Mutacija V600E gena BRAF i izraženost proteina CPSF2 kao prognostički pokazatelji papilarnoga karcinoma štitnjače

Ivković, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:295699

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Irena Ivković

Mutacija V600E gena BRAF i izraženost proteina CPSF2 kao prognostički pokazatelji papilarnoga karcinoma štitnjače

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Irena Ivković

Mutacija V600E gena BRAF i izraženost proteina CPSF2 kao prognostički pokazatelji papilarnoga karcinoma štitnjače

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Ova disertacija izrađena je u Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata, KBC Zagreb i u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, KBC Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Drago Prgomet

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Dragi Prgometu, na nesebičnom prenošenju znanja i vještina, savjetima i strpljenju, ne samo pri izradi ove disertacije, nego tijekom svih ovih godina suradnje na Klinici. Zaista mogu reći da je uvijek davao „vjetar u leđa" svakoj mojoj ideji i viziji.

Jedno veliko hvala dr. Suzani Kober bez čije vjere, stručne i financijske potpore ovog istraživanja ne bi ni bilo! Zahvaljujem osobama koje su me zadužile svojom pomoći: dr. sc. Antoniji Jakovčević, prof. dr. sc. Srećku Gajeviću, prof. dr. sc. Draženu Huiću, prof. dr. sc. Svenu Seiwerthu i prof. dr. sc. Ani Đanić Hadžibegović. Hvala gospođi Poljan na iskazanom trudu.

Zahvaljujem svojim roditeljima te bratu na moralnoj i financijskoj podršci tijekom čitavog školovanja. Hvala suprugu Tomislavu te našem Micku i Egiju na motivaciji, ljubavi i strpljenju.

Ovu disertaciju posvećujem majci.

SADRŽAJ

SADRŽAJ **1**
POPIS OZNAKA I KRATICA **2**
1. UVOD I SVRHA RADA **1**
1.1. Novotvorine štitnjače 1
1.1.1. Papilarni karcinom štitnjače 1
1.1.1.1. Epidemiologija 2
1.1.1.2. Etiološki čimbenici 2
1.1.1.3. Molekularna patogeneza 3
1.1.1.4. Patohistološki tipovi 3
1.1.1.5. Obrazac metastaziranja papilarnih karcinoma 6
1.1.1.6. Dijagnostičke metode 7
1.1.1.7. Liječenje 10
1.1.1.8. Prognostički čimbenici i klasifikacijski sustavi 11
1.2. Mutacija V600E gena BRAF 17
1.3. Podjedinica 2 specifičnog faktora za cijepanje i poliadenilaciju 18
2. HIPOTEZA **19**
3. CILJEVI RADA **20**
4. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE **21**
4.1. Ispitanici 21
4.2. Materijal i metode 22
4.2.1. Bojanje histokemijskom tehnikom na hemalaun-eozin 22
4.2.2. Imunohistokemijsko bojanje s primarnim poliklonalnim protutijelom na anti-CPSF2 23
4.2.3. PCR 25
4.2.4. Statističke metode 25
5. REZULTATI **26**
6. RASPRAVA **43**
7. ZAKLJUČCI **51**
8. SAŽETAK **53**
9. SUMMARY **54**
10. POPIS LITERATURE **55**
11. ŽIVOTOPIS AUTORA **75**

POPIS OZNAKA I KRATICA

AJCC/UICC	međunarodna udruženja za borbu protiv raka; zajednička klasifikacija zloćudnih tumora po AJCC i UICC (engl. *American Joint Committee on Cancer*; fr. *Union Internationale Contre le Cancer*)
ATA	Američko društvo za štitnjaču (engl. *American Thyroid Association*)
BRAF	protoonkogen (engl. *B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*); B-tip RAF-kinaze
CPSF2	podjedinica 2 specifičnog faktora za cijepanje i poliadenilaciju (engl. *cleavage and polyadenylation specificity factor 2*)
DKŠ	diferencirani karcinom štitnjače
FDG-PET/CT	pozitronska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija s F-18-fluorodeoksiglukozom kao radiofarmakom
FGF	receptor za čimbenik rasta fibroblasta
HE	hemalaun-eozin
KBC	Klinički bolnički centar
L-T4	levotiroksin
MACIS	jedan od klasifikacijskih sustava za diferencirani karcinom štitnjače (engl. *Metastasis, Age, Completeness, Invasion, Size*)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
MAPK/ERK/AKT	signalni put koji uključuje protein-kinazu aktiviranu mitogenima (MAPK, engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*), izvanstaničnu signalno reguliranu kinazu (ERK, engl. *Extracellular signal-Regulated Kinase*) i serin/treonin-kinazu (AKT)
MR	magnetska rezonanca
NIS	natrij-jodnog sunosača (engl. *symporter*)

PDGF	čimbenik rasta koji proizlazi iz trombocita
PKŠ	papilarni karcinom štitnjače
RAI	radioaktivni jod
RAS	skupina onkogena (engl. *rat sarcoma*)
RET	protoonkogen (engl. *rearranged during transfection*)
RET/PTC	rearanžman gena RET
SZO	Svjetska zdrastvena organizacija
Tg	tireoglobulin
Tg-At	antitijela na tireoglobulin
TNM	klasifikacijski sustav stadija karcinoma (engl. *Tumor, Node, Metastasis*)
TSH	tireoid-stimulirajući hormon
TTF-1	tiroidni transkripcijski faktor 1 (engl. *Thyroid Transcription Factor-1*)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Novotvorine štitnjače

Novotvorine odnosno tumori štitnjače dijele se na dobroćudne i zloćudne. Zloćudni tumori tj. karcinomi štitnjače rijetke su maligne neoplazme, no ipak su najčešći maligni tumori endokrinog sustava. Prosječna godišnja incidencija karcinoma štitnjače iznosi oko 2-5/100 000 stanovnika i posljednjih desetljeća kontinuirano raste. Oko 1,5 do 3 puta su češći u žena (1). Prema bazi podataka Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) – GLOBOCAN u 2018. je godini bilo 567 233 oboljelih i 41 071 umrlih od karcinoma štitnjače u svijetu. Procjene su da će do 2030. godine broj oboljelih samo zbog starenja stanovništva porasti na 680 115, a broj umrlih na 56 734. Unatoč porastu incidencije, nema porasta mortaliteta koji se zadržava na oko 0,5 smrtnih slučajeva na 100 000 stanovnika (2).

Maligni tumori štitnjače mogu biti porijeklom iz folikularnih, parafolikularnih ili stromalnih stanica. Većina zloćudnih neoplazmi štitnjače spada u skupinu dobro diferenciranih karcinoma folikularnog epitela, kamo ubrajamo papilarne i folikularne karcinome štitnjače. Osim njih nalazimo medularne karcinome štitnjače, anaplastične karcinome štitnjače i rijetke tumore štitnjače među kojima su limfom, sarkom, fibrosarkom i metastatski karcinom.

Većinom diferencirani karcinomi štitnjače (DKŠ) imaju dobru pa čak i odličnu prognozu, dok kod manjeg dijela nastupi hematogena diseminacija bolesti u udaljena sijela te u najgorem slučaju čak i smrtni ishod. Identificiranje bolesnika s lošom prognozom omogućilo bi agresivniji terapijski pristup te češća i opsežnija praćenja, uz istovremeno izbjegavanje pretjerane dijagnostičke obrade i komplikacija liječenja u bolesnika s indolentnim tijekom bolesti.

1.1.1. Papilarni karcinom štitnjače

Papilarni karcinom štitnjače (PKŠ) je najčešći oblik karcinoma štitnjače te čini oko 80% svih malignih tumora štitne žlijezde (3). Pripada skupini dobro diferenciranih karcinoma porijekla folikularnog epitela. Iako se radi o najčešćoj neoplazmi humanog endokrinog sustava (> 90% svih endokrinih malignoma), predstavlja samo oko 3% malignih tumora u žena i 1% u muškaraca (4).

1.1.1.1. Epidemiologija

Isključujući rano djetinjstvo, papilarni karcinom može se javiti u svakoj životnoj dobi s vrhom incidencije između 30. i 50. godine života, ali postoji značajan broj bolesnika s juvenilnim PKŠ. U dobnoj skupini od 15 do 34 godine, na karcinome štitnjače (prvenstveno papilarne) otpada 7,5% do 10% svih zloćudnih tumora i u toj dobi štitnjača predstavlja najčešće sijelo karcinoma u žena (5-7). PKŠ je znatno češći u žena, s omjerom Ž:M=2,5-3:1 i incidencijom od oko 8,7/100 000 (8).

Pojačani interes za otkrivanjem novih biomarkera baš za PKŠ leži u činjenici da obuhvaća oko 80% svih malignih tumora štitne žlijezde sa značajnim porastom incidencije posljednjih dvadesetak godina svugdje u svijetu (8-9). Kako u međuvremenu nije došlo do porasta incidencije drugih rjeđih malignih tumora štitnjače, većina autora smatra da se porast incidencije može objasniti isključivo poboljšanom dijagnostikom (pogotovo širokom primjenom ultrazvuka i aspiracijske biopsije iglom s citološkom analizom materijala sredinom 80-ih godina prošlog stoljeća) i posljedičnim otkrivanjem te liječenjem malih, asimptomatskih papilarnih karcinoma (tzv. incidentaloma) koji prije dvadesetak i više godina nisu mogli biti dijagnosticirani u toj fazi bolesti (8-10). Prevalencija okultnih karcinoma štitnjače je oko 10^4 puta veća nego incidencija karcinoma štitnjače u populaciji (11). Dodatno u prilog teoriji poboljšane dijagnostike ide i to što je mortalitet od karcinoma štitnjače u većini zemalja ostao uglavnom isti (preživljenje od 95% kroz 25 godina) usprkos eksponencijalnom porastu incidencije PKŠ u svijetu (11,12).

1.1.1.2. Etiološki čimbenici

Izloženost ionizirajućem zračenju područja glave i vrata jedini je dokazani čimbenik okoliša koji uzrokuje PKŠ (13,14). Štitnjača u dječjoj dobi osobito je osjetljiva na ionizirajuće zračenje. Štitnjača je jedini organ gdje rizik za razvoj raka postoji već kod oko 0,10 Gy apsorbirane doze zračenja (15). Osim u djece, rizik je i nešto veći u ženskog spola, nekih populacija Židova te u bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom na karcinom štitnjače (16). Nedostatak joda također povećava rizik od radijacijski induciranog karcinoma štitnjače (17). Od drugih predispozicijskih etioloških čimbenika za PKŠ treba istaknuti poremećaje metabolizma joda te autoimune bolesti štitnjače poput Gravesove bolesti i Hashimoto tireoiditisa (9).

1.1.1.3. Molekularna patogeneza

Aktivirajuće mutacije gena koji kodiraju za signalni put koji uključuje protein-kinazu aktiviranu mitogenima (MAPK) zastupljene su kod čak 80% PKŠ. Ovakve mutacije smatraju se inicijacijskim događajem u nastanku PKŠ, a uključuju promjene protoonkogena - RET, nazvane rearanžmanima RET/PTC, kao i točkaste mutacije skupine onkogena - RAS i BRAF, s time da prisutnost jedne mutacije u primarnom tumoru isključuje prisutnost druge (tj. među njima nema preklapanja). RET gen uključen je u regulaciju rasta, preživljenja, diferencijaciju i migraciju stanica koje potječu iz neuralnog grebena, a kodira transmembranski receptor tirozin kinaze. U folikularnim stanicama štitnjače inače ne nalazimo RET protein (18). RET/PTC onkogen je mutirani oblik RET receptora za tirozin kinazu. Rearanžmani RET/PTC-a češći su kod klasičnog oblika PKŠ, dok su mutacije gena RAS češće u folikularnim varijantama PKŠ, a mutacije BRAF-a kod papilarnih karcinoma visokih stanica. Mutacije BRAF-a često se povezuju s nepovoljnijim kliničkim tijekom PKŠ. Različiti vaskularni endotelni čimbenici rasta (VEGF) i receptori za VEGF (VEGFR-1 i VEGFR-2), kao i receptori za čimbenik rasta fibroblasta (FGF) te čimbenik rasta koji proizlazi iz trombocita (PDGF), često pokazuju prekomjernu ekspresiju u vaskularnom endotelu tkiva raka štitnjače, što je također okidač za MAPK-signalni put (19, 20). Angiogeneza, dakle, predstavlja još jednu potencijalnu metu za ciljanu terapiju. U eksperimentalnim modelima, VEGF-terapija koči rast DKŠ (21).

1.1.1.4. Patohistološki tipovi

PKŠ karakteriziraju nepravilne i nejasne granice prema okolnom tkivu te infiltrativan rast. Oko 10% PKŠ predstavlja inkapsulirani oblik koji se povezuje s manjim postotkom limfogenih metastaza, a time i s boljom prognozom. Mali okultni PKŠ, tzv. papilarni mikrokarcinomi, definirani su kao PKŠ promjera ≤ 1 cm. Otkriveni su prilikom obdukcije u čak 5-35% osoba (22-24). PKŠ su imunohistokemijski pozitivni na tireoglobulin (Tg) i više od 95% njih su prema stupnju diferencijacije gradusa 1 (G1). Odstupanja od uobičajenog patohistološkog uzorka, brojne mitoze, povećane i hiperkromatske jezgre, abnormalni sadržaj DNA i tzv. znakovi dediferencijacije su sve pokazatelji agresivnijeg oblika PKŠ, a češće se susreću u starijih osoba i većih primarnih tumora (25,26).

Sukladno preporuci Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) prema patohistološkoj slici, PKŠ se dijeli na klasični tip i nekoliko podvrsta (folikularni, difuzno sklerozirajući, solidni,

visokostanični (engl. *tall cell*), onkocitni, Warthinu sličan, svijetlostanični i varijantu cilindričnih stanica) (27, 28). Visokostanični tip papilarnog karcinoma ima najlošiju prognozu (29).

