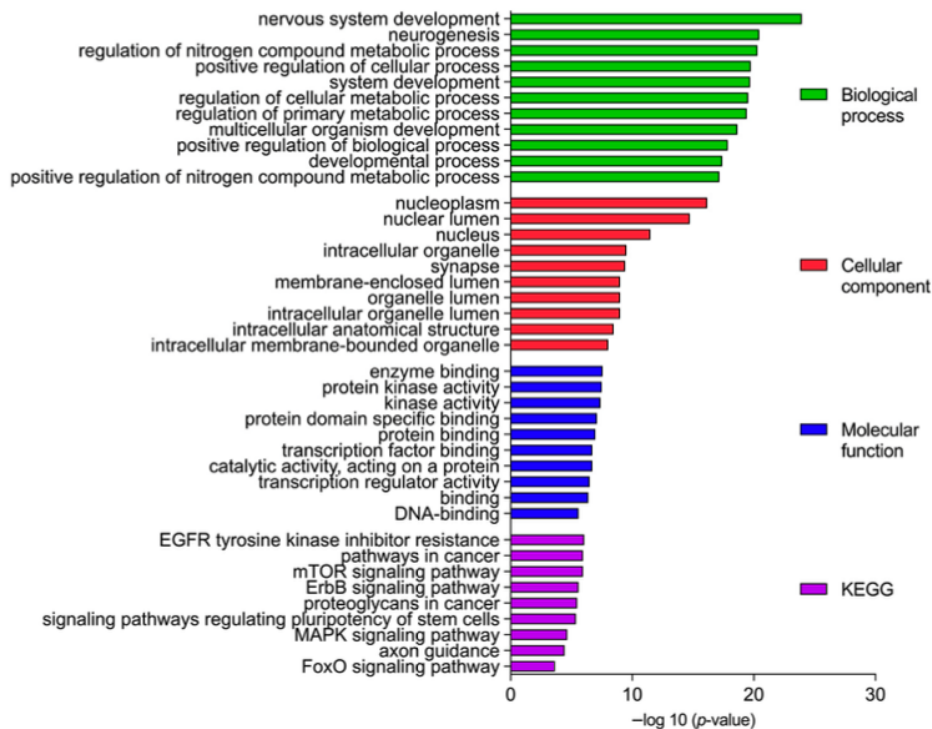


Figure 2. Gene Ontology (GO) enrichment analysis. Top 10 significantly enriched GO (−log₁₀(p-value)) categories of the target genes in the cellular components, molecular function, biological processes, and KEGG enrichment. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

3.4. Hub Gene Identification

To further examine the protein–protein interactions (PPIs) of the DEM target genes, we used the Cytoscape software; we used the Maximal Clique Centrality (MCC) algorithm in the cytoHubba plugin to identify the top 10 hub genes in the PPI network (Figure 3, Table 3). The top 10 hub genes were mitogen-activated protein kinase 1 (*MAP2K1*), Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (*RAF1*), insulin receptor substrate 1 (*IRS1*), epidermal growth factor receptor (*EGFR*), KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase (*KIT*), kinase insert domain receptor (*KDR*), Erb-B2 receptor tyrosine kinase 3 (*ERBB3*), NRAS proto-oncogene, GTPase (*NRAS*), phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (*PIK3R1*), and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta (*PIK3CB*).

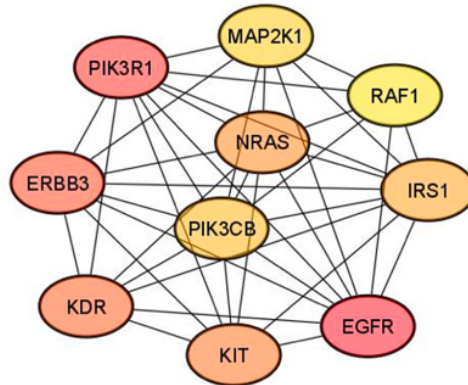


Figure 3. The networks of the top 10 hub genes.

Table 3. Top 10 hub genes.

Hub Gene	DEMs Targeting Hub Gene
MAP2K1	miR-152-3p; miR-15a-5p; miR-34a-5p
RAF1	miR-15a-5p; miR-7-5p
IRS1	miR-15a-5p; miR-7-5p
EGFR	miR-152-3p; miR-221-3p; miR-222-3p; miR-7-5p
KIT	miR-152-3p; miR-221-3p; miR-222-3p
PIK3CB	miR-146b-5p; miR-7-5p
NRAS	miR-146b-5p; miR-152-3p
KDR	miR-15a-5p; miR-221-3p; miR-222-3p
ERBB3	miR-152-3p; miR-221-3p; miR-222-3p
PIK3R1	miR-15a-5p; miR-221-3p; miR-222-3p

MAP2K1, mitogen-activated protein kinase 1; RAF1, Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase; IRS1, insulin receptor substrate 1; EGFR, epidermal growth factor receptor; KIT, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; KDR, kinase insert domain receptor; ERBB3, Erb-B2 receptor tyrosine kinase 3; NRAS, NRAS proto-oncogene, GTPase; PIK3R1, phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1; PIK3CB, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta.

3.5. Receiver Operating Characteristic Curve Analysis

We evaluated the diagnostic value of the DEMs as candidate PTC biomarkers using the AUCs. All the identified DEMs showed significantly higher AUCs compared with AUC = 0.500, excluding miR-31-5p ($p > 0.05$). The highest AUC, indicating possible clinical usefulness in PTC diagnosis, was observed for miR-146-5p (AUC = 0.770), miR-551-3p (AUC = 0.740), and miR-222-3p (AUC = 0.720) (Figure 4).

3.6. Logistic Regression Model

Using a logistic regression model, we screened the DEMs for constructing an miRNA-based PTC diagnostic signature. Logistic regression is a supervised learning algorithm commonly used for binary classification tasks. Intercept and coefficients are parts of the model, intercept is the log odds when the variable is 0, this means the absence of PTC. Coefficients describe how much the log odds change with the presence of PTC. True positive, false positive, precision, and AUC values describe the diagnostic usefulness of the model.

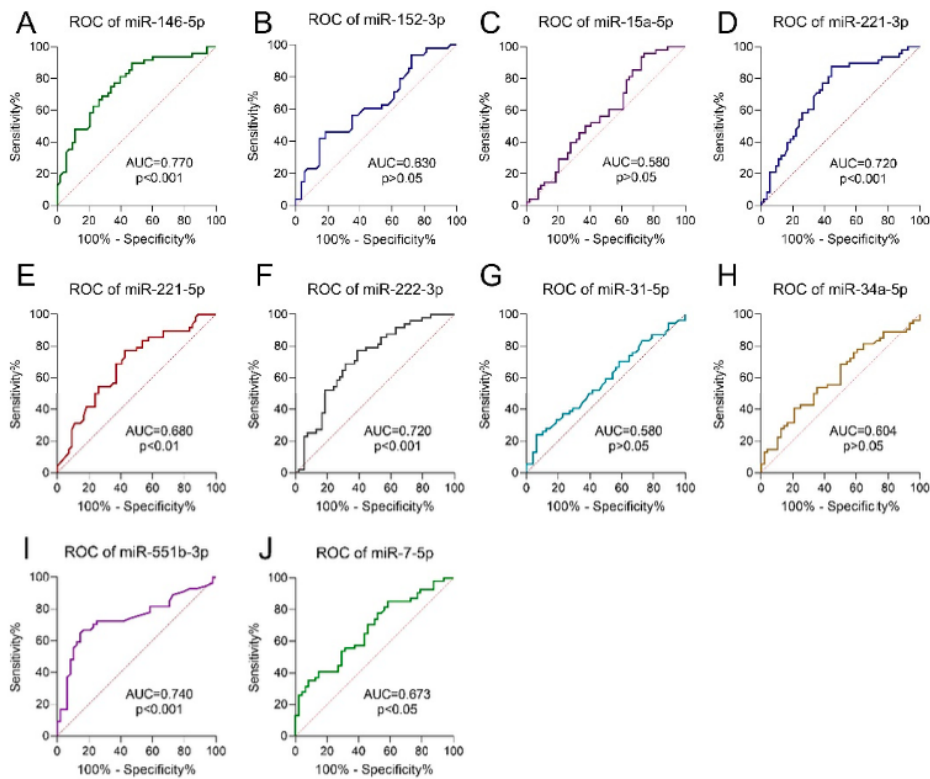


Figure 4. ROC analysis was conducted to evaluate the diagnostic value of the DEMs as diagnostic biomarkers of PTC vs. control: (A) miR-146-5p; (B) miR-152-3p; (C) miR-15a-5p; (D) miR-221-3p; (E) miR-221-5p; (F) miR-222-3p; (G) miR-31-5p; (H) miR-34a-5p; (I) miR-551b-3p; (J) miR-7-5p. AUC values were calculated to estimate diagnostic performance of the DEMs in PTC. *p*-values indicate a significant difference from AUC = 0.5 (borderline of the diagnostic usefulness of the test).

The feature selection chose four DEMs with the highest diagnostic values, and a logistic regression model was constructed. The parameters of the model and the common quality measures are summarized in Table 4. The AUC value obtained for a combination of miR-152-3p + miR-221-3p + miR-551b-3p + miR-7-5p (AUC = 0.841) had a higher diagnostic value than the highest AUC for an miRNA used separately—miR-146-5p (AUC = 0.770).

Table 4. Summary of the basic parameters and common quality measures of the models.