Klasična varijanta papilarnog karcinoma štitnjače većinom je makroskopski solidna, čvrsta, na prerezu bjelkasta, obično bez čahure ili samo djelomično očahurena. Manje od 10% tumora je okruženo potpunom čahurom te makroskopski nalikuje adenomu. Unutar njih ponekad se nalaze kalcifikati, a ponekad veća ili manja cistična žarišta. Mogu se naći i područja krvarenja i kolesterolske nakupine, dok je nekroza rijedak nalaz kod uobičajenih oblika PKŠ. Mikroskopski klasična varijanta PKŠ sadrži brojne prave resice. Resice ili papile su obično kompleksne i izražene, s dobro razvijenom fibrovaskularnom stromom i prekrivene jednim slojem karakterističnih tumorskih stanica. Resice i folikuli zastupljeni su u različitim omjerima od karcinoma do karcinoma. Epitelna stanica kuboidnog do nisko cilindričnog oblika s izraženom jezgrom dijagnostički je najznačajnija karakteristika PKŠ (30). Obično nalazimo veliku i nepravilnu jezgru s brazdama i citoplazmatskim inkluzijama. Karakterističan izgled centralnog dijela jezgre poput mutnog stakla (engl. *ground glass*), uzrokuje nuklearni heterokromatin koncentriran uz jezgrinu membranu. Prilikom formiranja papila ili folikula, većina citoplazme tumorskih stanica smještena je u apikalnom ili bazalnom dijelu te se doima da se jezgre susjednih stanica međusobno dodiruju ili preklapaju (31). Unutar ili u okolici tumora, česta su područja fibroze, a mnogi PKŠ sadrže i zone skvamozne diferencijacije (32). Kalcificirane ovalne laminarne strukture promjera 50 – 100 μm, tzv. psamomska tjelešca, nalazimo kod oko jedne trećine do polovice PKŠ, a vjerojatno nastaju u oštećenoj ili umirućoj stanici. Mogu biti smještena u papilarnoj posteljici, fibroznoj stromi ili između tumorskih stanica (33). U oko četvrtine slučajeva nalazimo limfocitnu infiltraciju u stromi koju pojedina istraživanja povezuju s boljom prognozom. Nije u potpunosti jasno je li to reakcija na tumor ili odraz postojećeg tireoiditisa (27).

Folikularni podtip PKŠ u potpunosti se sastoji od malih do srednje velikih nepravilno oblikovanih folikula s varijabilnom količinom koloida. Makroskopski i patohistološki se doima kao očahureni čvor. Dobro oblikovane papile su rijetke, dok su sličnosti s klasičnom varijantom – velike svijetle jezgre s pseudoinkluzijama. Prognoza je slična prognozi klasične varijante PKŠ. Stromalna skleroza i psamomska tjelešca rijetko se vide (27).

Papilarni karcinom visokih stanica (engl. *tall cell***)** rijedak je podtip PKŠ građen od uskih, izduljenih stanica (trostruko veće visine od širine), s eozinofilnom citoplazmom. Opisan

je kao papilarni karcinom koji ima barem 30% visokih stanica. Nalaz često obilježavaju nekroze, vaskularna invazija te prodor kapsule štitnjače s invazijom okolnih struktura vrata. Također, za vrijeme postavljanja dijagnoze su često prisutne metastaze u limfne čvorove te udaljene metastaze. Većinom se javlja u starijih osoba i ima visoku stopu smrtnosti (34).

Solidni podtip PKŠ obilježavaju solidne nakupine tumorskih stanica s tipičnim nuklearnim obilježjima za papilarni karcinom, a povezuje se s dediferencijacijom i agresivnijim kliničkim tijekom te lošijom prognozom od klasične varijante. Znatno su češći u djece koja u anamnezi imaju izloženost radioaktivnom zračenju (npr. nakon černobilske nesreće). Papile ili folikuli mogu biti rijetki u primarnom tumoru, no češće se nađu u limfogenim metastazama. Prisutnost psamomskih tjelešaca, karakterističnih jezgara i limfocitna infiltracija unutar i u okolici tumora pomaže u razlikovanju spram medularnog karcinoma, solidnog folikularnog karcinoma ili inzularnog karcinoma štitnjače. Žarišno se može naći pozitivna imunohistokemijska reakcija na Tg, uz negativnu reakciju na kalcitonin (35).

Onkocitni podtip značajno je češći u žena te se povezuje s autoimunim tireoiditisom. Makroskopski je na prerezu smeđe boje, dok se mikroskopski nalaze papile ili folikuli obloženi stanicama koje izgledaju poput Hurthleovih, ali su im jezgre tipične za papilarni karcinom. Obilježeni su kompleksnom razgranatošću papila u kojima onkocitne stanice pokrivaju tanku fibrovaskularnu stromu. Sklon je široko invazivnom načinu rasta (36).

Svijetlostanični podtip spada u rijetke varijante PKŠ. Češće papilarne te rjeđe folikularne građe, sastavljen od svijetlih stanica, jezgara istovjetnih klasičnoj varijanti papilarnog karcinoma. Imunohistokemijska bojanja na Tg i tiroidni transkripcijski faktor-1 (TTF-1) pomažu razlikovati ovaj podtip PKŠ od metastaze bubrežnog karcinoma, paratireoidnog tumora, svijetlostaničnog medularnog karcinoma štitnjače te drugih svijetlostaničnih tumora. Prognoza ovoga podtipa slična je kao kod klasične varijante (37).

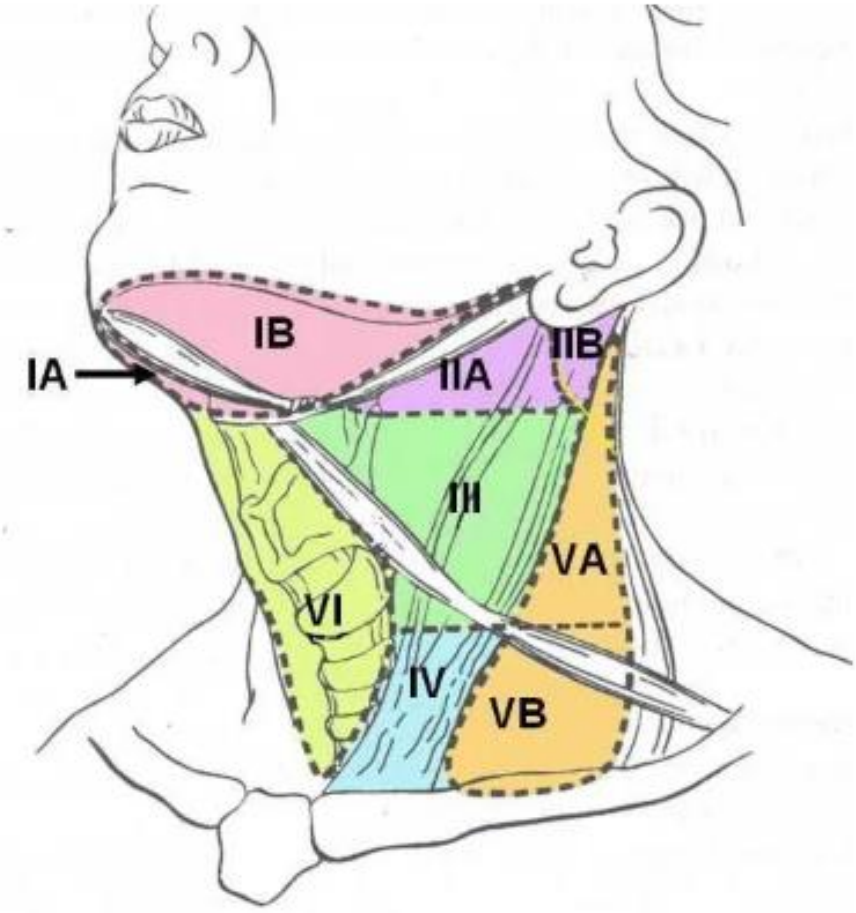
Warthinu sličan podtip više je zastupljen u ženskoj populaciji. Histološka slika u ovom podtipu nalik je na Warthinov tumor žlijezda slinovnica. Obilježava ga papilarna građa, onkocitne citoplazme i karakteristične jezgre te jaka limfocitna infiltracija strome resica. Također se često dovodi u vezu s autoimunim tireoiditisom. Prognoza se bitno ne razlikuje u odnosu na klasičnu varijantu PKŠ (38).

Difuzno sklerozirajući podtip rijedak je, češći kod djece i mlađih žena. Tumor difuzno zahvaća sve limfne prostore jednog režnja ili čitave štitnjače, a udružen je s izrazitim limfocitnim tireoiditisom ili intersticijskom fibrozom, jakom pločastom metaplazijom uz brojna psamomska tjelešca. Uobičajeno je ekstratireoidno širenje, a većina bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze ima i limfogene metastaze u regionalnim limfnim čvorovima vrata i hematogene metastaze u plućima. Prognoza je slična klasičnoj varijanti papilarnog karcinoma (39).

Papilarni karcinom cilindričnih stanica izrazito je rijedak. Uglavnom se javlja kod muškaraca starije životne dobi, agresivnijeg kliničkog tijeka od klasične varijante papilarnog karcinoma. Tumor je građen od visokih kolumnarnih stanica koje su pseudostratificirane i mogu u sebi imati supranuklearne ili subnuklearne citoplazmatske vakuole. Viđene su varijabilne proporcije papilarne, folikularne, trabekularne i solidne građe (40).

1.1.1.5. Obrazac metastaziranja papilarnih karcinoma

Širenjem u limfne prostore štitnjače, PKŠ uzrokuje pojavu sinkronih žarišta tumora unutar parenhima oba režnja štitnjače (multifokalnost), s učestalošću od 18% do 87%, kao i visok postotak limfogenih metastaza u limfne čvorove vrata (30% do 80%) (3, 41-45). Metastaze se u pravilu prvo javljaju u zoni primarne limfatičke drenaže: u centralnim regijama vrata (pre-i paratrahealni čvorovi te čvorovi u gornjem medijastinumu), a potom u zoni sekundarne limfatičke drenaže koju čine limfni čvorovi lateralnih regija vrata (regije II.-V.) (46-49). Ponekad tumor metastazira u nepredvidljivom obrascu te takve metastaze nazivamo preskačućim ili „skip“ metastazama (odsutnost metastaza u centralnoj regiji vrata). U grupi bolesnika s dokazanim metastazama u limfnim čvorovima vrata učestalost „skip“ metastaza je i do 20% (50-52). Regije i podregije vrata prikazane su na slici 1.



Slika 1. Slikovni prikaz omeđenja regija i podregija vrata
(preuzeto iz Harish K. Neck dissections: radical to conservative.
World J Surg Oncol. 2005;3:21)

Invazija krvnih prostora PKŠ rijetko se nalazi. U trenutku postavljanja dijagnoze, 3% bolesnika ima prisutne hematogene metastaze, dok će ih ukupno u nekom trenutku tijekom života dobiti oko 10%. Udaljene će metastaze razviti oko 20% bolesnika koji u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lokoregionalno proširenu bolest (53). Udaljene metastaze najčešće nastaju u plućima, potom u kostima, a rjeđe u drugim sijelima. 5-godišnje preživljenje se kreće oko 50% zbog osjetljivosti metastaza na terapiju radioaktivnim jodom (RAI) (54).

1.1.1.6. Dijagnostičke metode

Svakoj detaljnijoj dijagnostici čvora u štitnjači mora prethoditi kompletna anamneza, fizikalni pregled vrata i određivanje koncentracije tireotropina u serumu. DKŠ sintetiziraju Tg,

nakupljaju jod i osjetljivi su na stimulaciju s TSH, što su sve jedinstvene značajke korisne u postavljanju dijagnoze, liječenju i praćenju ovih bolesnika.

Ultrazvučni pregled vrata i aspiracijska biopsija iglom s citološkom analizom materijala imaju ključnu ulogu u ranom otkrivanju i u praćenju bolesnika s DKŠ. Čvorovi promjera većeg od 1,5 cm ili ultrazvučno suspektni čvorovi bez obzira na veličinu, indikacija su za aspiracijsku biopsiju iglom s citološkom analizom materijala. Ultrazvučna obilježja čvora koja upućuju na malignost su hipoehogenost, mikrokalcifikati, nepravilni rubovi, anteroposteriorni promjer čvora veći od transverzalnog te pojačana prokrvljenost unutar čvora metodom obojenog Dopplera (CD) (55). Uz ultrazvučni pregled ležišta štitnjače, analiziraju se ultrazvučna obilježja limfnih čvorova vrata, a kod ultrazvučno suspektnih čvorova neophodna je aspiracijska biopsija iglom s citološkom analizom materijala pod kontrolom ultrazvuka s određivanjem Tg u punktatu. Osjetljivost aspiracijske biopsije štitnjače varira između 65% i 99%, a specifičnost između 72% i 100%. Citološka dijagnoza bolesti štitnjače zapravo je kliničko-citološka dijagnoza, jer se temelji na korelaciji citomorfološke slike i dostupnih kliničkih podataka. Dodatne metode komplementarne citologiji poput imunocitokemije, PCR i protočne citometrije pomažu razlučiti vrstu tumora, primarni tumor od sekundarne metastaze i korisne su u diferencijalnoj dijagnostici suspektnih promjena.

Od **laboratorijskih metoda** u svakodnevnoj praksi koristimo određivanje Tg u praćenju bolesnika nakon totalne tireoidektomije. Tg je specifični tumorski biljeg DKŠ, međutim nema vrijednost u prijeoperacijskoj dijagnostici. Tg ima visoku osjetljivost i specifičnost u otkrivanju recidiva DKŠ kod bolesnika u kojih je provedena totalna tireoidektomija i radiojodna ablacija ostatnog tkiva štitnjače (56). Određivanje Tg-a se najčešće vrši uz stimulaciju tireoid-stimulirajućeg hormona (TSH) koja se postiže prekidom terapije levotiroksina (L-T4) ili uz rekombinantni humani TSH (rhTSH) (57, 58). Pri svakom određivanju Tg-a potrebno je odrediti TSH i antitireoglobulinska protutijela (Tg-At). Ukoliko su pozitivna Tg-At, tada je vrijednost Tg-a kao tumorskog biljega nepouzdana. Povišen titar Tg-At moguć je znak prisutnosti lokalnih/regionalnih ili hematogenih metastaza.

Dijagnostička radiojodna scintigrafija cijelog tijela obično prethodi radiojodnoj terapiji, a omogućuje otkrivanje ostatnog tkiva štitnjače i prisustva metastaza. Dijagnostička scintigrafija cijelog tijela izvodi se uz primjenu 37-111 MBq (1-3 mCi), rjeđe 185 MBq (5 mCi) aktivnosti I-131, a snima se gama-kamerom dva do tri dana kasnije. Primjena viših dijagnostičkih doza (5 – 10 mCi) može imati negativan učinak na kasniju primjenu terapijske doze RAI,

odnosno može imati tzv. učinak ošamućenja (engl. *stunning*) stoga dijagnostička scintigrafija cijeloga tijela s I-131 nije indicirana za rutinsko praćenje bolesnika bez znakova bolesti (59-62). Dijagnostička scintigrafija I-131 se ne preporučuje u niskorizičnih bolesnika s negativnim stimulirajućim Tg i urednim ultrazvukom vrata nakon provedene ablacijske terapije I-131 (63). Dijagnostička scintigrafija cijelog tijela I-131 primjenjuje se prije ablacije kada je upitan opseg provedenog operativnog zahvata ili kada je nalaz potreban za odluku o terapiji ili dozi RAI. Postterapijska scintigrafija cijelog tijela izvodi se pet do osam dana nakon terapijske primjene RAI. Ona je znatno osjetljivija od dijagnostičke scintigrafije cijelog tijela u otkrivanju metastaza (64-66) pogotovo ako se kombinira s **jednofotonskom emisijskom kompjutoriziranom tomografijom (SPECT, engl. *single photon emission tomography*)** (67,68). Nakupljanje RAI u metastazama, kao i sijela manje veličine imaju povoljan prognostički značaj (69). Lošiju prognozu imaju i bolesnici s tumorima koji pokazuju sniženu ekspresiju membranskog natrij-jodnog sunosača (NIS, engl. *symporter*) i time slabije nakupljanje RAI. Uglavnom su zastupljeni u bolesnika starije životne dobi (53, 70), a neki autori dovode u vezu prisutnost BRAF mutacije sa slabijom ekspresijom NIS-a (147).

Pozitronska emisijska tomografija (**PET/CT)** metoda je koja kombinira pozitronsku emisijsku tomografiju (PET) – koja pokazuje intenzitet metabolizma glukoze u stanicama i kompjutoriziranu tomografiju (CT) – koja pokazuje anatomiju i morfologiju organa. Koristi 18F-fluorodeoksiglukozu (FDG) kao kontrast. Ova pretraga se najviše koristi u svrhu kliničkog praćenja bolesnika, procjene proširenosti bolesti i učinka liječenja te otkrivanja recidiva bolesti i metastaza karcinoma štitnjače (71-73). Nezamjenjiva je u otkrivanju metastaza DKŠ koje su prestale nakupljati RAI i zbog toga se više ne mogu vidjeti na radiojodnoj scintigrafiji, no i dalje nije supstitucija za radiojodnu scintigrafiju, već su obje komplementarne. FDG-PET/CT i radiojodna scintigrafija najčešće se izvode sekvencijski nakon uskrate hormona štitnjače ili primjene rhTSH zbog boljih rezultata.

CT li magnetna rezonanca (MR) koriste se samo prema kliničkoj indikaciji u inicijalnoj evaluaciji proširenosti tumora u područje grkljana, dušnika, jednjaka ili velikih krvnih žila i živaca (74, 75). CT je optimalna metoda za procjenu plućnih metastaza (71). MR daje bolje rezultate u procjeni edema tumorskog tkiva koji može uzrokovati kompresiju leđne moždine zbog lezije u kralješcima i bolje otkriva moždane metastaze. Edem tumorskog tkiva može se pojaviti nakon radiojodne terapije i nakon primjene rhTSH (76).

1.1.1.7. Liječenje

Operativno liječenje kao temeljni modalitet liječenja može uključivati lobektomiju, totalnu tireoidektomiju te u slučaju postavljene sumnje na prisutne metastaze u limfne čvorove vrata – selektivnu disekciju vrata. Postoperativno se provodi **radijojodna ablacija** jodom-131 zaostalih stanica štitnjače odnosno tkiva i dugoročna **TSH supresijska hormonska terapija** L-tiroksinom.

Totalna tireoidektomija (kirurško odstranjenje štitnjače) je uglavnom primarna terapija izbora. Lobektomija štitnjače (odstranjenje samo jednog režnja štitnjače) dostatna je u slučaju niskorizičnih bolesnika s mikropapilarnim karcinomom ili s izoliranim papilarnim karcinomom manjim od 4 cm bez zahvaćenosti limfnih čvorova, bez proboja kapsule štitnjače i bez vaskularne invazije (29). **Lobektomija** nosi manji rizik kirurških komplikacija poput oštećenja povratnog laringealnog živca i trajnog hipoparatireoidizma (46, 77), no u isto vrijeme neki autori joj se protive imajući na umu izrazitu sklonost multifokalnom rastu tumora i većoj stopi recidiva nakon lobektomije (78-80). Kada su za dugoročno praćenje bolesnika s DKŠ važni mjerenja serumskoga Tg-a i scintigrafija cijeloga tijela s I-131, tada je kod inicijalnoga kirurškog liječenja potrebno učiniti totalnu tireoidektomiju (81,82). Kirurški zahvat totalne tireoidektomije potrebno je proširiti s odstranjivanjem limfnih čvorova prelaringealno, pre- i paratrahealno, iz gornjeg medijastinuma, lateralno do karotidne arterije te kranijalno do razine jezične kosti (**selektivna disekcija** regije VI) u slučaju postojanja metastaza dotične regije. Elektivna (profilaktična) disekcija centralne regije vrata potrebna je tek kod većih tumora (T3 i T4 prema TNM klasifikaciji). U slučaju pojave metastaza na lateralnoj strani vrata, uz selektivnu disekciju regije VI potrebno je uključiti i selektivnu disekciju lateralnih regija vrata (II-V). Elektivna disekcija lateralnih regija vrata se ne preporučuje (83, 84).

Nakon kirurškog liječenja, osim za bolesnike vrlo niskog rizika, većini slijedi **radiojodna ablacija** ostatnog tkiva štitnjače (82, 85). Uništavanjem mikroskopskih žarišta i mogućih mikrometastaza DKŠ smanjuje se nastanak lokalnog i regionalnog recidiva bolesti (86). Određivanje doze radioaktivnog izotopa joda 131I izvodi se na tri načina: najveća sigurna doza temeljena na dozimetriji cijelog tijela i krvi, kvantitativna tumorska dozimetrija i empirijska fiksna doza (87-90). Povišeni TSH (>30 mU/L) stimulira nakupljanje 131I u ostatnom tkivu štitnjače. Porast TSH može se postići prekidom supresijske terapije L-tiroksinom u trajanju od četiri do pet tjedana ili upotrebom rekombinantnog humanog TSH (91, 92). Tri tjedna prije radiojodne ablacije preporuča se dijeta sa smanjenim unosom joda. Hematogene metastaze DKŠ

u pravilu dobro odgovaraju na liječenje RAI i kod oko 40% bolesnika dolazi do potpune regresije bolesti unutar pet godina (93).

Stanice DKŠ osjetljive su na stimulaciju TSH stoga supresijska terapija L-tiroksinom smanjuje rizik od recidiva bolesti (94). Razinu **TSH supresije** treba odrediti individualno, uzimajući u obzir rizične čimbenike koji se odnose na sam tumor kao i dob bolesnika i eventualne prisutne komorbiditete (95).

Ciljana terapija rezervirana je za liječenje radiorezistentne i uznapredovale bolesti. Definicija rezistencije na RAI uključuje prisutnost barem jednog tumorskog žarišta koje nimalo ne nakuplja RAI ili progresija bolesti unutar godine dana nakon terapijske aplikacije radiojoda (96). Procjena je da će oko 30% do 66% hematogenih metastaza DKŠ postati refraktorno na terapiju RAI (54, 93, 97, 98). Bolest refrakterna na RAI najčešće je agresivna, češća je u starijih, onih s velikim metastazama i s manje diferenciranim karcinomima štitnjače, kao i onih kod kojih postoji intenzivno nakupljanje FDG-glukoze na PET/CT-u (93, 99). Dva su glavna mehanizma djelovanja ciljane biološke terapije na DKŠ: inhibicija angiogeneze i inhibicija stanične proliferacije i preživljenja. Dok VEGF i PDGF imaju svoje uloge u tumorskoj neoangiogenezi, mutacije i abnormalna aktivacija gena koji kodiraju za sastavne dijelove signalnog puta koji uključuje protein-kinazu aktiviranu mitogenima, izvanstaničnu signalno reguliranu kinazu i serin/treonin-kinazu (MAPK/ERK/AKT) česti su u DKŠ (100,101). Odluku o započinjanju liječenja radiorezistentnih i uznapredovalih DKŠ biološkom terapijom treba donijeti multidisciplinarni konzilij koji uključuje otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, nuklearnu medicinu te onkologiju. Vemurafenib (inhibitor tirozin kinaze) koji cilja BRAF mutaciju nije trenutno predmet istraživanja samo u slučaju inoperabilnog PKŠ refrakternog na RAI, nego i kao incijalni tretman lokalno agresivnog PKŠ. Osnovna premisa ovih kliničkih studija je da blokirajući ovu mutaciju, lijek može ubiti stanice raka s mutacijom i/ili zaustaviti rast tumora, a time i pojačati avidnost na RAI.

1.1.1.8. Prognostički čimbenici i klasifikacijski sustavi

Nužno je preispitati dosadašnju kliničku praksu izbora modaliteta kirurškog liječenja, postoperativne radiojodne ablacije, odabira optimalnog dijagnostičkog alata i učestalost praćenja u dugoročnom nadzoru bolesnika s PKŠ iz nekoliko razloga. PKŠ maligna je bolest s najboljom prognozom u ljudskom tijelu (3), a porast incidencije svugdje u svijetu uz široku

primjenu ultrazvučne dijagnostike razlogom je sve većeg udjela bolesnika čiji je stadij karcinoma dijagnosticiran u početnoj fazi bolesti (mali, asimptomatski, lokalizirani karcinomi) koji pripadaju niskorizičnoj skupini bolesnika (102). Svako liječenje može imati nuspojave i posljedice, ponekad i dugoročne, a kod ove niskorizične skupine se optimalnim odabirom terapije većina ozbiljnih posljedica može izbjeći, kako kirurgije tako i radiojodne ablacije (103-108). Osim narušavanja kvalitete života ovih bolesnika, nepotrebno i pretjerano liječenje i njegove posljedice te učestala dijagnostička obrada tijekom dugoročnog praćenja uzrokuju značajan trošak financijskih sredstava i ljudskih resursa svakog zdravstvenog sustava. Pomnijom selekcijom već u početnoj fazi bolesti isti bi se mogli preusmjeriti na visokorizične pacijente i skupo ciljano liječenje agresivnijih oblika PKŠ. Za sada su konvencionalni patohistološki i klinički parametri ključni u procjeni kategorije rizika za recidiv bolesti ili smrtni ishod i za donošenje terapijskih odluka. Tijekom godina razvijeni su brojni klasifikacijski sustavi (npr. EORTC, AMES, GAMES, MACIS, OSU, NOGUCHI, NTCTCS...) za DKŠ koji uzimaju u obzir različite kliničke i patohistološke parametre (tablica 1) (109).

Tablica 1. Klasifikacijski sustavi

Mayo Clinic (AGES), Hay, 1987.	**Lahey Clinic (AMES), Cady & Rossl, 1988.**	**Mayo Clinic (MACIS), Hay, 1993.**	**Memorial Sloan Kettering (GAMES), Saha, 1994.**	**Ohio State University, Mazzaferi & Jhiang, 1994.**	**Noguchi Thyroid Clinic, Noguchi, 1994.**	**Karolinska Hospital and Institute (DAMES), 1992.**
Age	**A**ge	Distant	**G**rade	Size	Age	**D**NA
Grade	**M**etastases	**M**etastases	**A**ge	Regional	Sex	ploidy
Extension	**E**xtension	**A**ge	**M**etastase**s**	Metastases	Size	**A**ge
Size	**S**ize	**C**ompleteness of resection	**E**xtension	Multifocality	Invasion	**M**etastases
		Invasion	**S**ize	Invasion	Metastases	**E**xtent
		Size		Distant Metastases		**S**ize

U većini istraživanja na temelju velikih multivarijantnih analiza velikih kohorti bolesnika izdvojeni su kao loši prognostički čimbenici – starija dob (>45 god.), muški spol, određene histološke značajke tumora (visokostanični i kolumnarni tip, slabiji stupanj diferencijacije i limfovaskularna invazija), veličina tumora (>4 cm), ekstratireoidno širenje te lokoregionalne i udaljene metastaze (110-114). Najraširenij klasifikacijski sustav je TNM sustav Američkoga zajedničkog odbora za karcinom (AJCC, engl. *American Joint Committee on Cancer*,) i

Međunarodnog udruženja za karcinom (UICC, engl. *Union for International Cancer Control*,) (Tablica 2).

Tablica 2. TNM klasifikacija tumora štitnjače (AJCC/TNM 8. izdanje)

PRIMARNI TUMOR (T)	
TX	primarni se tumor ne može procijeniti
T0	nema dokaza primarnog tumora
T1	tumor veličine ≤ 2 cm ograničen na štitnjaču
T1a	tumor veličine ≤ 1 cm ograničen na štitnjaču
T1b	tumor veličine 1 – 2 cm ograničen na štitnjaču
T2	tumor veličine 2 – 4 cm ograničen na štitnjaču
T3	tumor veličine > 4 cm ograničen na štitnjaču ili tumor bilo koje veličine sa širenjem u male mišiće vrata (sternohioidni, sternotiroidni, tirohioidni i omohioidni mišić)
T3a	tumor veličine > 4 cm ograničen na štitnjaču
T3b	tumor bilo koje veličine sa širenjem u male mišiće vrata (sternohioidni, sternotiroidni, tirohioidni i omohioidni mišić)
T4	tumor bilo koje veličine sa širenjem na velike strukture vrata
T4a	tumor bilo koje veličine sa širenjem u potkožno meko tkivo, grkljan, dušnik, jednjak ili povratni laringealni živac
T4b	tumor bilo koje veličine sa širenjem u prevertebralnu fasciju i karotidnu arteriju ili medijastinalne krvne žile
REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI (N)	
NX	regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
N0	nema dokazanih regionalnih metastaza
N1	metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
N1a	metastaze u limfnim čvorovima prednje regije vrata ili gornjeg medijastinuma (pretrahealni, paratrahealni, prelaringealni limfni čvorovi ili limfni čvorovi gornjeg medijastinuma - regija VI ili VII)
N1b	metastaze u limfnim čvorovima lateralne regije vrata (regije I, II, III, IV, V) ili retrofaringealne limfne čvorove
UDALJENE METASTAZE (M)	
M0	nema udaljenih metastaza
M1	postoje udaljene metastaze

Njegova je specifičnost kod karcinoma štitnjače (u odnosu na stupnjevanje zloćudnih tumora drugih lokalizacija) što osim karakteristika tumora (veličina primarnoga tumora i njegov lokalni rast (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) te postojanje udaljenih metastaza (M) uzima u obzir dob bolesnika kod stupnjevanja u stadije. Tako se bolesnici mlađi od 55 godina svrstavaju u stadije bolesti I. ili II., ovisno o odsutnosti ili prisutnosti udaljenih metastaza.