Model	TP Rate	FP Rate	Precision	AUC	Intercept	Coefficient
$x_1 = \text{miR-152-3p}$	0.769	0.227	0.774	0.841	−1.8033	$a_1 = -1.2104$
$x_2 = \text{miR-221-3p}$						$a_2 = 0.8173$
$x_3 = \text{miR-551b-3p}$						$a_3 = 0.5172$
$x_4 = \text{miR-7-5p}$						$a_4 = -0.0178$

TP, true positive; FP, false positive; AUC, area under the receiver operating characteristic curve.

3.7. Data Validation

We validated the DEMs from the miRNA-based diagnostic signature to verify the results of the NanoString analysis. We investigated 80 FFPE samples from the PTC and control groups using qRT-PCR to determine the relative expression levels of the four

discovered DEMs (Figure 5A–D). The validation results demonstrated high similarity to the expression profiles established by NanoString, thus confirming the importance of all the DEMs included in the logistic regression model.

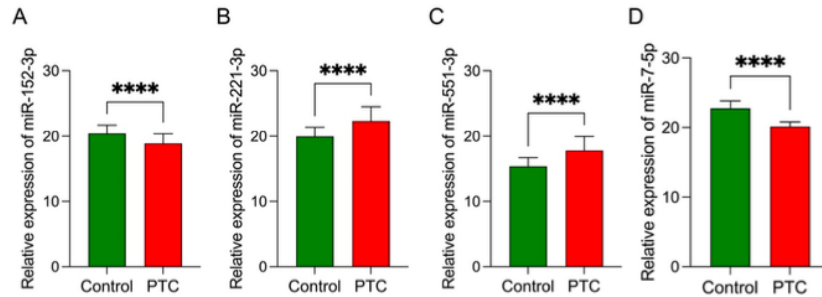


Figure 5. Relative expression of DEMs included in the logistic regression model in control (N = 39) and PTC samples (N = 41): (A) miR-152-3p (Fold change (FC) = 0.37); (B) miR-221-3p (FC = 5.78); (C) miR-551b-3p (FC = 5.68); (D) miR-7-5p (FC = 0.18). Each bar represents the geometric mean \pm standard error of mean of the ratio of miRNA expression and reference miRNAs (miR-103a-3p and U6 snRNA) calculated using the qBase MSEExcel VBA based on multiple samples and multiple reference miRNAs. Asterisks indicate the levels of significance of differences (**** $p < 0.0001$); Mann–Whitney U-test was used to compare PTC and control samples. PTC, papillary thyroid cancer. FC values were provided using the GeneGlobe Data Analysis Center.

4. Discussion

The rapid development of high-resolution technologies has increased the detection rate for thyroid cancer [26]. However, the invasive FNAB procedure still remains the diagnostic tool of choice [27]. Despite the high accuracy, safety, and cost effectiveness of this method [28], patients undergoing FNAB are at risk of several complications, such as a hematoma at the injection site or pain via ecchymosis, swelling, and inadvertent punctures to the trachea, carotid artery, or jugular vein [29]. Moreover, up to 10% of FNAB results are nondiagnostic [30]. Hence, novel screening and diagnostic markers, using highly specialized techniques that can increase the PTC detection rate, are still being evaluated. Our results confirmed that FFPE tissues are suitable resources for such miRNA expression analyses and could be useful in the management algorithm of patients with thyroid nodules.

The further identification of potential biomarkers useful in the diagnosis and prognosis of PTC is needed. In our study, we determined the overall miRNA expression profile with NanoString technology and the RT-PCR method was used to confirm selected miRNAs expression. MiRNAs can easily be detected in various types of specimens by methods such as microarrays, nCounter technology, or RT-PCR. The large-scale methods allow the analysis of miRNA patterns that comprise numerous miRNAs providing valuable insight into the regulation of many biological processes. Considering miRNA analysis in PTC, the method used (small RNA sequencing, microarray, PCR method), type of specimen (FFPE, FNAB, frozen tissue), inclusion/exclusion criteria (presence of comorbidities, metastases), type of reference tissue (normal tissue paired from cancer patients, normal tissue from healthy patients, benign tissue), and histologic type of cancer should also be taken into consideration when comparing and interpreting the results [31,32]. Reports on selective miRNA expression using the PCR method do not allow to assess the miRNA fingerprint for diagnosis. Thus, the improved standardization of methods used to evaluate miRNAs expression may support their introduction in the personalized medicine approach in PTC patients. Significant literature data have already been accumulated on the particular miRNA expression in a specific type of specimens in PTC [33–36], however, miRNA expression pattern using large-scale methods with subsequent data validation are still

needed to fill in the data gap. Our miRNA combination distinguishes between early PTC and normal tissue, thus additional studies including benign tissues should be performed to confirm the diagnostic usefulness of the miRNA panel. What should be also noted is that the proposed diagnostic tool is incapable of differentiating metastatic PTC from normal thyroid gland tissue. Metastatic PTC were excluded to obtain homogenous PTC cohort, which was also helpful to comprehensively describe tumor-initiating alterations in miRNA expression pattern [37]. Literature data suggest distinct miRNA expression pattern associated with lymph node metastasis in PTC patients [38]. It is worth noting that the data on the diagnostic value of the miRNA profile in differentiation between metastatic PTC and non-metastatic PTC patients are limited.

Notably, miRNA deregulation has been implicated in the development of many different cancers, including thyroid cancer [20,39]. Literature data show a relationship between the expression of various miRNAs in thyroid cancer and the TNM classification [17,36]. The evaluation of PTC pathogenesis particularly emphasizes the deregulation of miR-146b, miR-221, miR-222, miR-181b, and miR-21 [40]. Deregulation of miR-146b affects the MAPK/ERK and TGF- β pathways, thus increasing the risk of vascular invasion and metastasis to lymph nodes and distant organs [36]. Another miRNA implicated in the pathogenesis of PTC is miR-181b whose upregulation affects the inhibition of apoptosis and promotion of cell division [41]. Increased miR-221, miR-222, miR-146a, and miR-146b expression has been also associated with high-risk PTC features [18,42,43]. Increased expression of miR-221 and miR-222 is implicated in increased tumor size and increased probability of angiogenesis, lymph node and distant organ metastasis [42,44]. OncomiRs miR-221 and miR-222 were also associated with less differentiated tumors and reported to play a role in PTC aggressiveness [37]. Moreover, the downregulation of the expression of miR-21 and miR-9 has been implicated in the recurrence of PTC tumors [19]. Downregulation of miR-9 has an effect on cyclin D1 overexpression and p27 underexpression, which in turn predicts lymph node metastasis in PTC [45]. Downregulation of miR-21 affects overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1). This results in increased PTC aggression manifested, for example, by lymph node metastasis [46].

Furthermore, the miRNA expression pattern bears potential as a PTC biomarker. Park et al. demonstrated three miRNAs (miR-136, miR-21, miR-127) as diagnostic and prognostic markers of PTC [47]. Zei et al. in their study demonstrated that miR-155 causes downregulation of sex-determining region Y-box 17 (Sox17) and overexpression of inflammatory cytokine interleukin (IL22). This promotes the migration of PTC cells [48]. Another biomarker that could differentiate PTC from benign lesions is miR-155 [36]. Moreover, the let-7 family, which downregulates RAS expression, has the potential to be a biomarker of PTC [49]. Geraldo et al. point out that let-7f, in combination with miR-146-5p, can be a prognostic tool in PTC [50]. In another study, Ma et al. showed that miR-199a-5p acts by inhibiting snail family zinc finger 1 (*SNAI1*), resulting in *SNAI1* overexpression and increased PTC proliferation [51]. In a recent study, downregulation of miR-363-3p was found to inhibit PTC progression by targeting NIN1/RPN12 binding protein 1 (*NOBI*) [52]. In contrast, Wang et al. showed that downregulation of miR-599 promotes PTC cell proliferation and inhibits apoptosis by targeting *HEY2* gene expression [53]. PTC's pathogenesis can be further determined using miRNA evaluation. This may provide insights for determining potential medical targets [54]. Moreover, specific miRNAs may be considered PTC biomarkers [55]. Introducing an miRNA panel to routine diagnostics may improve the accuracy of the obtained FNAB results [56]. Moreover, the determination of the miRNA profile would allow personalization of the treatment strategy as well as the determination of the individual risk of cancer progression or metastasis [57]. As such, our purpose in this study was to identify DEMs in PTC with potential diagnostic utility.