Tek bolesnici u dobi od 55 godina ili stariji mogu imati III. ili IV. stadij bolesti. Navedeno je proizašlo iz podataka o puno boljoj prognozi bolesti u mlađih bolesnika uslijed velike učinkovitosti radiojodne terapije i povoljnijeg biološkog ponašanja DKŠ-a u mlađoj životnoj dobi, čak i u slučaju prisustva udaljenih metastaza (tablice 3 i 4).

Tablica 3. Klinički stadiji dobro diferenciranog karcinoma štitnjače u bolesnika mlađih od 55 godina (AJCC/TNM 8. izdanje)

Stadij I	bilo koji T, bilo koji N, M0
Stadij II	bilo koji T, bilo koji N, M1

Tablica 4. Klinički stadiji dobro diferenciranog karcinoma štitnjače u bolesnika starijih od 55 godina (AJCC/TNM 8. izdanje)

Stadij I	T1 i T2, N0, M0
Stadij II	T1 – T3a/T3b, bilo koji N, M0
Stadij III	T4a, bilo koji N, M0
Stadij IVa	T4b, bilo koji N, M0
Stadij IVb	bilo koji T, bilo koji N, M1

Većina spomenutih klasifikacijskih sustava primarno predviđaju specifičnu smrtnost bolesnika, ali imaju ograničen značaj u procjeni rizika od recidiva bolesti, što je puno važniji parametar za optimalan nadzor i dugoročno praćenje bolesnika (115). Stoga je Američko društvo za štitnjaču (ATA) sumiralo različite klasifikacijske sustave i bolesnike oboljele od DKŠ-e podijelilo u tri skupine na temelju procjene rizičnosti razvoja recidiva na one niskog, srednjeg i visokog rizika.

Smjernice ATA prilikom procjene rizika uzimaju u obzir, osim standardnih kliničkih parametara i histopatoloških karakteristika tumora (tablica 5) i dinamičku procjenu rizika. Dinamička procjena rizika bazira se na dijagnostičkim nalazima tijekom praćenja bolesnika, kao što je vrednovanje tzv. odgovora bolesnika na inicijalnu terapiju (engl. *response to therapy*) tj. kliničkom ishodu bolesti (tablica 6) (29). Ovisno o svrstavanju bolesnika u pojedinu kategoriju, može se intenzivirati ili ublažiti učestalost i opseg dijagnostičkih postupaka tijekom inicijalne obrade i praćenja te individualizirati terapija – primjerice opsežnost operacijskog zahvata, doza RAI u ablaciji ostatnog tkiva ili njezino izostavljanje, odluka o provođenju supresije TSH ili samo supstitucije L-tiroksinom. Upravo ovakav pristup optimalnijem i individualnijem liječenju bolesnika s DKŠ-e otvorio je mogućnost značajnog smanjenja broja pa i izostavljanja pojedinih dijagnostičkih testova prvenstveno u skupini niskorizičnih bolesnika. Suvremene studije bave se pronalaskom pouzdanih biomarkera koje bi uvrstili u prikazanu klasifikaciju rizika i time bolje planirali liječenje i praćenje ovih bolesnika.

Tablica 5. Stratifikacija rizika bolesnika s DKŠ prema smjernicama ATA (engl. *American Thyroid Association*) 2015. (29)

ATA-niskorizični:
• PKŠ (sa svim dolje navedenim):
○ bez lokalnih ili udaljenih metastaza;
○ potpuna resekcija makroskopske bolesti;
○ bez tumorske invazije u lokoregionalna tkiva ili strukture;
○ bez agresivne histologije (npr. visokostanični, kolumnarni);
○ ako je primijenjen 131-I, bez RAI-avidnih metastatskih sijela izvan ležišta štitnjače na 1. postterapijskoj radiojodnoj scintigrafiji cijelog tijela;
○ bez vaskularne invazije;
○ klinički N0 ili ≤5 pN1 mikrometastaza (najveća - dimenzija <0,2cm);
• intratireoidna, inkapsulirana folikularna varijanta PKŠ;
• intratireoidni, dobro diferencirani folikularni karcinom štitnjače s kapsularnom invazijom, ali bez ili s minimalnom (<4 fokusa) vaskularnom invazijom;
• intratireoidni, papilarni mikrokarcinom, unifokalni ili multifokalni, isključujući one koji su BRAF V600E mutirani (ako je učinjena analiza)

ATA-srednjerizični:
– mikroskopska invazija tumora u peritireoidna meka tkiva;
– RAI-avidna metastatska sijela na vratu na 1. postterapijskoj radiojodnoj scintigrafiji cijelog tijela;
– agresivna histologija (npr. visokostanični, kolumnarni ca.);
– PKŠ s vaskularnom invazijom;
– klinički N1 ili >5 pN1, s time da su svi <3 cm u najvećem promjeru;
– multifokalni papilarni mikrokarcinom s ETE i BRAFV600E mutirani (ako je učinjena analiza)
ATA-visokorizični:
– makroskopska invazija tumora u peritireoidna meka tkiva (makroskopska ETE);
– nepotpuna resekcija tumora;
– udaljene metastaze;
– postoperacijski serumski Tg sugerira udaljene metastaze;
– pN1 s bilo kojim metastatskim limfnim čvorom ≥3 cm u najvećem promjeru;
– folikularni karcinom štitnjače s ekstenzivnom vaskularnom invazijom (> 4 fokusa vaskularne invazije)

Tablica 6. Podjela bolesnika s DKŠ prema odgovoru na terapiju (kliničkom ishodu) po smjernicama ATA (engl. *American Thyroid Association*) 2015. (29)

• ***Odličan odgovor***: bez kliničkih, biokemijskih ili strukturnih znakova bolesti;
• ***Biokemijski nepotpuni odgovor***: povišeni Tg ili rastuće razine Tg-At bez dokazive bolesti;
• ***Strukturni nepotpuni odgovor***: morfološki patološki supstrat;
• ***Neodređeni odgovor***: nespecifični biokemijski ili strukturni nalazi koji se ne mogu sa sigurnošću okarakterizirati ni kao benigni ni kao maligni. Ovo uključuje bolesnike sa stabilnim ili padajućim vrijednostima Tg-At bez jasnog strukturnog dokaza o prisutnosti bolesti

1.2. Mutacija V600E gena BRAF

Mutacije protoonkogena BRAF značajne su u staničnoj i tumorskoj progresiji. BRAF mutacija aktivira signalne BRAF serin-treonin kinaze koji dalje utječu na MAPK signalnu kaskadu (116). Mutacije na genu BRAF u kojima dolazi do supstitucije valina na amino-kiselinskom mjestu 600 (V600E) rezultiraju konstitutivnom aktivacijom proteina BRAF, što može uzrokovati proliferaciju stanica i kada nisu prisutni čimbenici rasta uobičajeno potrebni za proliferaciju. U brojnim istraživanjima utvrđena je korelacija prisutnosti V600E mutacije gena BRAF i agresivnog ponašanja PKŠ (117-134). V600E mutacije gena BRAF najčešća je genetska mutacija PKŠ (135,136). Nekoliko studija navodi da je udio papilarnih karcinoma koji imaju BRAF mutaciju konstantan ili čak u porastu tijekom prošlih desetljeća (137, 138). Većina studija naglašava veliku varijabilnost u prevalenciji mutacije V600E gena BRAF u PKŠ, a kreće se između 30% i 80%, ovisno o zemljopisnom položaju regije i konzumaciji joda (139-145). Ovu mutaciju ne sadrže tumori sa solidnom komponentom (solidni podtip), dok je u papilarnih karcinoma u djece ili djece koja su bila izložena radioaktivnom zračenju navedena mutacija zastupljena u manje od 10% bolesnika (146). U Hrvatskoj do sada nije provedeno istraživanje koje bi utvrdilo prevalenciju ove mutacije u PKŠ. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se prisustvo ove mutacije adekvatno moglo uvrstiti u postojeće klasifikacijske sustave s poznatim faktorima rizika. Predklinička istraživanja ukazuju da prisustvo BRAFV600E mutacije značajno smanjuje ekspresiju NIS-a i time nakupljanje RAI (147), stoga je prisustvo ove mutacije važno i u kasnijem ciljanom liječenju takvih PKŠ inhibitorima tirozin-kinaze.

1.3. Podjedinica 2 specifičnog faktora za cijepanje i poliadenilaciju

Analizom genoma i razine ekspresije gena u tkivu PKŠ, Nilubol Naris i sur. (2011.), utvrdili su pet gena (CPSF2, LARS, AURKC, TRNT1 i BCL11A) koji su različito eksprimirani u bolesnika s PKŠ vezanim uz višu stopu smrtnosti. Od navedenih pet gena, podjedinica 2 specifičnog faktora za cijepanje i poliadenilaciju (CPSF2, engl. *cleavage and polyadenilation specificity factor subunit 2*) ima najvišu prediktivnu vrijednost (148). Smanjena ekspresija gena CPSF2 povezana je s invazivnošću kacinomskih stanica, prisutna u matičnim stanicama malignoma i agresivnom obliku PKŠ te posljedično tome povezana s lošijim ishodom i prognozom (149). CPSF2 je 100 kDa velika podjedinica proteina CPSF koji se sastoji od četiri polipeptida (160, 100, 73 i 30 kDa) i potreban je za cijepanje i poliadenilaciju mRNA. PKŠ sa smanjenom ekspresijom proteina CPSF2 povezani su s većom učestalosti metastaza u limfne čvorove vrata, udaljenih metastaza i recidiva (150). Za sada nema dovoljan broj studija koje bi dokazale da se smanjena ekspresija CPSF2 proteina može koristiti kao samostalan i neovisan prediktivni faktor nepovoljnijeg oblika bolesti.

2. HIPOTEZA

Prisutnost mutacije V600E gena BRAF te niska razina ekspresije CPSF2 proteina češća je u papilarnom karcinomu štitnjače s metastazama u regionalne limfne čvorove vrata.

3. CILJEVI RADA

Opći cilj istraživanja

- Utvrditi učestalost mutacije V600E gena BRAF i razina ekspresije CPSF2 proteina u uzorcima tkiva papilarnih karcinoma štitnjače bolesnika operiranih na Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC-a Zagreb

Specifični ciljevi istraživanja

- Istražiti odnos prisutnosti mutacije V600E gena BRAF s kliničko-patološkim osobitostima papilarnih karcinoma štitnjače
- Istražiti odnos razine ekspresije CPSF2 proteina s kliničko-patološkim osobitostima papilarnih karcinoma štitnjače
- Istražiti međusoban odnos prisutnosti mutacije V600E gena BRAF i razine ekspresije CPSF2 proteina s kliničko-patološkim osobitostima papilarnih karcinoma štitnjače

4. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

4.1. Ispitanici

Ovo je istraživanje retrospektivno i provedeno je na arhivskom bioptičkom materijalu (parafinski blokovi) Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb dobivenom od bolesnika operiranih u razdoblju od 2006. do 2014. godine pri Klinici za bolesti uha, nosa, grla i kirurgiju glave i vrata, KBC Zagreb. U istraživanje je uključeno 150 bolesnika operiranih od strane jednog operatera. Za istraživanje su se koristili samo materijali bolesnika s histološki potvrđenim papilarnim karcinomom štitnjače, od kojih 50 bez (kontrolna skupina) i 100 s (ispitivana skupina) prisutnim metastazama u regionalne limfne čvorove vrata u vrijeme postavljanja inicijalne dijagnoze.

U istraživanje su uključeni samo bolesnici koji nisu prethodno operirani ili zračeni na vratu i u kojih je minimalni kirurški postupak totalna tireoidektomija. Svim bolesnicima u ispitivanoj skupini još je učinjena i selektivna disekcija vrata (reg.VI ili II-V i VI). Za istraživanje su se koristili samo materijali bolesnika za koje su bili dostupni detaljni anamnestički i patohistološki podaci (TNM klasifikacija i stadij, histološki tip, prisutnost limfovaskularne invazije, multifokalnost, prisustvo ekstratiroidnog širenja i proširenost u limfne čvorove vrata). Radi bolje preglednosti u daljnjem tekstu, tablicama i slikama koriste se sljedeće skraćenice: veličina tumora (T), zahvaćenost limfnih čvorova vrata (N) i klinički stadij bolesti izražen prema TNM klasifikaciji diferenciranih karcinoma štitnjače prema međunarodnom udruženju za borbu protiv raka (AJCC/UICC), zatim prisustvo limfovaskularne invazije (LIMFOVAS) i okultnih metastaza (Okultne). Za histološke podtipove PKŠ korištene su numeričke oznake od 1 do 8 (1 – klasična varijanta, 2 – folikularni podtip, 3 – podtip visokih stanica, 4 – solidni podtip, 5 – onkocitni podtip, 6 – Warthinu slični podtip, 7 – svijetlostanični podtip, 8 – difuzno sklerozirajući). U tablicama i slikama u dijelu u kojem se analizira postojanje više nakupina tumorskih stanica pojam multifokalno označava prisustvo višestrukih tumorskih žarišta unutar istog ili u kontralateralnom režnju štitnjače u odnosu na režanj u kojem se nalazi primarni tumor. Podatci o bolesnicima (dob, spol, anamnestički relevantni podaci) i patohistološki podaci su prikupljeni iz arhiviranih patohistoloških nalaza i povijesti bolesti. Analizirana je i pojavnost recidiva bolesti nakon minimalnog petogodišnjeg praćenja bolesnika (radi bolje preglednosti u daljnjem tekstu, tablicama i slikama koristi se pojam „Recidiv“).