In our study, we identified ten miRNAs (miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-34-5p, miR-551b-3p, miR-152-3p, miR-15a-5p, miR-31-5p, and miR-7-5p) that were differentially expressed in PTC compared to normal thyroid tissue. All the DEMs included in the study are implicated in PTC development or cancer progression. In this case, the

determination of DEMs during PTC can provide insights into potential target genes and metabolic pathways with clinical usefulness. It has been demonstrated that the overexpression of miR-146b-5p in PTC promotes invasion and metastasis and induces epithelial–mesenchymal transition by targeting zinc RING finger 3 (*ZNRF3*) [58,59]. Furthermore, the deregulation of miR-221-3p expression is involved in the regulation of the suppressor of cytokine signaling 3/signal transducer and activator of transcription 3 (*Socs3/STAT3*) pathway, which is particularly relevant in cancer resistance. In this case, radiosensitivity in thyroid cancer can be reduced by targeting the influence of miR-221-3p on the solute carrier family 5 member 5 (*NIS*). [60]. Furthermore, miR-34a can exert an inhibitory effect related to cell proliferation by targeting many protooncogenes, implicating it in tumorigenesis and cancer progression [61]. Long et al. showed that miR-34a expression is associated with PTC's tumor stages, histopathological types, and fluorodeoxyglucose maximum standardized uptake value [62]. Accordingly, miR-551b-3p was also shown to relate to PTC's clinicopathological features [14]. Moreover, the downregulation of miR-152-3p, considered a tumor suppressor, promotes PTC development [63]. Kang et al. found that miR-152-3p overexpression was implicated in *ERBB3* downregulation, which inhibits human PTC (TPC-1) cell proliferation. The overexpression of miR-221 inhibited reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif (*RECK*), which is involved in promoting the invasiveness and migration of PTC cells [44]. Wang et al. found that miR-15a-5p promoted the growth of PTC cells by regulating hexokinase 2 (*HK2*) expression, and suggested it as a potential PTC therapeutic target [64]. Rosignolo et al. showed the association of miR-31-5p overexpression with a higher risk of PTC tumor recurrence [34]. Augenlicht et al. indicated that the tumor suppressor miR-7-5p inhibits thyroid cancer cell proliferation and that its target genes inhibit the EGFR/MAPK and IRS2/PI3K signaling pathways. The effect of miR-7-5p downregulation may promote PTC proliferation and invasiveness [65], and specific miRNA expression patterns may be clinically useful for tailoring treatment strategies as a central feature of miRNA-based treatments for cancer and cancer management in the future [66].

Additionally, we identified key DEM target genes, established the functional enrichment genes, and constructed a PPI network; we specifically identified *MAP2K1*, *RAF1*, *IRS1*, *EGFR*, *KIT*, *KDR*, *ERBB3*, *NRAS*, *PIK3R1*, and *PIK3CB* as hub genes. The product of the *MAP2K1* gene is a serine/threonine and tyrosine kinase, which is, in turn, activated by phosphorylation through the action of RAF kinase [67]. *RAF1* participates in the RAS/MEK/ERK signaling pathway. Moreover, *RAF1* was observed to be upregulated in PTC development [68]. Specifically, *RAF1* is an important factor promoting tumorigenesis and PTC tissue progression. In a similar study by Li et al., patients with PTC showed elevated *RAF-1* and decreased miR-485-5p expression [69]. Chen et al. showed that miR-1271 inhibited PTC development by affecting *IRS1*, implicated in epithelial–mesenchymal transition and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway [70]. Additionally, Yang et al. proved the importance of the PI3/AKT pathway in their study, which showed a frequent association with tumor progression and resistance to cancer therapies as the pathway's activity increased [71]. In turn, *PIK3R1* and *PIK3CB* are the components of the previously mentioned PI3/AKT/mTOR signaling pathway [72]. Moreover, the *GAS1* gene and PI3/AKT pathway are connected. Growth arrest specific 1 (*GAS1*), a target gene of miR-34a, leads to the inhibition of apoptosis in PTC and an increase in PTC cell proliferation. [73]. Modeling miRNA expression as a medical target may lead to the complete inhibition of tumor progression. Furthermore, EGFR is a tyrosine kinase implicated in cell proliferation. Masago et al. described the effect of *EGFR*-activating mutations on PTC development [74]. Inhibitors of *ERBB3*, which is also known as a proto-oncogene and a member of the EGFR family, may be effective in the treatment of PTC [75]. Alternatively, the oncogene *KIT*, described for its role in PTC and other cancers, encodes a receptor tyrosine kinase that affects cellular growth and differentiation [76]. The dysregulation of miR-221, miR-222, and miR-146 has been implicated in *KIT* downregulation [77]. *KDR* is a tyrosine kinase whose overexpression in PTC was described [78]. *NRAS* encodes the

N-ras protein responsible for regulating cell division. The importance of *NRAS* mutations in PTC was also demonstrated [79]. Novel transcriptomic approaches specifically targeting PTC hub genes should be further investigated. Moreover, overcoming drug resistance in cancer therapy represents an increasing clinical challenge; thus, the results obtained from the present research may lead to the discovery of the molecular mechanism underlying cancer development and progression.

In this study, through KEGG analysis, we identified the most relevant pathways in the pathogenesis of PTC, i.e., EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, the mTOR signaling pathway, and the ERBB3 signaling pathway, all important in modulating the response to anticancer treatment [74,75,80]. Tavares et al. implicated the mTOR pathway in distant metastasizing and therapy resistance in PTC [81]. The recent literature suggests that the potential inhibition of mTOR activity may prevent cancer progression and improve the survival prognosis for patients after treatment [82]. Moreover, targeting ERBB3 and EGFR signaling [83–85] is an effective method for overcoming cancer progression and resistance to anticancer therapy [85,86].

Using the GO approach, biological processes were significantly enriched for nervous system development and several metabolism-related terms. Neurogenesis, similar to angiogenesis, is also an important modulator of cancer cells progression [87]. Literature data demonstrate the presence of nerves in the tumor microenvironment and their promotion of tumorigenesis and disease progression [88]. GO molecular function analysis revealed that among the discovered DEGs were those involved in kinase activity and protein binding. Our study demonstrates key molecular pathways and provides much needed insights into potential targets and treatment options of PTC.

All the identified DEMs showed high diagnostic utility (excluding miR-31-5p). Possible clinical usefulness in PTC diagnosis was observed for miR-146-5p (AUC = 0.770), miR-551-3p (AUC = 0.740), and miR-222-3p (AUC = 0.720). Specifically, miR-146-5p (AUC = 0.770) expression had the highest diagnostic utility. To increase the diagnostic accuracy of using miRNAs, we assessed a combination of four miRNAs (miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p, and miR-7-5p) with a calculated AUC of 0.841. Moreover, the AUC values obtained in our study are comparable to those previously published in the literature [16,36,47]. Other authors also proposed miR-221 measurement as a potential biomarker of PTC recurrence [18]. Duan et al. showed that miR-7-5p and miR-451 can be considered diagnostic biomarkers of PTC [89]. Additionally, the individual miRNAs that comprise our proposed panel have been previously mentioned as potential biomarkers of PTC [14,89–91]. The overexpression of these miRNAs reflects recent results obtained by Qiao et al., who demonstrated that the combination of five miRNAs, including miR-1296-5p, miR-1301-3p, miR-532-5p, miR-551b-3p, and miR-455-3p, is potentially useful in the diagnosis of PTC (AUC of 0.941 with 82.14% sensitivity and 100% specificity in their study) [14]. The lack of a sensitive panel may limit the introduction of a miRNA diagnostic panel into clinical routines. Moreover, cost-benefit and cost-effectiveness analyses are required. Nevertheless, the procedure's cost will consistently decrease with the development of molecular techniques. Introducing a diagnostic miRNA panel in PTC may result in more accurate diagnoses in difficult and questionable cases, enable more accurate therapeutic decisions, help to prioritize patients who require special clinical management or more aggressive treatment, and be part of a more personalized approach to medicine. Lastly, and in reference to the heterogeneity of PTCs, the introduction of a diagnostic panel rather than a separate measurement would be preferable. In order for the miRNA panel to be applied in clinical practice, though, it is important to evaluate the miRNA presence in FNAB and biofluids.

The results of our study are in line with the current knowledge about miRNAs in the pathogenesis of PTC. The theranostic utility of miRNAs and their prognostic potential in PTC have been demonstrated [16]. However, our analyses are of crucial importance for the exploration of the role of miRNA expression patterns in the pathogenesis of PTC. Furthermore, general studies of PTC have aimed to establish novel noninvasive diagnostic panels,

but the results have been insufficient. Therefore, we proposed a miRNA PTC diagnostic panel consisting of miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p, and miR-7-5p. The wide range of studied miRNAs and the validation of the results obtained by PCR assays constitute the strengths of this study. However, because of the limited size of the experimental group, further evaluation and data validation using a larger cohort are required to confirm the diagnostic usefulness of the proposed miRNA panel.

5. Conclusions

Our analysis demonstrates the usefulness of evaluating miRNA expression patterns in PTC diagnosis. Moreover, a four-miRNA combination—miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p, and miR-7-5p—may be introduced as a diagnostic panel in PTC patients. In addition, the characterization of the regulatory network of the DEMs and target genes will be important for investigating the pathways driving disease progression. Nevertheless, additional studies are necessary for understanding the role of dysregulated miRNAs in the molecular mechanisms underlying PTC pathogenesis.

Author Contributions: Conceptualization, M.R., I.S., M.N., A.J.K., A.P.-K. and J.B.D.; methodology, M.R., I.S., M.N., J.B.D., J.R., M.S., A.P.-K. and A.B.; software, I.S. and M.N.; validation, M.R., I.S., M.N. and A.B.; formal analysis, M.R., I.S., M.N., M.S., J.S. and A.B.; investigation, M.R. and I.S.; resources, M.R., I.S., J.B.D. and J.R.; data curation, M.R., J.S., I.S., A.B., A.A., K.S. and M.N.; writing—original draft preparation, M.R., I.S. and A.B.; writing—review and editing, I.S.; A.A., K.S., M.K., K.M. and A.W.; visualization, M.R. and I.S.; supervision, A.W., J.B.D., M.S., A.J.K. and A.P.-K.; project administration, M.R. and I.S.; funding acquisition, M.R., A.J.K. and A.P.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by internal financing of the Medical University of Białystok, grant number SUB/1/DN/22/002/1150. The publication was written during doctoral studies under the project No. POWR.03.02.00-00-0I050/16-00, co-funded from European Union funds, POWER 2014-2020, grant no. 07/MSD/2019.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (approval number: R-I-002/491/2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The NanoString data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE191117) link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE191117>.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA A Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ancker, O.V.; Krüger, M.; Wehland, M.; Infanger, M.; Grimm, D. Multikinase Inhibitor Treatment in Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Davies, L.; Morris, L.G.; Haymart, M.; Chen, A.Y.; Goldenberg, D.; Morris, J.; Ogilvie, J.B.; Terris, D.J.; Nettekville, J.; Wong, R.J.; et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: The Increasing Incidence of Thyroid Cancer. *Endocr. Pract.* **2015**, *21*, 686–696. [[CrossRef](#)]
5. Kitahara, C.M.; Sosa, J.A. The changing incidence of thyroid cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 646–653. [[CrossRef](#)]
6. Fagin, J.A.; Wells, S.A., Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 2307. [[CrossRef](#)]
7. Grogan, R.H.; Kaplan, S.P.; Cao, H.; Weiss, R.E.; Degroot, L.J.; Simon, C.A.; Embia, O.M.; Angelos, P.; Kaplan, E.L.; Schechter, R.B. A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up. *Surgery* **2013**, *154*, 1436–1446, discussion 1446–1437. [[CrossRef](#)]
8. Sun, J.-H.; Li, Y.-R.; Chang, K.-H.; Liou, M.-J.; Lin, S.-F.; Tsai, S.-S.; Yu, M.-C.; Hsueh, C.; Chen, S.-T. Evaluation of recurrence risk in patients with papillary thyroid cancer through tumor-node-metastasis staging: A single-center observational study in Taiwan. *Biomed. J.* **2021**. [[CrossRef](#)]

9. Sippel, R.S.; Chen, H. Controversies in the surgical management of newly diagnosed and recurrent/residual thyroid cancer. *Thyroid* **2009**, *19*, 1373–1380. [[CrossRef](#)]
10. Guth, S.; Theune, U.; Aberle, J.; Galach, A.; Bamberger, C.M. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur. J. Clin. Investig.* **2009**, *39*, 699–706. [[CrossRef](#)]
11. Gimm, O.; Ivansson, K.; Beka, E.; Rossitti, H.M.; Garvin, S.; Söderkvist, P. Increased diagnostic sensitivity of palpation-guided thyroid nodule fine-needle aspiration cytology by BRAF V600E-mutation analysis. *J. Pathol. Clin. Res.* **2021**, *7*, 556–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Feletti, F.; Mellini, L.; Pironi, F.; Carnevale, A.; Parenti, G.C. Role of the cytopathologist during the procedure of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Insights Imaging* **2021**, *12*, 111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cibas, E.S.; Ali, S.Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am. J. Clin. Pathol.* **2009**, *132*, 658–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Qiao, D.-h.; He, X.-m.; Deng, X.; Ji, Y.-c.; Yang, H.; Cheng, L.; Zhou, X.-y. Aberrant expression of five miRNAs in papillary thyroid carcinomas. *J. Clin. Lab. Anal.* **2021**, *35*, e23907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Han, J.; Chen, M.; Wang, Y.; Gong, B.; Zhuang, T.; Liang, L.; Qiao, H. Identification of Biomarkers Based on Differentially Expressed Genes in Papillary Thyroid Carcinoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rogucki, M.; Buczyńska, A.; Krętowski, A.J.; Popławska-Kita, A. The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sun, Y.; Yu, S.; Liu, Y.; Wang, F.; Liu, Y.; Xiao, H. Expression of miRNAs in Papillary Thyroid Carcinomas Is Associated with BRAF Mutation and Clinicopathological Features in Chinese Patients. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, *2013*, 128735. [[CrossRef](#)]
18. Dai, L.; Wang, Y.; Chen, L.; Zheng, J.; Li, J.; Wu, X. MiR-221, a potential prognostic biomarker for recurrence in papillary thyroid cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2017**, *15*, 11. [[CrossRef](#)]
19. Sondermann, A.; Andreghetto, F.M.; Moulatlet, A.C.; da Silva Victor, E.; de Castro, M.G.; Nunes, F.D.; Brandão, L.G.; Severino, P. MiR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 521–530. [[CrossRef](#)]
20. Hitu, L.; Gabora, K.; Bonci, E.-A.; Piciu, A.; Hitu, A.-C.; Ștefan, P.-A.; Piciu, D. MicroRNA in Papillary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review from 2018 to June 2020. *Cancers* **2020**, *12*, 3118. [[CrossRef](#)]
21. Fugazzola, L.; Muzza, M.; Pogliaghi, G.; Vitale, M. Intratumoral Genetic Heterogeneity in Papillary Thyroid Cancer: Occurrence and Clinical Significance. *Cancers* **2020**, *12*, 383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Licursi, V.; Conte, F.; Fison, G.; Paci, P. MIENTURNET: An interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC Bioinform.* **2019**, *20*, 545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Nastou, K.C.; Lyon, D.; Kirsch, R.; Pyysalo, S.; Doncheva, N.T.; Legeay, M.; Fang, T.; Bork, P.; et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D605–D612. [[CrossRef](#)]
25. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [[CrossRef](#)]
26. Zeng, Z.; Li, K.; Kang, W.; Yu, J.; Wang, X.; Zhang, Z.; Sun, J.; Ouyang, S. Changing patterns of thyroid cancer in different stages of Universal Salt Iodization in Peking Union Medical College Hospital, 1986–2018. *Gland Surg.* **2020**, *9*, 1338–1345. [[CrossRef](#)]
27. Glynn, N.; Hannon, M.J.; Lewis, S.; Hillery, P.; Al-Mousa, M.; Hill, A.D.; Keeling, F.; Morrin, M.; Thompson, C.J.; Smith, D.; et al. Utility of repeat cytological assessment of thyroid nodules initially classified as benign: Clinical insights from multidisciplinary care in an Irish tertiary referral centre. *BMC Endocr. Disord.* **2016**, *16*, 45. [[CrossRef](#)]
28. Durante, C.; Grani, G.; Lamartina, L.; Filetti, S.; Mandel, S.J.; Cooper, D.S. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *JAMA* **2018**, *319*, 914–924. [[CrossRef](#)]
29. Ito, Y.; Hirokawa, M. Complications of Fine Needle Aspiration Biopsy. In *Thyroid FNA Cytology: Differential Diagnoses and Pitfalls*; Kakudo, K., Ed.; Springer: Singapore, 2019; pp. 425–428.
30. Anderson, T.J.T.; Atalay, M.K.; Grand, D.J.; Baird, G.L.; Cronan, J.J.; Beland, M.D. Management of Nodules with Initially Nondiagnostic Results of Thyroid Fine-Needle Aspiration: Can We Avoid Repeat Biopsy? *Radiology* **2014**, *272*, 777–784. [[CrossRef](#)]
31. Pritchard, C.C.; Cheng, H.H.; Tewari, M. MicroRNA profiling: Approaches and considerations. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 358–369. [[CrossRef](#)]
32. Farina, N.H.; Wood, M.E.; Perrapato, S.D.; Francklyn, C.S.; Stein, G.S.; Stein, J.L.; Lian, J.B. Standardizing analysis of circulating microRNA: Clinical and biological relevance. *J. Cell. Biochem.* **2014**, *115*, 805–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Saiselet, M.; Gacquer, D.; Spinette, A.; Craciun, L.; Decaussin-Petrucci, M.; Andry, G.; Detours, V.; Maenhaut, C. New global analysis of the microRNA transcriptome of primary tumors and lymph node metastases of papillary thyroid cancer. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rosignolo, F.; Memeo, L.; Monzani, F.; Colarossi, C.; Pecce, V.; Verrienti, A.; Durante, C.; Grani, G.; Lamartina, L.; Forte, S.; et al. MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2017**, *50*, 1767–1777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Galuppini, F.; Censi, S.; Merante Boschini, I.; Fassan, M.; Sbaraglia, M.; Valeri, N.; Hahne, J.C.; Bertazza, L.; Munari, G.; Galasso, M.; et al. Papillary Thyroid Carcinoma: Molecular Distinction by MicroRNA Profiling. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 834075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Papaioannou, M.; Chorti, A.G.; Chatzikiyriakidou, A.; Giannoulis, K.; Bakkar, S.; Papavramidis, T.S. MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer: What Is New in Diagnosis and Treatment. *Front. Oncol.* **2022**, *11*, 755097. [[CrossRef](#)]
37. Agrawal, N.; Akbani, R.; Aksoy, B.A.; Ally, A.; Arachchi, H.; Asa, S.L.; Auman, J.T.; Balasundaram, M.; Balu, S.; Baylin, S.B.; et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* **2014**, *159*, 676–690. [[CrossRef](#)]
38. Laukiene, R.; Jakubkevicius, V.; Ambrozaityte, L.; Cimbaliestiene, L.; Utkus, A. Dysregulation of microRNAs as the risk factor of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: Systematic review. *Endokrynol. Pol.* **2021**, *72*, 145–152. [[CrossRef](#)]
39. Peng, Y.; Croce, C.M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2016**, *1*, 15004. [[CrossRef](#)]
40. Felekis, K.; Touvana, E.; Stefanou, C.; Deltas, C. microRNAs: A newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* **2010**, *14*, 236–240.
41. Li, D.; Jian, W.; Wei, C.; Song, H.; Gu, Y.; Luo, Y.; Fang, L. Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 7672–7680.
42. Xiang, D.; Tian, B.; Yang, T.; Li, Z. miR-222 expression is correlated with the ATA risk stratifications in papillary thyroid carcinomas. *Medicine* **2019**, *98*, e16050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Qiu, Z.; Li, H.; Wang, J.; Sun, C. miR-146a and miR-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 2735–2740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wei, Z.L.; Gao, A.B.; Wang, Q.; Lou, X.E.; Zhao, J.; Lu, Q.J. MicroRNA-221 promotes papillary thyroid carcinoma cell migration and invasion via targeting RECK and regulating epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther.* **2019**, *12*, 2323–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Khoo, M.L.C.; Beasley, N.J.P.; Ezzat, S.; Freeman, J.L.; Asa, S.L. Overexpression of Cyclin D1 and Underexpression of p27 Predict Lymph Node Metastases in Papillary Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 1814–1818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Buitrago, D.; Keutgen, X.M.; Crowley, M.; Filicori, F.; Aldailami, H.; Hoda, R.; Liu, Y.-F.; Hoda, R.S.; Scognamiglio, T.; Jin, M.; et al. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) is Upregulated in Aggressive Papillary Thyroid Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **2012**, *19*, 973–980. [[CrossRef](#)]
47. Park, J.L.; Kim, S.K.; Jeon, S.; Jung, C.K.; Kim, Y.S. MicroRNA Profile for Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Thyroid Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 632. [[CrossRef](#)]
48. Mei, Z.; Zhou, L.; Zhu, Y.; Jie, K.; Fan, D.; Chen, J.; Liu, X.; Jiang, L.; Jia, Q.; Li, W. Interleukin-22 promotes papillary thyroid cancer cell migration and invasion through microRNA-595/Sox17 axis. *Tumour. Biol.* **2016**, *37*, 11753–11762. [[CrossRef](#)]
49. Perdas, E.; Stawski, R.; Kaczka, K.; Zubrzycka, M. Analysis of Let-7 Family miRNA in Plasma as Potential Predictive Biomarkers of Diagnosis for Papillary Thyroid Cancer. *Diagnostics* **2020**, *10*, 130. [[CrossRef](#)]
50. Geraldo, M.V.; Fuziwara, C.S.; Friguglietti, C.U.M.; Costa, R.B.; Kulcsar, M.A.V.; Yamashita, A.S.; Kimura, E.T. MicroRNAs miR-146-5p and let-7f as prognostic tools for aggressive papillary thyroid carcinoma: A case report. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2012**, *56*, 552–557. [[CrossRef](#)]
51. Ma, S.; Jia, W.; Ni, S. miR-199a-5p inhibits the progression of papillary thyroid carcinoma by targeting SNAI1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *497*, 181–186. [[CrossRef](#)]
52. Dong, S.; Xue, S.; Sun, Y.; Han, Z.; Sun, L.; Xu, J.; Liu, J. MicroRNA-363-3p downregulation in papillary thyroid cancer inhibits tumor progression by targeting NOB1. *J. Investig. Med.* **2021**, *69*, 66–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wang, D.-P.; Tang, X.-Z.; Liang, Q.-K.; Zeng, X.-J.; Yang, J.-B.; Xu, J. microRNA-599 promotes apoptosis and represses proliferation and epithelial-mesenchymal transition of papillary thyroid carcinoma cells via downregulation of Hey2-dependent Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 2492–2505. [[CrossRef](#)]
54. Reda El Sayed, S.; Cristante, J.; Guyon, L.; Denis, J.; Chabre, O.; Cherradi, N. MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers* **2021**, *13*, 2680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zhang, Y.; Xu, D.; Pan, J.; Yang, Z.; Chen, M.; Han, J.; Zhang, S.; Sun, L.; Qiao, H. Dynamic monitoring of circulating microRNAs as a predictive biomarker for the diagnosis and recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, 4252–4266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mazeh, H. MicroRNA as a diagnostic tool in fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Oncologist* **2012**, *17*, 1032–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lee, J.C.; Gundara, J.S.; Glover, A.; Serpell, J.; Sidhu, S.B. MicroRNA expression profiles in the management of papillary thyroid cancer. *Oncologist* **2014**, *19*, 1141–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Lima, C.R.; Geraldo, M.V.; Fuziwara, C.S.; Kimura, E.T.; Santos, M.F. MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different Papillary Thyroid Carcinoma cells. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Deng, X.; Wu, B.; Xiao, K.; Kang, J.; Xie, J.; Zhang, X.; Fan, Y. MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNRF3. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *35*, 71–82. [[CrossRef](#)]
60. Ye, T.; Zhong, L.; Ye, X.; Liu, J.; Li, L.; Yi, H. miR-221-3p and miR-222-3p regulate the SOCS3/STAT3 signaling pathway to downregulate the expression of NIS and reduce radiosensitivity in thyroid cancer. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *21*, 652. [[CrossRef](#)]