Nakon isključivanja bolesnika koji nisu zadovoljili sve gore navedene kriterije, u konačnici su analizirani podatci 49 bolesnika bez (kontrolna skupina) i 97 bolesnika s (ispitivana skupina) prisutnim metastazama u regionalne limfne čvorove vrata u vrijeme postavljanja inicijalne dijagnoze. Ispitivana skupina bolesnika koji imaju metastaze dodatno je podijeljena na tri skupine ovisno o lokaciji metastaza: bolesnike s prisutnim metastazama samo u regiji VI (radi bolje preglednosti, ova skupina bolesnika u tablicama i slikama u nastavku teksta spominje se kao „Regija VI“), bolesnike s prisutnim metastazama u regiju VI i lateralne regije vrata (II-V) (radi bolje preglednosti, ova skupina bolesnika u tablicama i slikama u nastavku teksta spominje se pod imenom „lat“) i u bolesnike koji imaju skip metastaze u lateralnu regiju vrata (II-V), definirane odsutnošću metastaza u regiji VI (radi bolje preglednosti, ova skupina bolesnika u tablicama i slikama u nastavku teksta spominje se pod imenom „skip“). Također se u nastavku teksta u rezultatima i raspravi spominju bolesnici s lateralnim metastazama, jer se podrazumijeva, osim ako se ne radi o skip metastazama, da ti bolesnici imaju i metastaze u regiju VI.

Ispitivanje na tumorskim tkivima učinjeno je prema svim važećim primjenjivim smjernicama koje su osigurale pravilno provođenje postupka i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom istraživanju. Identitet je ispitanika uvijek ostao povjerljiv i zaštićen te zamijenjen rednim brojem prilikom obrade podataka.

4.2. Materijal i metode

4.2.1. Bojanje histokemijskom tehnikom na hemalaun-eozin

Operacijom dobiveni uzorci papilarnog karcinoma obrađeni su standardnom histološkom metodom koja uključuje 24-satnu fiksaciju u 10%-tnom puferiranom formalinu te dehidraciju u etanolu rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%). Tkivo je potom bilo provedeno kroz ksilol te prožeto u tekućem parafinu na temperaturi od +60, nakon čega je uklopljeno u parafinske blokove. Tako uklopljeno tkivo bilo je ohlađeno na +4 te je bilo rezano na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4-5 μm. Ovi rezovi nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije u opadajućem nizu koncentracije etanola (100%, 96%, 80% i 70%) bili su obojani histokemijskom tehnikom na hemalaun-eozin (HE). Na HE preparatima tkiva ponovno je procijenjena morfološka građa tumorskog tkiva i određen je postotak tumorskih stanica. Potom su se odabrali reprezentativni parafinski blokovi koji su rezani za daljnju imunohistokemijsku i PCR analizu.

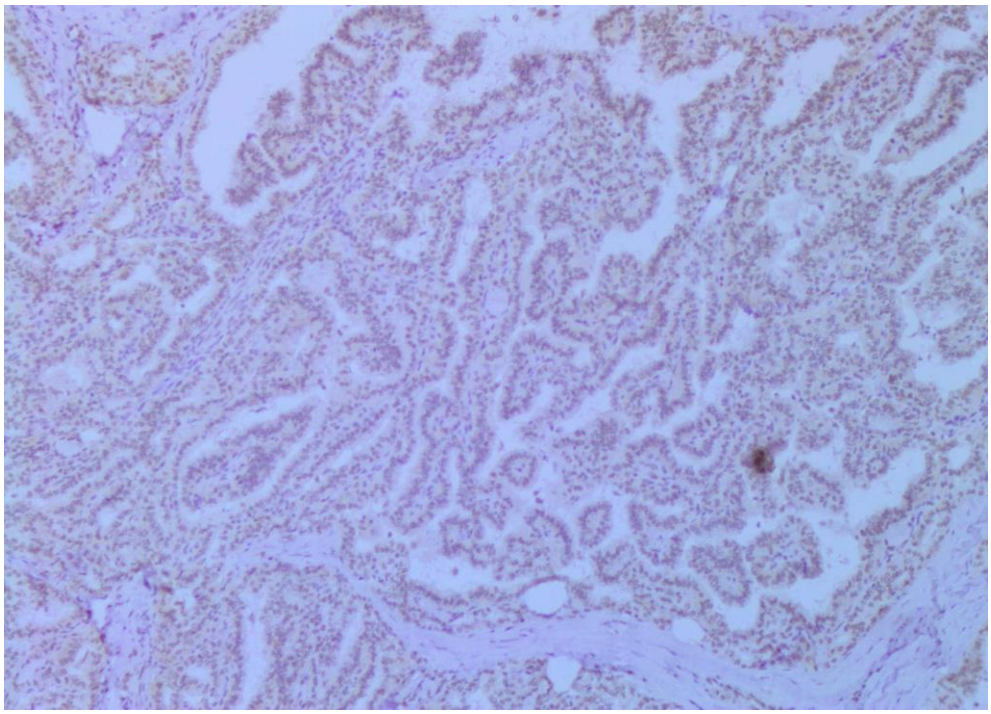
4.2.2. Imunohistokemijsko bojanje s primarnim poliklonalnim protutijelom na anti-CPSF2

Iz odabranih parafinskih blokova rezani su rezovi debljine 4-5 mikrometara za standardno imunohistokemijsko bojanje metodom imunoperoksidaza avidin-biotin, koristeći primarno poliklonalno protutijelo na anti-CFSP2 (razrijeđenje 1:100, Abcam). Imunohistokemijska analiza s navedenim protutijelom provela se Envision metodom kao vizualizacijskim sistemima na Dako automatiziranom stroju (Autostainer) za imunohistokemijsko bojenje pri Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

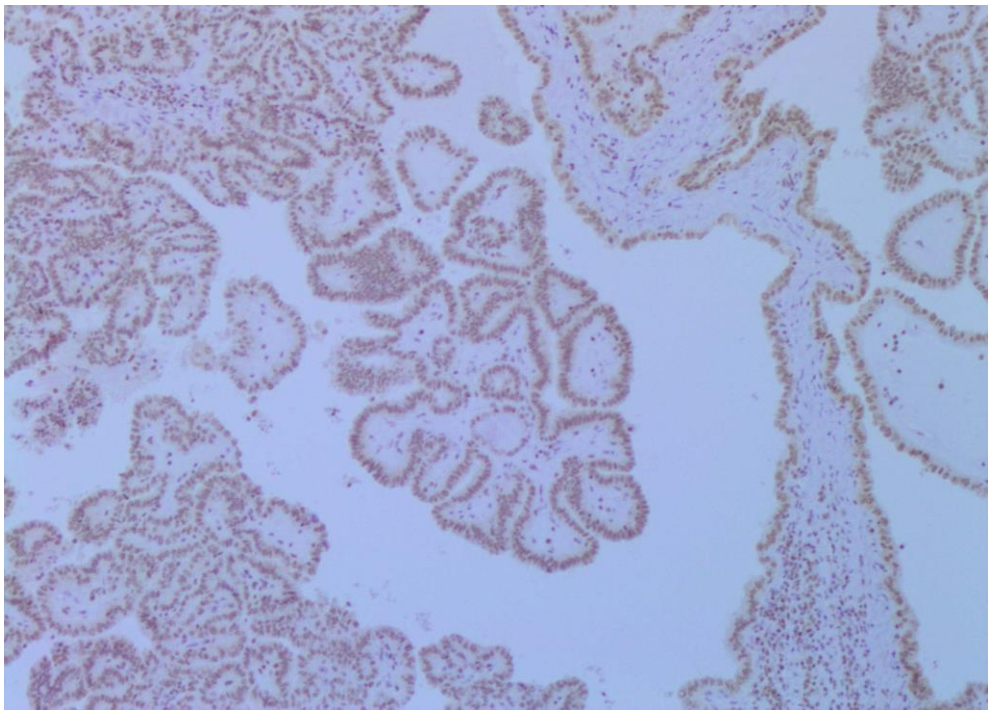
Procjena CFSP2 imunopozitiviteta utvrđena je svjetlosnim mikroskopom, tehnikom semikvantitativne analize. Analizu preparata vršio je iskusni patolog Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb.

Intezitet nuklearnog bojanja tumorskih stanica bodovan je na sljedeći način:

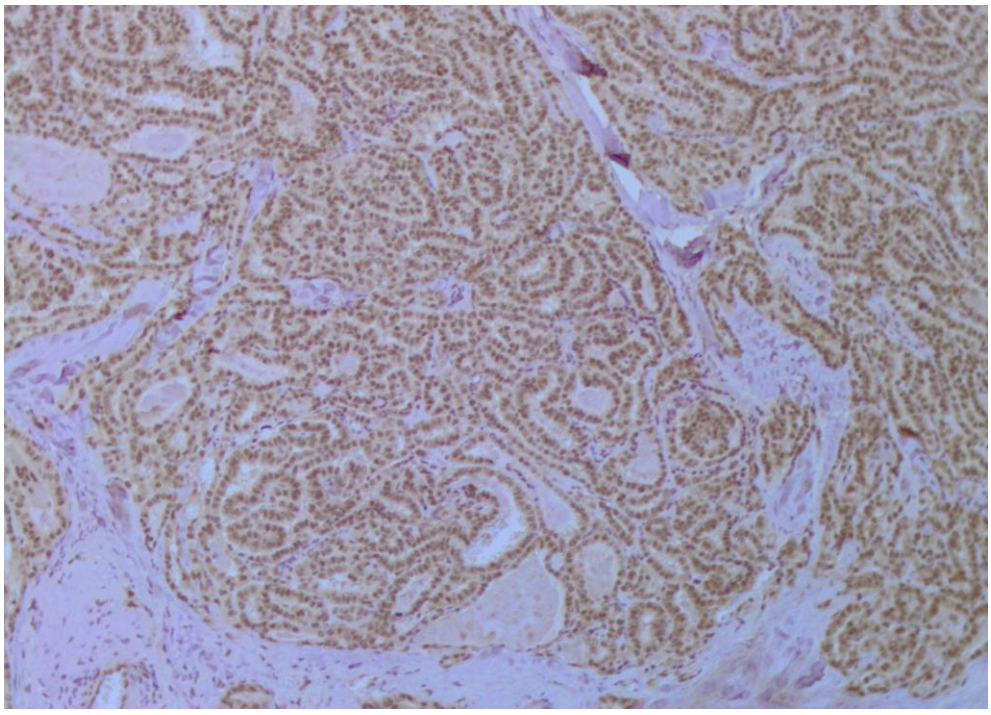
0, negativan; +1, slabi; +2, umjereni; +3, jaki.



Slika 2. Intenzitet ekspresije CPSF2 +1, slabi (CPSF2, ABC, x100)



Slika 3. Intenzitet ekspresije CPSF2 +2, umjereni (CPSF2, ABC, x200)



Slika 4. Intenzitet ekspresije CPSF2 +3, jaki (CPSF2, ABC, x100)

4.2.3. PCR

Nakon određivanja i označavanja tumorskog sadržaja i udjela tumorskih stanica na HE preparatu uzorka, napravljena je makrodisekcija i, ovisno o veličini uzorka, izrezano je 1-5 10 µm rezova iz kojih se izolirala DNA u Laboratoriju za molekularnu patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC-a Zagreb. Izolacija je napravljena izolacijskim kitom cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche Holding AG, Basel, Switzerland) nakon čega je koncentracija izmjerena koristeći spektrofotometar Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Nano DropTechnologies, Wilmington, Delaware, UnitedStates). S obzirom na gustoću dobivenih DNA izolata, napravljen je izračun za qPCR te plan pločice kako bi mogao biti pripremljen PCR za koji se koristio cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test i cobas z 480 Analyzer, odnosno cobas 4800 sustav za analizu.

4.2.4. Statističke metode

Podatci su prikazani tablično i grafički. Za sve kategorijske varijable su pored apsolutnih vrijednosti i pripadajućih udjela izračunati i pripadajući 95% intervali pouzdanosti. Kritična vrijednost z-skora za izračunavanje 95% intervala pouzdanosti bila je 1,96. Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su Fisherovim egzaktnim testom, odnosno Fisher-Freeman-Haltonovim testom u slučajevima kada su tablice bile formata većeg od 2x2. Za pojedinačne usporedbe tablica formata većeg od 2x2 dodatno se prikazala P vrijednost usporedbi značajnih parova koristeći Bonferronijevu korekciju kod razlika koje su prethodno bile statistički značajne. Razlike u kontinuiranim vrijednostima (dob i veličina tumora) analizirane su Mann-Whitney U testom s obzirom na neparametrijsku raspodjelu provjerenu Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Načinjena je analiza preživljenja do pojave recidiva s Kaplan-Meierovim krivuljama, pripadajućim log-rank testovima te izračunom omjera ugroženosti (HR, engl. *hazard ratio*) s 95% intervalom pouzdanosti. Načinjen je multivarijatni Coxov regresijski model proporcionalnih rizika u predikciji pripadnosti skupini s pozitivnim recidivima. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška MedCalc® Statistical Software version 20.022 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2021).

5. REZULTATI

Kliničko-patološke osobitosti papilarnih karcinoma štitnjače kod svih uključenih ispitanika (N=146) prikazane su u Tablici 7. Ženski spol bio je zastupljeniji (78,8%), dok je najzastupljeniji T status bio status 3 – 70 (47,9%) ispitanika. Proboj kapsule štitnjače imalo je 73 (50,0%) ispitanika, multifokalnost 90 (61,6%), limfovaskularno zahvaćanje 23 (15,8%) ispitanika. N status 1b bio je najzastupljeniji s prevalencijom od 41,1%. Okultne metastaze bile su prisutne u 13 (8,9%) ispitanika, a bez regionalnih metastaza bilo je 49 (33,6%) ispitanika. Prisutno ekstrakapsularno širenje bilo je kod 37 (38,1%) ispitanika, a udaljene metastaze u 5 (3,4%). Stadij tumora 2 imalo je 32 (21,9%) ispitanika, dok je najzastupljeniji histološki tip karcinoma bila klasična varijanta u 110 (75,3%) ispitanika.