61. Kalfert, D.; Ludvikova, M.; Pesta, M.; Ludvik, J.; Dostalova, L.; Kholová, I. Multifunctional Roles of miR-34a in Cancer: A Review with the Emphasis on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Thyroid Cancer with Clinical Implications. *Diagnostics* **2020**, *10*, 563. [\[CrossRef\]](#)
62. Chen, L.; Yang, C.; Feng, J.; Liu, X.; Tian, Y.; Zhao, L.; Xie, R.; Liu, C.; Zhao, S.; Sun, H. Clinical significance of miR-34a expression in thyroid diseases-An (18)F-FDG PET-CT study. *Cancer Manag. Res.* **2017**, *9*, 903–913. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Kang, Y.Y.; Liu, Y.; Wang, M.L.; Guo, M.; Wang, Y.; Cheng, Z.F. Construction and analyses of the microRNA-target gene differential regulatory network in thyroid carcinoma. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178331. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Wang, L.; Wang, W.; Cai, Y.; Zhou, Y.; Jiang, J.; Ning, Y.; Shui, C.; Sun, R.; Wang, Y.; Li, C. Circ-NUP214 Promotes Papillary Thyroid Carcinoma Tumorigenesis by Regulating HK2 Expression Through miR-15a-5p. *Biochem. Genet.* **2022**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Augenlicht, A.; Saiselet, M.; Decaussin-Petrucci, M.; Andry, G.; Dumont, J.E.; Maenhaut, C. MiR-7-5p inhibits thyroid cell proliferation by targeting the EGFR/MAPK and IRS2/PI3K signaling pathways. *Oncotarget* **2021**, *12*, 1587–1599. [\[CrossRef\]](#)
66. Kong, Y.W.; Ferland-McCollough, D.; Jackson, T.J.; Bushell, M. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, e249–e258. [\[CrossRef\]](#)
67. Bu, R.; Siraj, A.K.; Masoodi, T.; Parvathareddy, S.K.; Iqbal, K.; Al-Rasheed, M.; Haqawi, W.; Diaz, M.; Victoria, I.G.; Aldughaiter, S.M.; et al. Recurrent Somatic MAP2K1 Mutations in Papillary Thyroid Cancer and Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 670423. [\[CrossRef\]](#)
68. Castro, L.; Alves, S.; Chaves, S.R.; Costa, J.L.; Soares, P.; Preto, A. RAF-1 promotes survival of thyroid cancer cells harboring RET/PTC1 rearrangement independently of ERK activation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *415*, 64–75. [\[CrossRef\]](#)
69. Li, G.; Kong, Q. LncRNA LINC00460 promotes the papillary thyroid cancer progression by regulating the LINC00460/miR-485-5p/Raf1 axis. *Biol. Res.* **2019**, *52*, 61. [\[CrossRef\]](#)
70. Chen, Y.; Hao, S.A.; Jiang, Y.; Gao, B.; Tian, W.G.; Zhang, S.; Guo, L.J.; Wang, L.L.; Luo, D.L. MicroRNA-1271 inhibits the progression of papillary thyroid carcinoma by targeting IRS1 and inactivating AKT pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 7989–7999. [\[CrossRef\]](#)
71. Yang, J.; Nie, J.; Ma, X.; Wei, Y.; Peng, Y.; Wei, X. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 26. [\[CrossRef\]](#)
72. Murugan, A.K.; Dong, J.; Xie, J.; Xing, M. Uncommon GNAQ, MMP8, AKT3, EGFR, and PIK3R1 mutations in thyroid cancers. *Endocr. Pathol.* **2011**, *22*, 97–102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Ma, Y.; Qin, H.; Cui, Y. MiR-34a targets GAS1 to promote cell proliferation and inhibit apoptosis in papillary thyroid carcinoma via PI3K/Akt/Bad pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 958–963. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Masago, K.; Asato, R.; Fujita, S.; Hirano, S.; Tamura, Y.; Kanda, T.; Mio, T.; Katakami, N.; Mishima, M.; Ito, J. Epidermal growth factor receptor gene mutations in papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2744–2749. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Han, Y.; Yu, X.; Yin, Y.; Lv, Z.; Jia, C.; Liao, Y.; Sun, H.; Liu, T.; Cong, L.; Fei, Z.; et al. Identification of Potential BRAF Inhibitor Joint Therapy Targets in PTC based on WGCAN and DCGA. *J. Cancer* **2021**, *12*, 1779–1791. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Shi, X.; Sousa, L.P.; Mandel-Bausch, E.M.; Tome, F.; Reshetnyak, A.V.; Hadari, Y.; Schlessinger, J.; Lax, I. Distinct cellular properties of oncogenic KIT receptor tyrosine kinase mutants enable alternative courses of cancer cell inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E4784–E4793. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. He, H.; Jazdzewski, K.; Li, W.; Liyanarachchi, S.; Nagy, R.; Volinia, S.; Calin, G.A.; Liu, C.G.; Franssila, K.; Suster, S.; et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 19075–19080. [\[CrossRef\]](#)
78. Zhuo, Y.J.; Shi, Y.; Wu, T. NRP-1 and KDR polymorphisms are associated with survival time in patients with advanced gastric cancer. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 4629–4638. [\[CrossRef\]](#)
79. Fakhruddin, N.; Jabbour, M.; Novy, M.; Tamim, H.; Bahmad, H.; Farhat, F.; Zaatari, G.; Aridi, T.; Kriegshauser, G.; Oberkanins, C.; et al. BRAF and NRAS Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma and Concordance in BRAF Mutations Between Primary and Corresponding Lymph Node Metastases. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4666. [\[CrossRef\]](#)
80. Faustino, A.; Couto, J.P.; Pópulo, H.; Rocha, A.S.; Pardal, F.; Cameselle-Teijeiro, J.M.; Lopes, J.M.; Sobrinho-Simões, M.; Soares, P. mTOR pathway overactivation in BRAF mutated papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, E1139–E1149. [\[CrossRef\]](#)
81. Tavares, C.; Eloy, C.; Melo, M.; Gaspar da Rocha, A.; Pestana, A.; Batista, R.; Bueno Ferreira, L.; Rios, E.; Sobrinho Simões, M.; Soares, P. mTOR Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma: Different Contributions of mTORC1 and mTORC2 Complexes for Tumor Behavior and SLC5A5 mRNA Expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1448. [\[CrossRef\]](#)
82. Ahmed, M.; Hussain, A.R.; Bavi, P.; Ahmed, S.O.; AlSobhi, S.S.; Al-Dayel, F.; Uddin, S.; Al-Kuraya, K.S. High prevalence of mTOR complex activity can be targeted using Torin2 in papillary thyroid carcinoma. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 1564–1572. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Wendt, M.K.; Williams, W.K.; Pascuzzi, P.E.; Balanis, N.G.; Schiemann, B.J.; Carlin, C.R.; Schiemann, W.P. The antitumorigenic function of EGFR in metastatic breast cancer is regulated by expression of Mig6. *Neoplasia* **2015**, *17*, 124–133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Uribe, M.L.; Marrocco, I.; Yarden, Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 2748. [\[CrossRef\]](#)
85. Ma, J.; Lyu, H.; Huang, J.; Liu, B. Targeting of erbB3 receptor to overcome resistance in cancer treatment. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

86. Chen, C.; Gupta, P.; Parashar, D.; Nair, G.G.; George, J.; Geethadevi, A.; Wang, W.; Tsaih, S.-W.; Bradley, W.; Ramchandran, R.; et al. ERBB3-induced furin promotes the progression and metastasis of ovarian cancer via the IGF1R/STAT3 signaling axis. *Oncogene* **2020**, *39*, 2921–2933. [[CrossRef](#)]
87. Baraldi, J.H.; Martyn, G.V.; Shurin, G.V.; Shurin, M.R. Tumor Innervation: History, Methodologies, and Significance. *Cancers* **2022**, *14*, 1979. [[CrossRef](#)]
88. Restaino, A.C.; Vermeer, P.D. Neural regulations of the tumor microenvironment. *FASEB BioAdvances* **2022**, *4*, 29–42. [[CrossRef](#)]
89. Duan, Y.; Zhang, Y.; Peng, W.; Jiang, P.; Deng, Z.; Wu, C. MiR-7-5p and miR-451 as diagnostic biomarkers for papillary thyroid carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Pharmazie* **2020**, *75*, 266–270. [[CrossRef](#)]
90. Chou, C.K.; Liu, R.T.; Kang, H.Y. MicroRNA-146b: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Papillary Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 636. [[CrossRef](#)]
91. Cai, S.; Ma, J.; Wang, Y.; Cai, Y.; Xie, L.; Chen, X.; Yang, Y.; Peng, Q. Biomarker Value of miR-221 and miR-222 as Potential Substrates in the Differential Diagnosis of Papillary Thyroid Cancer Based on Data Synthesis and Bioinformatics Approach. *Front. Endocrinol.* **2022**, *12*, 794490. [[CrossRef](#)]

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja panelu diagnostycznego raka brodawkowatego tarczycy opartego na badaniu genetycznym. W ostatnich latach obserwuje się narastającą zachorowalność na ten nowotwór, zarówno na świecie, jak i w Polsce. Rak brodawkowaty tarczycy jest najczęstszym nowotworem złośliwym tego narządu. Również od kilku lat rośnie zainteresowanie w poszukiwaniach molekularnego biomarkera raka brodawkowatego tarczycy. Tym biomarkerem może być miRNA.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi praca pogładowa oraz praca oryginalna. W pracy pogładowej dokonano przeglądu dotychczasowej literatury dotyczącej znaczenia miRNA w diagnostyce raka brodawkowatego tarczycy. Dotychczas wielu autorów starało się zidentyfikować konkretne miRNA, które mogą wspomóc proces diagnostyczny. Jednak mała liczebność badanych grup, różne zastosowane metody badawcze oraz niejednorodne cechy choroby skłaniają do przeprowadzenia dalszych badań w zakresie omawianego tematu.

W toku prac nad publikacją oryginalną podjęto próbę identyfikacji panelu diagnostycznego raka brodawkowatego tarczycy przy użyciu badań genetycznych. W tym celu zgromadzono 41 bloczków parafinowych zawierających komórki nowotworowe oraz 39 bloczków ze zdrowymi tkankami, które pochodziły od tych samych pacjentów. W badanym materiale oznaczono profil ekspresji miRNA. Zaobserwowano istotnie zwiększoną ekspresję 8 miRNA: miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-222-3p, miR-34a-5p, miR-551b-3p, miR-15a-5p, miR-31-5p. Z kolei ekspresja miR-152-3p oraz miR-7-5p była istotnie zmniejszona. Przeprowadzono również analizę ontologii genów targetowych oraz zidentyfikowano kluczowe geny zaangażowane w rozwój raka brodawkowatego tarczycy. Następnie oceniono wartość diagnostyczną istotnie zmienionych miRNA jako biomarkerów raka brodawkowatego tarczycy przy użyciu AUC. Najwyższe AUC, wskazujące na możliwą przydatność kliniczną w diagnostyce raka brodawkowatego tarczycy, zaobserwowano dla miR-146-5p (AUC=0,770), miR-551-3p (AUC=0,740), miR-222-3p (AUC=0,720). Używając modelu regresji logistycznej dla panelu składającego się z miR-152-3p + miR-221-3p + miR-551-3p + miR-7-5p uzyskano AUC=0,841. W celu zwiększenia wiarygodności pracy uzyskane wyniki potwierdzono z użyciem RT-PCR.

Podsumowując, analiza ekspresji panelu miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p oraz miR-7-5p (AUC=0,841) może stanowić molekularny panel diagnostyczny, użyteczny w procesie diagnostycznym raka brodawkowatego tarczycy.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The aim of the doctoral dissertation was to identify a diagnostic panel for papillary thyroid cancer based on genetic testing. In recent years, an increasing incidence of this cancer has been observed, both worldwide and in Poland. Papillary thyroid cancer is the most common malignant tumor of this organ. Also for several years the interest in the research of a molecular biomarker of papillary thyroid cancer has been growing. This biomarker may be miRNA.

The doctoral dissertation consists of a review paper and an original paper. The review paper includes a revision of previous literature on the importance of miRNAs in the diagnosis of papillary thyroid cancer. To date, many authors have attempted to identify specific miRNAs that can assist in the diagnostic process. However, the small size of the study groups, the different research methods used, and the heterogeneous features of the disease prompt further research on the subject at hand.

In the process of preparing the original publication, an attempt was made to identify the diagnostic panel of papillary thyroid cancer using genetic testing. For this study, 41 paraffin blocks containing tumor cells and 39 blocks with healthy tissues were collected from the same patients. The miRNA expression profile was determined in the studied material. A significantly increased expression of 8 miRNAs was observed: miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-222-3p, miR-34a-5p, miR-551b-3p, miR-15a-5p, miR-31-5p. In contrast, the expression of miR-152-3p and miR-7-5p was significantly decreased. Target gene ontology analysis was also performed and key genes involved in papillary thyroid cancer development were identified. The diagnostic value of significantly altered miRNAs as biomarkers of papillary thyroid cancer was then evaluated using AUC. The highest AUCs, indicating possible clinical utility in the diagnosis of papillary thyroid cancer, were observed for miR-146-5p (AUC=0.770), miR-551-3p (AUC=0.740), miR-222-3p (AUC=0.720). Using a logistic regression model for the panel consisting of miR-152-3p + miR-221-3p + miR-551-3p + miR-7-5p, the AUC=0.841 was obtained. To enhance the reliability of the work, the results were confirmed using RT-PCR.