Tablica 7. Kliničko-patološke osobitosti PKŠ svih bolesnika uključenih u istraživanje (N=146)

		N	%	95% CI	
Spol	Muški	31	21,2%	15,2%	28,4%
	Ženski	115	78,8%	71,6%	84,8%
T status	1a	29	19,9%	14,0%	26,9%
	1b	26	17,8%	12,3%	24,6%
	2	19	13,0%	8,3%	19,2%
	3	70	47,9%	39,9%	56,0%
	4a	2	1,4%	0,3%	4,3%
Proboj kapsule štitnjače	Neinvazivni tumori	73	50,0%	42,0%	58,0%
	Invazivni tumori	73	50,0%	42,0%	58,0%
Multifokalni	Ne	56	38,4%	30,8%	46,4%
	Da	90	61,6%	53,6%	69,2%
Limfovaskularno zahvaćanje	Ne	123	84,2%	77,7%	89,5%
	Da	23	15,8%	10,5%	22,3%
N status	0	49	33,6%	26,3%	41,5%
	1a	37	25,3%	18,8%	32,8%
	1b	60	41,1%	33,4%	49,2%
Okultne metastaze	Ne	133	91,1%	85,7%	94,9%
	Da	13	8,9%	5,1%	14,3%
Metastaze - regija	Bez regionalnih metastaza	49	33,6%	26,3%	41,5%
	Lateralne	45	30,8%	23,8%	38,6%
	Regija VI	39	26,7%	20,0%	34,3%
	Skip metastaze	13	8,9%	5,1%	14,3%
Prisutno ekstrakapsularno širenje	Ne	60	61,9%	52,0%	71,1%
	Da	37	38,1%	28,9%	48,0%
Udaljene metastaze	Ne	141	96,6%	92,7%	98,7%
	Da	5	3,4%	1,3%	7,3%
Stadij tumora	1	114	78,1%	70,9%	84,2%
	2	32	21,9%	15,8%	29,1%
Histološki podtip tumora	Klasična varijanta	110	75,3%	67,9%	81,8%
	Folikularni podtip	18	12,3%	7,7%	18,4%
	Tall-cell podtip	3	2,1%	0,6%	5,4%
	Solidni potip	4	2,7%	0,9%	6,4%
	Onkocitni podtip	2	1,4%	0,3%	4,3%
	Warthin like podtip	2	1,4%	0,3%	4,3%
	Clear cell podtip	1	0,7%	0,1%	3,2%
	Difuzno sklerozirajući	6	4,1%	1,7%	8,3%

Opisna statistika kontinuiranih varijabli (dob i veličina tumora) kod svih uključenih ispitanika (N=146) prikazana je u Tablici 8. Medijan dobi (interkvartilni raspon) iznosio je 46,0 (32,0-55,0) godina, dok je medijan veličine tumora bio 1,3 (1,0-2,2) cm.

Tablica 8. Prikaz kontinuiranih varijabli (dob i veličina tumora) u svih uključenih ispitanika (N=146)

	Min	**Max**	**Centile**		
			25.	**Medijan**	**75.**
Dob (godine)	6,00	76,00	32,00	46,00	55,00
Veličina (cm)	0,10	9,00	1,00	1,30	2,20

U tablici 9 prikazana je prisutnost mutacije V600E gena BRAF, izraženost CPSF2, RAI rezistentnosti, ATA rizika i pojave recidiva u svih uključenih ispitanika (N=146). Mutacija V600E gena BRAF bila je pozitivna u 71 (48,6%) ispitanika, dok je izraženost CPSF2 proteina 3+ bila prisutna u 56 (38,4%) ispitanika. RAI rezistentnih ispitanika bilo je samo 4 (2,7%), dok je najviše ispitanika – 104 (71,2%) imalo umjereni ATA rizik. Recidiv je imalo 19 (13,0%) ispitanika.

Tablica 9. Prisutnost mutacije V600E gena BRAF, izraženosti CPSF2, RAI rezistentnosti, ATA rizika i pojave recidiva u svih uključenih ispitanika (N=146)

		N	%	95% CI	
BRAF V600E	Negativan	75	51,4%	43,3%	59,4%
	Pozitivan	71	48,6%	40,6%	56,7%
CPSF2	0 i 1+	35	24,0%	17,6%	31,4%
	2+	55	37,7%	30,1%	45,7%
	3+	56	38,4%	30,8%	46,4%
CPSF2 skupine	<3+	90	61,6%	53,6%	69,2%
	3+	56	38,4%	30,8%	46,4%
Kombinacija	Ostale kombinacije	108	74,0%	66,4%	80,6%
	BRAF V600E pozitivan i CPSF2 <3+	38	26,0%	19,4%	33,6%
RAI rezistentni	Ne	142	97,3%	93,6%	99,1%
	Da	4	2,7%	0,9%	6,4%
ATA	Niski rizik	17	11,6%	7,2%	17,6%
	Umjereni rizik	104	71,2%	63,5%	78,1%
	Visoki rizik	25	17,1%	11,7%	23,8%
Recidiv	Ne	127	87,0%	80,8%	91,7%
	Da	19	13,0%	8,3%	19,2%

Usporedbom kliničko-patoloških osobitosti PKŠ između ispitanika koji su imali metastaze i onih bez metastaza nađene su značajne razlike u T statusu, proboju kapsule štitnjače, multifokalnosti te zastupljenosti klasičnog i folikularnog histološkog podtipa tumora (Tablica 10). Značajno češći 1a status u ispitanika bez metastaza (P=0,021), značajno je zastupljeniji proboj kapsule štitnjače u ispitanika s metastazama (P=0,009), značajno su zastupljeniji multifokalni tumori u ispitanika s metastazama (P<0,001), dok je klasični histološki podtip tumora značajno zastupljeniji u ispitanika s metastazama (P=0,016), a folikularni podtip u ispitanika bez metastaza (P=0,001). U ostalim promatranim varijablama nije bilo značajnih razlika.

Tablica 10. Razlike u kliničko-patološkim osobitostima PKŠ između ispitanika koji su imali metastaze i onih bez metastaza

		Metastaze				P	P[1]
		Ne N=49		Da N=97			
		N	%	N	%		
Spol	Muški	6	12,2%	25	25,8%	0,085	
	Ženski	43	87,8%	72	74,2%		
T status*	1a	15	30,6%	14	14,4%	**0,034**	**0,021**
	1b	12	24,5%	14	14,4%		
	2	4	8,2%	15	15,5%		
	3	18	36,7%	52	53,6%		
	4a	0	0,0%	2	2,1%		
Proboj kapsule štitnjače	Neinvazivni tumori	32	65,3%	41	42,3%	**0,009**	
	Invazivni tumori	17	34,7%	56	57,7%		
Multifokalni	Ne	28	57,1%	28	28,9%	**<0,001**	
	Da	21	42,9%	69	71,1%		
Limfovaskularno zahvaćanje	Ne	45	91,8%	78	80,4%	0,093	
	Da	4	8,2%	19	19,6%		
Stadij tumora	1	40	81,6%	74	76,3%	0,530	
	2	9	18,4%	23	23,7%		
Histološki podtip tumora*	Klasična varijanta	31	63,3%	79	81,4%	**<0,001**	**0,016**
	Folikularni podtip	12	24,5%	6	6,2%		**0,001**
	Tall-cell podtip	2	4,1%	1	1,0%		
	Solidni potip	0	0,0%	4	4,1%		
	Onkocitni podtip	2	4,1%	0	0,0%		
	Warthin like podtip	1	2,0%	1	1,0%		
	Clear cell podtip	1	2,0%	0	0,0%		
	Difuzno sklerozirajući	0	0,0%	6	6,2%		

* Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test; P1 – P vrijednosti usporedbi u paru unutar retka koristeći Bonferronijevu korekciju

Ispitanici s metastazama bili su značajno mlađi (P<0,001) te su imali veći tumor (P=0,002) (tablica 11).

Tablica 11. Razlike u dobi i veličini tumora između ispitanika koji su imali metastaze i onih bez metastaza: Mann-Whitney U test

Metastaze		**N**	**Min**	**Max**	**Centile**			**P**
					25.	**Medijan**	**75.**	
Dob (godine)	Ne	49	15,00	76,00	43,00	53,00	61,00	**<0,001**
	Da	97	6,00	74,00	27,50	40,00	51,50	
Veličina (cm)	Ne	49	0,30	9,00	0,75	1,00	1,50	**0,002**
	Da	97	0,10	7,60	1,00	1,50	2,50	

Razlike u prisutnosti mutacije V600E gena BRAF, izraženosti CPSF2, RAI rezistentnosti, ATA riziku i pojavi recidiva između ispitanika koji su imali metastaze i onih bez metastaza prikazane su u tablici 12. U skupini s metastazama značajno je bila zastupljenija izraženost CPSF2 proteina 2+ (P=0,007), ATA umjereni i visoki rizik (P<0,001) te recidiv (P=0,004).

Tablica 12. Razlike u prisutnosti mutacije V600E gena BRAF, izraženosti CPSF2, RAI rezistentnosti, ATA riziku i pojavi recidiva između ispitanika koji su imali metastaze i onih bez metastaza

		Metastaze				**P**	**P[1]**
		Ne N=49		**Da N=97**			
		N	**%**	**N**	**%**		
BRAF V600E	Negativan	26	53,1%	49	50,5%	0,861	
	Pozitivan	23	46,9%	48	49,5%		
CPSF2*	0 i 1+	14	28,6%	21	21,6%	**0,021**	
	2+	11	22,4%	44	45,4%		**0,007**
	3+	24	49,0%	32	33,0%		
CPSF2 skupine	<3+	25	51,0%	65	67,0%	0,061	
	3+	24	49,0%	32	33,0%		
Kombinacija*	Ostale kombinacije	37	75,5%	71	73,2%	0,843	
	BRAF V600E pozitivan i CPSF2 <3+	12	24,5%	26	26,8%		
RAI rezistentni	Ne	49	100,0%	93	95,9%	0,301	
	Da	0	0,0%	4	4,1%		
ATA*	Niski rizik	17	34,7%	0	0,0%	**<0,001**	
	Umjereni rizik	31	63,3%	73	75,3%		
	Visoki rizik	1	2,0%	24	24,7%		**0,001**
Recidiv	Ne	48	98,0%	79	81,4%	**0,004**	
	Da	1	2,0%	18	18,6%		

* Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test; P1 – P vrijednosti usporedbi u paru unutar retka koristeći Bonferronijevu korekciju

Rezultati koji se odnose na specifične ciljeve ovog istraživanja, a uključuju utvrđivanje odnosa prisutnosti mutacije V600E gena BRAF s kliničko-patološkim osobitostima PKŠ te međusoban odnos prisutnosti mutacije V600E gena BRAF i razine izraženosti CPSF2 proteina s kliničko-patološkim osobitostima PKŠ prikazani su tablicama 13-15.

Ispitanici s pozitivnom mutacijom V600E gena BRAF imali su značajno češće okultne metastaze (P=0,008), klasičnu histopatološku varijantu karcinoma (P < 0,001), značajno manju veličinu tumora (P=0,021) te veću učestalost izraženosti CPSF2 3+ (P=0,049).

Tablica 13. Prisutnost mutacije V600E gena BRAF s obzirom na kliničko-patološke osobitosti PKŠ

		BRAF V600E				P	P[1]
		Negativan N=75		Pozitivan N=71			
		N	%	N	%		
Spol	Muški	12	16,0%	19	26,8%	0,112	
	Ženski	63	84,0%	52	73,2%		
T status*	1a	12	16,0%	17	23,9%	0,468	
	1b	17	22,7%	9	12,7%		
	2	9	12,0%	10	14,1%		
	3	36	48,0%	34	47,9%		
	4a	1	1,3%	1	1,4%		
Proboj kapsule štitnjače	Neinvazivni tumori	40	53,3%	33	46,5%	0,408	
	Invazivni tumori	35	46,7%	38	53,5%		
Multifokalni	Ne	24	32,0%	32	45,1%	0,105	
	Da	51	68,0%	39	54,9%		
Limfovaskularno zahvaćanje	Ne	61	81,3%	62	87,3%	0,369	
	Da	14	18,7%	9	12,7%		
N status*	0	26	34,7%	23	32,4%	0,143	
	1a	14	18,7%	23	32,4%		
	1b	35	46,7%	25	35,2%		
Okultne metastaze	Ne	73	97,3%	60	84,5%	**0,008**	
	Da	2	2,7%	11	15,5%		
Metastaze – regija*	Bez regionalnih metastaza	26	34,7%	23	32,4%	0,104	
	Lateralne	26	34,7%	19	26,8%		
	Regija VI	14	18,7%	25	35,2%		
	Skip metastaze	9	12,0%	4	5,6%		
Prisutno ekstrakapsularno širenje	Ne	28	57,1%	32	66,7%	0,334	
	Da	21	42,9%	16	33,3%		
Udaljene metastaze	Ne	71	94,7%	70	98,6%	0,367	
	Da	4	5,3%	1	1,4%		
Stadij tumora	1	58	77,3%	56	78,9%	0,844	
	2	17	22,7%	15	21,1%		
Histološki podtip tumora*	Klasična varijanta	46	61,3%	64	90,1%	**<0,001**	**<0,001**
	Folikularni podtip	14	18,7%	4	5,6%		**0,017**
	Tall-cell podtip	1	1,3%	2	2,8%		
	Solidni potip	4	5,3%	0	0,0%		
	Onkocitni podtip	2	2,7%	0	0,0%		
	Warthin like podtip	1	1,3%	1	1,4%		
	Clear cell podtip	1	1,3%	0	0,0%		
	Difuzno sklerozirajući	6	8,0%	0	0,0%		

* Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test; P1 – P vrijednosti usporedbi u paru unutar retka koristeći Bonferronijevu korekciju

Tablica 14. Razlike u dobi i veličini tumora s obzirom na prisutnost mutacije V600E gena BRAF: Mann-Whitney U test

BRAF V600E		N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
Dob (godine)	Negativan	75	6,00	76,00	25,000	42,00	55,00	0,078
	Pozitivan	71	16,00	72,00	36,000	47,00	55,00	
Veličina (cm)	Negativan	75	0,10	9,00	1,000	1,50	2,50	**0,021**
	Pozitivan	71	0,20	5,50	0,800	1,10	2,00	

Tablica 15. Razlike u izraženosti CPSF2, RAI rezistentnosti, ATA rizika i pojavi recidiva s obzirom na prisutnost mutacije V600E gena BRAF: Fisherov egzaktni test

		BRAF V600E				P	P[1]
		Negativan N=75		Pozitivan N=71			
		N	%	N	%		
CPSF2*	0	1	1,3%	0	0,0%	0,138	
	1+	21	28,0%	13	18,3%		
	2+	30	40,0%	25	35,2%		
	3+	23	30,7%	33	46,5%		
CPSF2 skupine	<3+	52	69,3%	38	53,5%	**0,049**	
	3+	23	30,7%	33	46,5%		
RAI rezistentni	Ne	73	97,3%	69	97,2%	1,000	
	Da	2	2,7%	2	2,8%		
Recidiv	Ne	68	90,7%	59	83,1%	0,221	
	Da	7	9,3%	12	16,9%		

* Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test; P1 – P vrijednosti usporedbi u paru unutar retka koristeći Bonferronijevu korekciju

Ciljevi koji opisuju odnos razine izraženosti CPSF2 proteina s kliničko-patološkim osobitostima PKŠ te međusoban odnos prisutnosti mutacije V600E gena BRAF i razine ekspresije CPSF2 proteina s kliničko-patološkim osobitostima PKŠ prikazani su u tablicama 16-18.