In conclusion, the expression analysis of miR-152-3p, miR-221-3p, miR-551b-3p and miR-7-5p panel (AUC=0.841) may provide a molecular diagnostic panel useful in the diagnostic process of papillary thyroid cancer.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Morris, L.G.; Tuttle, R.M.; Davies, L. Changing Trends in the Incidence of Thyroid Cancer in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* **2016**, *142*, 709-711, doi:10.1001/jamaoto.2016.0230.
2. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* **2019**, *144*, 1941-1953, doi:10.1002/ijc.31937.
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2022**, *72*, 7-33, doi:<https://doi.org/10.3322/caac.21708>.
4. Rahib, L.; Smith, B.D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A.B.; Fleshman, J.M.; Matrisian, L.M. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research* **2014**, *74*, 2913-2921, doi:10.1158/0008-5472.Can-14-0155.
5. Gong, J.; Kong, X.; Qi, J.; Lu, J.; Yuan, S.; Wu, M. CircRNA_104565 Promoted Cell Proliferation in Papillary Thyroid Carcinoma by Sponging miR-134. *Int J Gen Med* **2021**, *14*, 179-185, doi:10.2147/ijgm.S288360.
6. Kitahara, C.M.; Sosa, J.A. The changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* **2016**, *12*, 646-653, doi:10.1038/nrendo.2016.110.
7. Ito, Y.; Miyauchi, A.; Kihara, M.; Fukushima, M.; Higashiyama, T.; Miya, A. Overall Survival of Papillary Thyroid Carcinoma Patients: A Single-Institution Long-Term Follow-Up of 5897 Patients. *World J Surg* **2018**, *42*, 615-622, doi:10.1007/s00268-018-4479-z.
8. Dou, Y.; Hu, D.; Chen, Y.; Xiong, W.; Xiao, Q.; Su, X. PTC located in the upper pole is more prone to lateral lymph node metastasis and skip metastasis. *World J Surg Oncol* **2020**, *18*, 188, doi:10.1186/s12957-020-01965-x.
9. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *New England Journal of Medicine* **2016**, *375*, 2306-2307, doi:10.1056/NEJMc1613118.
10. Sippel, R.S.; Chen, H. Controversies in the surgical management of newly diagnosed and recurrent/residual thyroid cancer. *Thyroid* **2009**, *19*, 1373-1380, doi:10.1089/thy.2009.1606.
11. Guth, S.; Theune, U.; Aberle, J.; Galach, A.; Bamberger, C.M. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest* **2009**, *39*, 699-706, doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02162.x.
12. Kowalska, A.; Kowalik, A.; Pałyga, I.; Walczyk, A.; Gasior-Periczak, D.; Kopczyński, J.; lizis-kolus, K.; Szyska-Skrobot, D.; Hurej, S.; Radowicz-Chil, A.; et al. Przydatność określania obecności mutacji BRAF V600E w biopsji aspiracyjnej celowanej cienkoigłowej w zmianach niezdeteminowanych. *Endokrynologia Polska* **2016**, *67*, 41-47, doi:10.5603/EP.2016.0006.
13. Feletti, F.; Mellini, L.; Pironi, F.; Carnevale, A.; Parenti, G.C. Role of the cytopathologist during the procedure of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Insights into Imaging* **2021**, *12*, 111, doi:10.1186/s13244-021-01053-y.
14. Moss, W.J.; Finegersh, A.; Pang, J.; Califano, J.A.; Coffey, C.S.; Orosco, R.K.; Brumund, K.T. Needle Biopsy of Routine Thyroid Nodules Should Be Performed Using a Capillary Action Technique with 24- to 27-Gauge Needles: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid* **2018**, *28*, 857-863, doi:10.1089/thy.2017.0643.
15. Qiao, D.-h.; He, X.-m.; Deng, X.; Ji, Y.-c.; Yang, H.; Cheng, L.; Zhou, X.-y. Aberrant expression of five miRNAs in papillary thyroid carcinomas. *Journal of Clinical*

- Laboratory Analysis* **2021**, *35*, e23907, doi:<https://doi.org/10.1002/jcla.23907>.
16. Zhang, Y.; Xu, D.; Pan, J.; Yang, Z.; Chen, M.; Han, J.; Zhang, S.; Sun, L.; Qiao, H. Dynamic monitoring of circulating microRNAs as a predictive biomarker for the diagnosis and recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Lett* **2017**, *13*, 4252-4266, doi:10.3892/ol.2017.6028.
 17. Cai, S.; Ma, J.; Wang, Y.; Cai, Y.; Xie, L.; Chen, X.; Yang, Y.; Peng, Q. Biomarker Value of miR-221 and miR-222 as Potential Substrates in the Differential Diagnosis of Papillary Thyroid Cancer Based on Data Synthesis and Bioinformatics Approach. *Frontiers in Endocrinology* **2022**, *12*, doi:10.3389/fendo.2021.794490.
 18. Chengfeng, X.; Gengming, C.; Junjia, Z.; Yunxia, L. MicroRNA signature predicts survival in papillary thyroid carcinoma. *J Cell Biochem* **2019**, *120*, 17050-17058, doi:10.1002/jcb.28966.
 19. Felekakis, K.; Touvana, E.; Stefanou, C.; Deltas, C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* **2010**, *14*, 236-240.
 20. Millar, A.A.; Waterhouse, P.M. Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Funct Integr Genomics* **2005**, *5*, 129-135, doi:10.1007/s10142-005-0145-2.
 21. Nikiforova, M.N.; Chiosea, S.I.; Nikiforov, Y.E. MicroRNA Expression Profiles in Thyroid Tumors. *Endocrine Pathology* **2009**, *20*, 85-91, doi:10.1007/s12022-009-9069-z.
 22. Winter, J.; Jung, S.; Keller, S.; Gregory, R.I.; Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 228-234, doi:10.1038/ncb0309-228.
 23. Otsuka, K.; Ochiya, T. Genetic Networks Lead and Follow Tumor Development: MicroRNA Regulation of Cell Cycle and Apoptosis in the p53 Pathways. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 749724, doi:10.1155/2014/749724.
 24. Duan, Y.; Zhang, Y.; Peng, W.; Jiang, P.; Deng, Z.; Wu, C. MiR-7-5p and miR-451 as diagnostic biomarkers for papillary thyroid carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Pharmazie* **2020**, *75*, 266-270, doi:10.1691/ph.2020.0335.
 25. Jiang, K.; Li, G.; Chen, W.; Song, L.; Wei, T.; Li, Z.; Gong, R.; Lei, J.; Shi, H.; Zhu, J. Plasma Exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are Potential Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinomas. *Onco Targets Ther* **2020**, *13*, 1311-1319, doi:10.2147/ott.S231361.
 26. Xiao, Q.; Jia, Q.; Tan, J.; Meng, Z. Serum biomarkers for thyroid cancer. *Biomark Med* **2020**, *14*, 807-815, doi:10.2217/bmm-2019-0578.
 27. Santiago, K.; Chen Wongworawat, Y.; Khan, S. Differential MicroRNA-Signatures in Thyroid Cancer Subtypes. *Journal of Oncology* **2020**, *2020*, 2052396, doi:10.1155/2020/2052396.
 28. Rogucki, M.; Buczyńska, A.; Krętowski, A.J.; Popławska-Kita, A. The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Med* **2021**, *10*, doi:10.3390/jcm10204738.
 29. Papaioannou, M.; Chorti, A.G.; Chatzikiyriakidou, A.; Giannoulis, K.; Bakkar, S.; Papavramidis, T.S. MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer: What Is New in Diagnosis and Treatment. *Front Oncol* **2022**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.755097.
 30. Qiu, Z.; Li, H.; Wang, J.; Sun, C. miR-146a and miR-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep* **2017**, *38*, 2735-2740, doi:10.3892/or.2017.5994.
 31. Czajka, A.A.; Wójcicka, A.; Kubiak, A.; Kotlarek, M.; Bakula-Zalewska, E.; Koperski, Ł.; Wiechno, W.; Jażdżewski, K. Family of microRNA-146 Regulates RAR β in Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS One* **2016**, *11*, e0151968,

- doi:10.1371/journal.pone.0151968.
32. Garofalo, M.; Quintavalle, C.; Romano, G.; Croce, C.M.; Condorelli, G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr Mol Med* **2012**, *12*, 27-33, doi:10.2174/156652412798376170.
 33. Wei, Z.L.; Gao, A.B.; Wang, Q.; Lou, X.E.; Zhao, J.; Lu, Q.J. MicroRNA-221 promotes papillary thyroid carcinoma cell migration and invasion via targeting RECK and regulating epithelial-mesenchymal transition. *Oncotargets Ther* **2019**, *12*, 2323-2333, doi:10.2147/ott.S190364.
 34. Laukiene, R.; Jakubkevicius, V.; Ambrozaityte, L.; Cimbalistiene, L.; Utkus, A. Dysregulation of microRNAs as the risk factor of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: systematic review. *Endokrynol Pol* **2021**, *72*, 145-152, doi:10.5603/EP.a2021.0010.
 35. Ortiz, I.M.D.P.; Barros-Filho, M.C.; dos Reis, M.B.; Beltrami, C.M.; Marchi, F.A.; Kuasne, H.; do Canto, L.M.; de Mello, J.B.H.; Abildgaard, C.; Pinto, C.A.L.; et al. Loss of DNA methylation is related to increased expression of miR-21 and miR-146b in papillary thyroid carcinoma. *Clinical Epigenetics* **2018**, *10*, 144, doi:10.1186/s13148-018-0579-8.
 36. Castagna, M.G.; Marzocchi, C.; Pilli, T.; Forleo, R.; Pacini, F.; Cantara, S. MicroRNA expression profile of thyroid nodules in fine-needle aspiration cytology: a confirmatory series. *J Endocrinol Invest* **2019**, *42*, 97-100, doi:10.1007/s40618-018-0880-6.
 37. Mahmoudian-Sani, M.R.; Amrollahi-Sharifabadi, M.; Taheri, A.; Hosseini, S.M.; Tahmasebi, K.; Mobini, G.R. Diagnostic value of the candidate microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy (FNAB) samples. *Horm Mol Biol Clin Investig* **2020**, *41*, doi:10.1515/hmbci-2019-0027.

11. SUPPLEMENT

11.1. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu każdego z nich oraz oświadczenia o zgodzie na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dziecioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szlachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita

Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer;

Cancers, 2022, 14(11), 2679.
Doi: 10.3390/cancers14112679

<i>Imię i nazwisko współautora</i>	<i>Charakter udziału</i>	<i>Procentowy wkład</i>
doktorant – lek. Mariusz Rogucki	Zaplanowanie przebiegu pracy, zgromadzenie materiału badawczego, udział w opracowaniu materiału badawczego, przeprowadzeniu eksperymentów, analiza wyników, przygotowanie tabel wchodzących w skład manuskryptu, przygotowanie manuskryptu	60%
dr Iwona Sidorkiewicz	Pomoc przy przeprowadzeniu oznaczeń laboratoryjnych i współtworzenie manuskryptu, korekta językowa	5%

Prof. dr hab. Janusz Bogdan Dziecioł	Udział pozyskaniu materiału badawczego, konsultacja merytoryczna	1%
dr Angelika Buczyńska	Udział w przygotowywaniu manuskryptu, korekta językowa	4%
dr hab. Agnieszka Adamska	Konsultacja merytoryczna	1%
dr Katarzyna Siewko	Konsultacja merytoryczna	1%
dr Maria Kościuszko	Konsultacja merytoryczna	1%
dr Katarzyna Maliszewska	Konsultacja merytoryczna	1%
dr hab. Anna Wójcicka	Konsultacja merytoryczna	1%
lek. Jakub Supronik	Udział w przygotowaniu materiału badawczego	1%
prof. Małgorzata Szelachowska	Konsultacja merytoryczna	1%

dr hab. Joanna Reszeć	Konsultacja merytoryczna	1%
prof. dr hab. Adam Jacek Krętowski	Pomoc przy przygotowaniu manuskryptu, nadzór merytoryczny	5%
dr hab. Anna Popławska-Kita	Stworzenie koncepcji pracy, pomoc przy przygotowaniu manuskryptu, nadzór merytoryczny	15%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Mariusza Roguckiego.

Mariusz Rogucki

2. Mariusz Rogucki; Angelika Buczyńska; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita

The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer:

Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(20), 4738.

Doi: 10.3390/jcm10204738

<i>Imię i nazwisko współautora</i>	<i>Charakter udziału</i>	<i>Procentowy wkład</i>
doktorant – lek. Mariusz Rogucki	Przegląd dostępnych publikacji w zakresie omawianego tematu, zaplanowanie przebiegu pracy, analiza dostępnej literatury, przygotowanie tabel wchodzących w skład manuskryptu oraz przygotowanie manuskryptu	60%

dr Angelika Buczyńska	Pomoc w przeglądzie literatury, współtworzenie manuskryptu, korekta językowa	10%
prof. dr hab. Adam Jacek Krętowski	Konsultacja merytoryczna	10%
dr hab. Anna Popławska-Kita	Nadzór merytoryczny, koncepcja pracy, pomoc przy przygotowaniu manuskryptu	20%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Mariusza Roguckiego.

Mariusz Rogucki

Lek. Mariusz Rogucki
Międzysektorowe Studia Doktoranckie
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Angelika Buczyńska; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer; Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(20), 4738. Doi: 10.3390/jcm10204748, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej polegał na: przeglądzie dostępnych publikacji w zakresie omawianego tematu, zaplanowanie przebiegu pracy, analizie dostępnej literatury, przygotowanie tabel i manuskryptu.

Jednocześnie stwierdzam, że mój indywidualny udział w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

2. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzięcioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej polegał na: zaplanowaniu przebiegu pracy, zgromadzenie materiału badawczego, udział w opracowaniu materiału badawczego, przeprowadzeniu eksperymentów, analizie wyników, przygotowanie tabel wchodzących w skład manuskryptu, przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie stwierdzam, że mój indywidualny udział w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Białystok, 6.06.2022

Dr Iwona Sidorkiewicz
Centrum Badań Klinicznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzięcioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na pomocy przy przeprowadzeniu oznaczeń laboratoryjnych, współtworzeniu manuskryptu oraz wykonaniu korekty językowej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

Iwona Sidorkiewicz

Białystok, 6.06.2022

Dr Magdalena Niemira
Centrum Badań Klinicznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciot; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, Expression Profile and Diagnostic Significance of *MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer*; *Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

Magdalena
Niemira

Białystok, 6.06.2022

Prof. dr hab. Janusz Bogdan Dzięcioł
Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzięcioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udziale w pozyskaniu materiału badawczego oraz udzielaniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Dr Angelika Buczyńska
Centrum Badań Klinicznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dziecioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na współtworzeniu manuskryptu oraz korekcie językowej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

2. Mariusz Rogucki; Angelika Buczyńska; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer; Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(20), 4738. Doi: 10.3390/jcm10204748, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej polegał na pomocy w przeglądzie dotychczasowej literatury, współtworzeniu manuskryptu oraz korekcie językowej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Białystok, 6.06.2022

Dr hab. Agnieszka Adamska
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciół; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Białystok, 6.06.2022

Dr Katarzyna Siewko
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dziecioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

Handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Katarzyna Siewko'.

Białystok, 6.06.2022

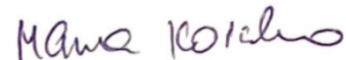
Dr Maria Kościuszko
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciół; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Białystok, 6.06.2022

Dr Katarzyna Maliszewska
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dziecioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Warszawa, 6.06.2022

Dr hab. Anna Wójcicka
Warsaw Genomics
Ul. Kiwerska 33A
01-682 Warszawa

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dziecioł; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzielaniu konsultacji merytorycznych.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Białystok, 6.06.2022

Lek. Jakub Supronik
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciół; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udziale w przygotowaniu materiału badawczego.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Białystok, 6.06.2022

Prof. dr hab. Małgorzata Szelachowska
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciol; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers, 2022, 14(11), 2679*. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Prof. dr hab. med. Małgorzata Szelachowska
specjalista chorób wewnętrznych
endokrynolog, diabetolog
4476355

Białystok, 6.06.2022

Dr hab. Joanna Reszeć
Kierownik Zakładu Patomorfologii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciot; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.



Białystok, 6.06.2022

Prof. dr hab. Adam Krętowski
Kierownik Kliniki Endokrynologii,
Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

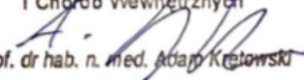
1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciol; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *Expression Profile and Diagnostic Significance of MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer; Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na pomocy przy przygotowaniu manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

2. Mariusz Rogucki; Angelika Buczyńska; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer; Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(20), 4738. Doi: 10.3390/jcm10204748, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej polegał na udzieleniu konsultacji merytorycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

KIEROWNIK
Kliniki Endokrynologii, Diabetologii
i Chorób Wewnętrznych


prof. dr hab. n. med. Adam Krętowski

Dr hab. Anna Popławska-Kita
Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. Mariusz Rogucki; Iwona Sidorkiewicz; Magdalena Niemira; Janusz Bogdan Dzieciol; Angelika Buczyńska; Agnieszka Adamska; Katarzyna Siewko; Maria Kościuszko; Katarzyna Maliszewska; Anna Wójcicka; Jakub Supronik; Małgorzata Szelachowska; Joanna Reszeć; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, Expression Profile and Diagnostic Significance of *MicroRNAs* in Papillary Thyroid Cancer; *Cancers*, 2022, 14(11), 2679. Doi: 10.3390/cancers14112679, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pana lek. Mariusza Roguckiego polegał na stworzeniu koncepcji pracy, pomocy przy przygotowaniu manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

2. Mariusz Rogucki; Angelika Buczyńska; Adam Jacek Krętowski; Anna Popławska-Kita, *The Importance of miRNA in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer*; *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(20), 4738. Doi: 10.3390/jcm10204748, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej polegał na nadzorze merytorycznym oraz pomocy przy przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie stwierdzam, że indywidualny udział Pana lek. Mariusza Roguckiego w powstaniu niniejszej pracy wyniósł 60%.

dr hab. med. Anna Popławska-Kita
specjalista chorób wewnętrznych
endokrynolog, diabetolog
9473214

12. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

KOMISJA BIOETYCZNA
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilńskiego 1
15-089 Białystok
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08
prorektorki@umb.edu.pl

Białystok, 28-11-2019

Uchwała nr: R-I-002/491/2019

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Poszukiwanie molekularnych sygnatur wczesnej diagnostyki i skutecznej terapii raka brodawkowatego tarczycy przy zastosowaniu badań genomowych i oceny transkryptomu” przez dr hab. Annę Popławską-Kitę wraz z zespołem badawczym z UMB.

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej UMB

dr n. farm. Krzysztof Chrzepowski

*Potwierdzam, że dr hab. Mariusz Bogucki jest członkiem
zespołu badawczego w/w tematu badawczego*

UNIwersYTET MEDYCZNY
w Białymstoku
KOMISJA BIOETYCZNA
15-089 Białystok, ul. Jana Kilńskiego 1

30.03.2022r

E. Stecowa