CPSF2 skupine intenziteta 2 i manje imaju značajno češću limfokapilarnu invaziju (P=0,009) (tablica 16) kao i značajno češće recidive (P=0,010) (tablica 18). Relativni rizik za nastanak recidiva u skupini koja je CPSF2 intenziteta 2 i manje u odnosu na intenzitet 3+ je 5,29 (95% CI: 1,26-22,03) (tablica 18). To je kada gledamo samo broj recidiva bez vremenskog utjecaja, što je kasnije prikazano u Kaplan-Meier te Coxovoj regresijskoj analizi (slika 5 i tablica 22).

Tablica 16. Razlike u kliničko-patološkim osobitostima PKŠ s obzirom na izraženost CPSF2 proteina: Fisherov egzaktni test

		CPSF2 skupine 1				P
		<3+ N=90		3+ N=56		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	17	18,9%	14	25,0%	0,380
	Ženski	73	81,1%	42	75,0%	
T status*	1a	13	14,4%	16	28,6%	0,071
	1b	17	18,9%	9	16,1%	
	2	9	10,0%	10	17,9%	
	3	49	54,4%	21	37,5%	
	4a	2	2,2%	0	0,0%	
Proboj kapsule štitnjače	Neinvazivni tumori	40	44,4%	33	58,9%	0,089
	Invazivni tumori	50	55,6%	23	41,1%	
Multifokalni	Ne	32	35,6%	24	42,9%	0,378
	Da	58	64,4%	32	57,1%	
Limfovaskularno zahvaćanje	Ne	70	77,8%	53	94,6%	**0,009**
	Da	20	22,2%	3	5,4%	
N status*	0	25	27,8%	24	42,9%	0,185
	1a	25	27,8%	12	21,4%	
	1b	40	44,4%	20	35,7%	
Okultne metastaze	Ne	82	91,1%	51	91,1%	1,000
	Da	8	8,9%	5	8,9%	
Metastaze – regija*	Bez regionalnih metastaza	25	27,8%	24	42,9%	0,081
	Lateralne	33	36,7%	12	21,4%	
	Regija VI	26	28,9%	13	23,2%	
	Skip metastaze	6	6,7%	7	12,5%	
Prisutno ekstrakapsularno širenje	Ne	42	64,6%	18	56,3%	0,506
	Da	23	35,4%	14	43,8%	
Udaljene metastaze	Ne	86	95,6%	55	98,2%	0,649
	Da	4	4,4%	1	1,8%	
Stadij tumora	1	70	77,8%	44	78,6%	0,910
	2	20	22,2%	12	21,4%	
Histološki podtip tumora*	Klasična varijanta	64	71,1%	46	82,1%	0,237
	Folikularni podtip	13	14,4%	5	8,9%	
	Tall-cell podtip	2	2,2%	1	1,8%	
	Solidni potip	4	4,4%	0	0,0%	
	Onkocitni podtip	1	1,1%	1	1,8%	
	Warthin like podtip	0	0,0%	2	3,6%	
	Clear cell podtip	1	1,1%	0	0,0%	
	Difuzno sklerozirajući	5	5,6%	1	1,8%	

* Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Tablica 17. Razlike u dobi i veličini tumora s obzirom na pripadnost CPSF2 skupini: Mann-Whitney U test

CPSF2 skupine		N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
Dob (godine)	<3+	90	6,00	74,00	28,00	45,00	54,00	0,114
	3+	56	15,00	76,00	36,00	46,50	57,50	
Veličina (cm)	<3+	90	0,10	9,00	1,00	1,40	2,00	0,174
	3+	56	0,20	5,00	1,00	1,15	2,20	

Tablica 18. Razlike u RAI rezistentnosti, ATA riziku i pojavi recidiva s obzirom na na izraženost CPSF2 proteina: Fisherov egzaktni test

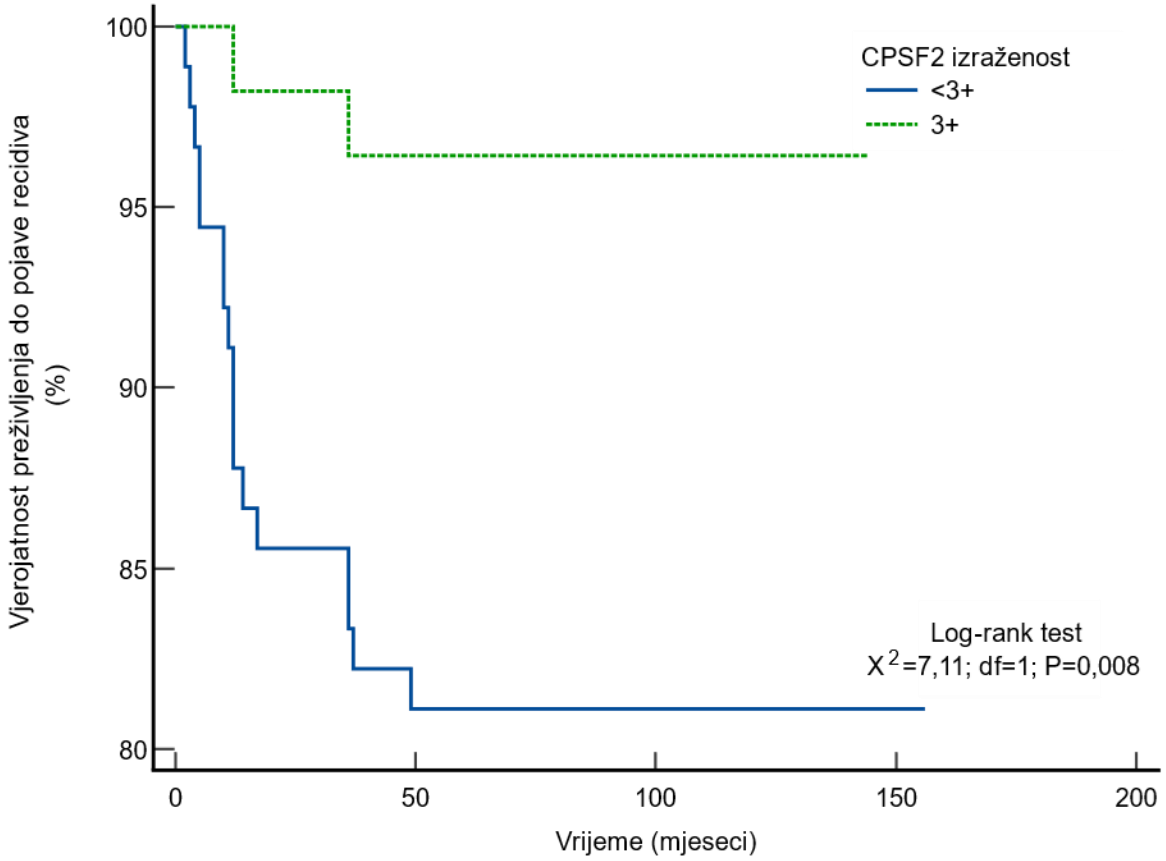
		CPSF2 skupine				P
		<3+ N=90		3+ N=56		
		N	%	N	%	
RAI rezistentni	Ne	87	96,7%	55	98,2%	1,000
	Da	3	3,3%	1	1,8%	
ATA*	Niski rizik	9	10,0%	8	14,3%	0,609
	Umjereni rizik	64	71,1%	40	71,4%	
	Visoki rizik	17	18,9%	8	14,3%	
Recidiv	Ne	73	81,1%	54	96,4%	**0,010**
	Da	17	18,9%	2	3,6%	

* Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Kada gledamo preživljenje do recidiva, skupina CPSF 3+ ima značajno dulje preživljenje (139,7 mjeseci naprema 129,6 mjeseci; P=0,008) u odnosu na skupinu CPSF <3+. Indikativno je da nakon 49 mjeseci praćenja više nema novih promjena, odnosno novih recidiva i krivulje su ravne. HR za skupinu intenziteta 2 i manje je 3,49 (95% CI: 1,39-8,78) (tablica 19 i slika 5).

Tablica 19. Analiza vremena preživljenja do pojave recidiva s obzirom na izraženost CPSF2 proteina

Izraženost CPSF2 proteina	Prosječno vrijeme preživljenja do pojave recidiva (mjeseci)	Standardna greška (SE)	95% CI
<3+	129,589	5,803	118,214 - 140,964
3+	139,714	2,991	133,851 - 145,577
Ukupno	137,911	3,892	130,282 - 145,540

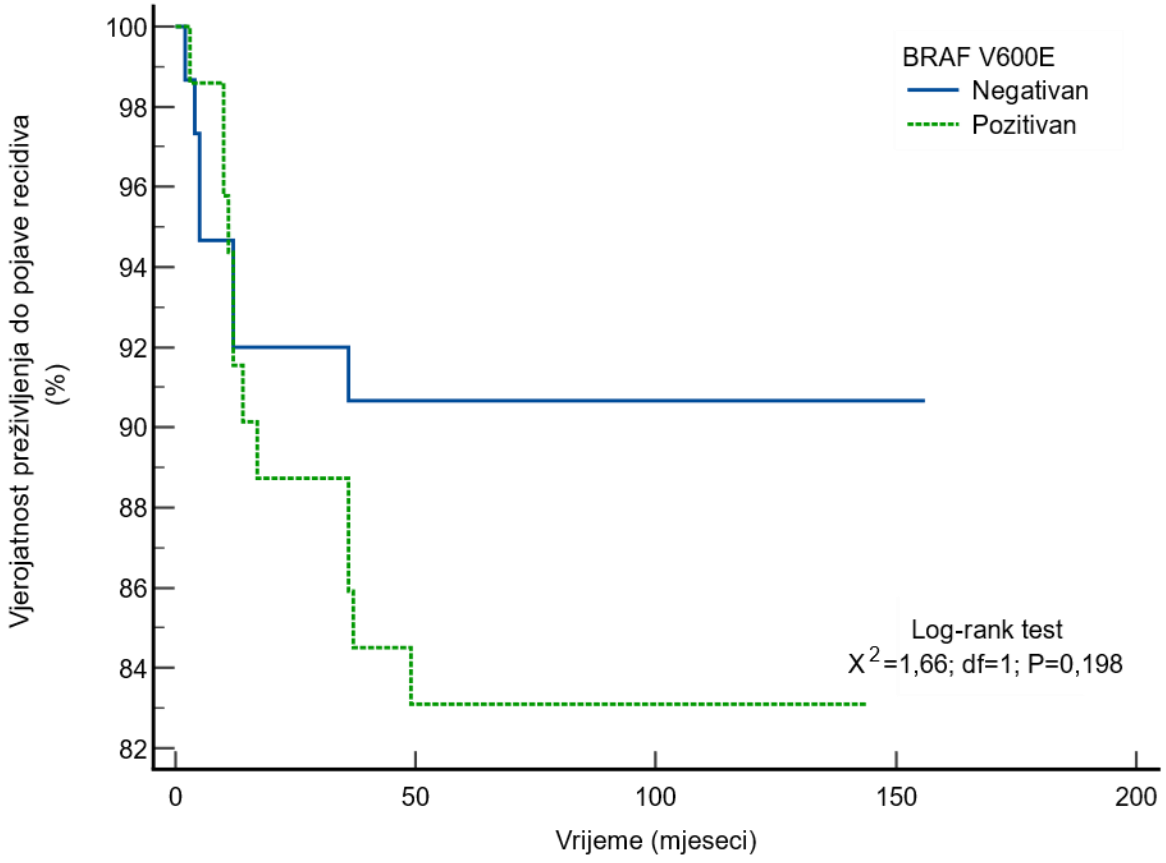


Slika 5. Krivulje preživljenja do pojave recidiva s obzirom na izraženost CPSF2 proteina: log-rank test usporedbe krivulja, HR (za izraženost CPSF2 proteina <3+): 3,49 (95% CI: 1,39-8,78).

Analiza vremena preživljenja do pojave recidiva s obzirom na prisutnost mutacije V600E gena BRAF prikazana je u tablici 20 i na slici 7. Nije bilo značajnih razlika u krivuljama preživljenja (P=0,198), odnosno BRAF mutacija nije bila značajan prediktor preživljenja do pojave recidiva.

Tablica 20. Analiza vremena preživljenja do pojave recidiva s obzirom na prisutnost mutacije V600E gena BRAF

BRAF V600E	Prosječno vrijeme preživljenja do pojave recidiva (mjeseci)	Standardna greška (SE)	95% CI
Negativan	142,453	4,89	132,868 - 152,039
Pozitivan	123,141	5,532	112,298 - 133,984
Ukupno	137,911	3,892	130,282 - 145,540

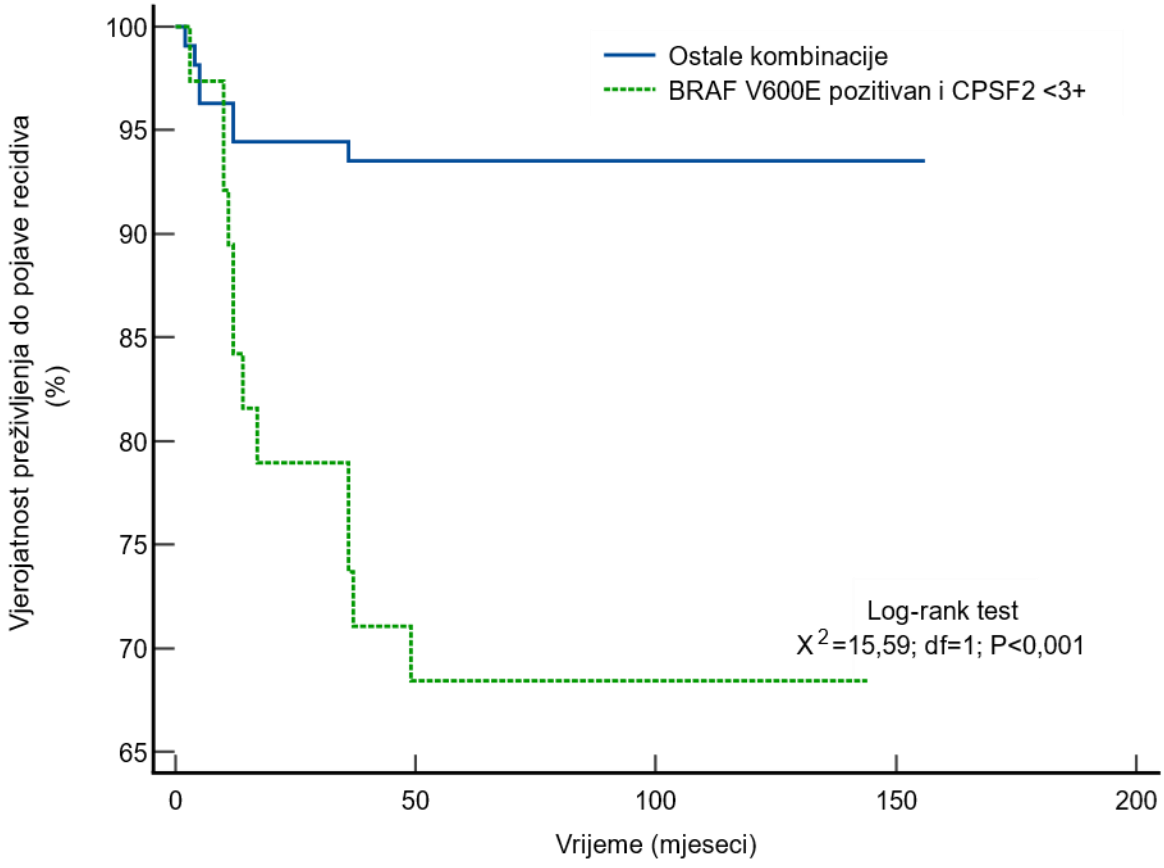


Slika 6. Krivulje preživljenja do pojave recidiva s obzirom na prisutnost mutacije V600E gena BRAF: log-rank test usporedbe krivulja, HR (za pozitivnu mutaciju): 1,81 (95% CI: 0,73-4,47).

Ako analiziramo preživljenje do recidiva skupine s obzirom na kombinaciju pozitivnog nalaza mutacije V600E gena BRAF i izraženosti CPSF2 proteina <3+, ta skupina ima značajno kraće preživljenje (105,0 mjeseci naprema 146,6 mjeseci; P<0,001). HR za pozitivnu kombinaciju nalaza je 8,32 (95% CI: 2,91-23,83) (tablica 21 i slika 7).

Tablica 21. Analiza vremena preživljenja do pojave recidiva s obzirom na kombinaciju pozitivnog nalaza mutacije V600E gena BRAF i izraženosti CPSF2 proteina <3+

Faktor	Prosječno vrijeme preživljenja do pojave recidiva (mjeseci)	Standardna greška (SE)	95% CI
Ostale kombinacije	146,59	3,45	139,833 - 153,352
BRAF V600E pozitivan i CPSF2 <3+	105,03	9,39	86,613 - 123,439
Ukupno	137,91	3,89	130,282 - 145,540



Slika 7. Krivulje preživljenja do pojave recidiva s obzirom na kombinaciju pozitivnog nalaza mutacije V600E gena BRAF i izraženosti CPSF2 proteina <3+: log-rank test usporedbe krivulja, HR (za pozitivnu kombinaciju nalaza): 8,32 (95% CI: 2,91-23,83).

Multivarijantna analiza predikcije pripadnosti skupini koja je imala recidiv prikazana je u tablici 22. Coxov regresijski model proporcionalnih rizika statistički je značajan (X2=17,5, df=10, P=0,025), a od prediktorskih varijabli u predikciji nastanka recidiva izdvaja se CPSF2 izraženost <3+ s HR od 4,97 i 95% CI: 1,08-22,77, P=0,039 kao najjači prediktor, BRAF V600E pozitivnost s HR od 3,82 i 95% CI: 1,04-13,97, P=0,043 kao drugi po jačini. Starija dob izdvaja se kao protektivni čimbenik jer smanjuje vjerojatnost recidiva s HR od 0,95 i 95%CI: 0,91-0,99, P=0,020, a kontrolirano na utjecaj svih ostalih varijabli u modelu.

Tablica 22. Multivarijatna analiza predikcije pripadnosti skupini koja je imala recidiv: Coxov regresijski model proporcionalnih rizika

	HR	**95,0% CI**		**P**
		Donji	**Gornji**	
BRAF V600E pozitivnost	**3,82**	**1,04**	**13,97**	**0,043**
CPSF2 skupine <3+	**4,97**	**1,08**	**22,77**	**0,039**
Limfovaskularno zahvaćanje	1,80	0,59	5,49	0,298
Multifokalni tumori	1,13	0,34	3,80	0,840
Prisutno ekstrakapsularno širenje	1,98	0,60	6,46	0,260
Tumorska invazija u lokoregionalna tkiva	4,40	0,94	20,48	0,059
Metastaze - lateralna regija (ref. vrijednost)				0,434
Metastaze - regija VI	1,87	0,37	9,59	0,451
Metastaze - skip	3,35	0,50	22,22	0,211
Dob (godine)	**0,95**	**0,91**	**0,99**	**0,020**
Okultne metastaze	2,83	0,59	13,56	0,192

6. RASPRAVA

Kako bismo pokušali unaprijediti postojeće klasifikacijske sustave i procjenu rizika za PKŠ, proveli smo retrospektivno istraživanje u kojem smo analizirali prisutnost mutacije V600E gena BRAF i ekspresiju proteina CPSF2 kao prognostičkih biljega na arhivskom bioptičkom materijalu 49 pacijenata bez (kontrolna skupina) i 97 pacijenata s (ispitivana skupina) prisutnim metastazama PKŠ u regionalne limfne čvorove vrata u vrijeme postavljanja inicijalne dijagnoze. Ciljevi su nam bili istražiti odnos prisutnosti mutacije V600E gena BRAF i razine ekspresije CPSF2 proteina s kliničko-patološkim osobitostima PKŠ, kako bismo unaprijedili postojeće klasifikacijske sustave i procjene rizika. Time bismo smanjili broj bolesnika s ozbiljnim posljedicama kirurškog liječenja, a i trajno narušene kvalitete života zbog posljedica radiojodne ablacije i doživotne hormonske supstitucijske terapije.

U našem istraživanju prosječna dob bolesnika i omjer žena u odnosu na muškarce bio je usporediv s dosad objavljenim istraživanjima (44). Najčešći histološki tip PKŠ u ovom istraživanju bila je klasična varijanta karcinoma (T1) – 110 (75,3%), dok je najrjeđi histološki tip karcinoma svijetlostanični podtip (T7) – 1 (0,68%). S obzirom na histološki tip tumora pacijenti s difuzno sklerozirajućim podtipom tumora (T8) bili su statistički značajno mlađe dobi (medijan 17 godina) od dobi pacijenata s drugim histološkim tipovima tumora. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturom (160).

Zagovornici agresivnijeg kirurškog liječenja (totalne tireoidektomije, elektivne disekcije limfnih čvorova vrata) uglavnom navode visoki postotak multifokalnih tumora (18%- 80%), visok postotak limfogenih metastaza u limfne čvorove vrata (30% do 80%) te okultnih metastaza (3, 31, 41-45, 78-80, 151, 156-159). I u našem istraživanju prisutan je značajan udio od 61,6% multifokalnih tumora. U 13 (8,9%) ispitanika su pronađene okultne metastaze i to isključivo u „centralnim" regijama vrata. Naši rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima, no kako agresivniji kirurški pristup temeljen na ovim već dugo poznatim karakteristikama papilarnih karcinoma štitnjače nije doveo do željenih rezultata u preživljenju, naš je stav da prilikom donošenje odluke o optimalnom modalitetu kirurškog liječenja treba uzeti u obzir sve kliničko-patološke čimbenike rizika u kombinaciji s ev. biomarkerima koji bi postojeće klasifikacijske sustave dodatno unaprijedili.

U ovom istraživanju veličina tumora pokazala se kao rizični čimbenik za razvoj metastaza, što je u skladu s literaturom (48, 164). U pacijenata s regionalnim metastazama u

limfne čvorove vrata, veličina tumora (medijan 1,5 cm) je statistički značajno bila veća od pacijenata bez metastaza (medijan 1 cm) odnosno značajno je češći T1a status u ispitanika bez metastaza.

Udio pacijenata s limfovaskularnim zahvaćanjem statistički je značajno veći kod pacijenata s metastazama u lateralne regije vrata nego u pacijenata bez metastaza ili s metastazama u centralnu regiju vrata, što je isto u skladu s očekivanjima i spomenutom literaturom (48,164).

Neki autori navode muški spol kao rizični čimbenik za razvoj metastaza (86), što kod mnogih drugih kao i u našoj studiji nije slučaj, premda je veća zastupljenost muškog spola u skupini s prisutnim regonalnim metastazama, razlika nije statistički značajna.

Proboj kapsule štitnjače i multifokalnost su značajno zastupljeniji u ispitanika s metastazama i mogu se smatrati prediktorima regionalne metastaske bolesti, što je u skladu s literaturom (165).

Klasični histološki podtip PKŠ je u našem istraživanju značajno zastupljeniji u ispitanika s metastazama (P=0,016), dok je folikularni podtip bio značajno zastupljeniji u ispitanika bez metastaza. S obzirom na to da nismo radili daljnju podjelu folikularnog podtipa na inkapsuliranu varijantu i infiltrativnu varijantu, ovi bi se rezultati mogli objasniti većim udjelom inkapsulirane varijante u našem uzorku. Prema literaturi, inkapsulirana varijanta folikularnog podtipa PKŠ rijetko daje metastaze u regionalne limfne čvorove vrata (u 5% slučajeva), dok je infiltrativna varijanta folikularnog podtipa PKŠ često povezana s metastazama u regionalne limfne čvorove vrata (u 65% slučajeva) (169).

Ispitanici s regionalnim metastazama u limfne čvorove vrata bili su značajno mlađi (medijan 40 godina) za razliku od ispitanika bez metastaza (medijan 53 godine). U literaturi se navode oprečna mišljenja, dok Scheummann potvrđuje naš nalaz, Hay i suradnici navode dob iznad 45 godina kao rizični čimbenik za razvoj regionalnih metastaza u limfne čvorove vrata (170,171). Neki autori navode češću pojavu regionalnih metastaza kod bolesnika mlađe i starije dobi, a takvu raspodjelu bolesnika najbolje prikazuje „U“ oblik dijagrama s najrjeđom pojavom u onih srednje životne dobi (172).

Mutacija gena BRAF najčešća je genetička mutacija u PKŠ (135,136). Mnogi ju autori povezuju s agresivnim ponašanjem PKŠ i s većom rezistencijom na radiojodnu ablaciju i time

većim postotkom recidiva (117-134, 147). U svijetu se prevalencija mutacije gena BRAF kreće između 30% i 80%, ovisno o zemljopisnom položaju regije i konzumaciji joda (139-145). U Hrvatskoj do sada nije provedeno istraživanje koje bi utvrdilo prevalenciju ove mutacije u PKŠ. Osim u unapređenju postojećih klasifikacijskih sustava, mutacija gena BRAF značajna je i zbog mogućnosti ciljanog liječenja inhibitorima tirozin-kinaze.

BRAF mutacija u našem istraživanju ustanovljena je kod 71 (48,6%) ispitanika. Ispitanici s pozitivnom mutacijom V600E gena BRAF imali su značajno češće klasičnu histopatološku varijantu karcinoma, značajno manju veličinu tumora, okultne metastaze te veću učestalost izraženosti CPSF2 3+.

Prema dosadašnjim studijama BRAF mutacija se češće nalazi u klasičnom histološkom tipu i visokostaničnoj varijanti PKŠ (134). U našem istraživanju udio ispitanika s pozitivnom mutacijom V600E gena BRAF statistički se značajno razlikuje s obzirom na histološki tip tumora ($P<0,001$). Među pacijentima sa solidnim, onkocitnim, svijetlostaničnim i difuznosklerozirajućim histološkim tipovima tumora nije bilo pacijenata s mutacijom BRAF gena. I u našem je istraživanju BRAF mutacija povezana s klasičnom varijantom, folikularnim, visokostaničnim, ali i s Whartinu sličnim podtipom papilarnog karcinoma štitnjače.

Rezultati dosadašnjih studija povezanosti V600E mutacije gena BRAF i veličine tumora su kontradiktorni, ali to se može pripisati i različitoj interpretaciji rezultata. Tako, na primjer, velika meta-analiza Li C i suradnika koja obuhvaća 32 studije koje se bave odnosom kliničko-patoloških značajki papilarnih karcinoma štitnjače i mutacije nalazi da je značajna poveznica prisutne V600E mutacije gena BRAF i tumora većih od 1.0 cm u promjeru (162). Ako se promjer od 1 cm izostavi kao referentna granica, medijan veličine tumora s V600E mutacijom isti je kao i u našem istraživanju – 1.1 cm. Statistički značajna manja veličina tumora u ispitanika s prisutnom V600E mutacijom gena BRAF zabilježena je i u najvećoj kohortnoj studiji jednog centra u Kini koje ima izuzetno veliki udio ispitanika s prisutnom V600E mutacijom – 83.7 % (161).

U našem istraživanju nismo pronašli korelaciju između prisutnosti metastaza i BRAF statusa, a ni dob pacijenata s BRAF mutacijom nije se statistički značajno razlikovala od dobi pacijenata bez BRAF mutacije.

Također, suprotno dosadašnjim istraživanjima, među BRAF pozitivnim karcinomima statistički su češće zastupljene metastaze u regiju VI nego skip metastaze ili metastaze u lateralne

regije vrata. Ispitanici s pozitivnom mutacijom V600E gena BRAF imali su značajno češće okultne metastaze. Ji-Yong Joo i suradnici su prospektivnom studijom također utvrdili da je mutacija V600E gena BRAF statistički značajno povezana s okultnim metastazama u centralne regije vrata (35 nasuprot 15% u slučaju divljeg tipa. S obzirom na to da je prisustvo V600E gena BRAF utvrđeno preoperativno putem aspiracije biopsije iglom, autori su zaključili da preoperativna analiza BRAF statusa aspiracijskom biopsijom iglom te određivanjem veličine tumora ultrazvučno može pomoći predvidjeti okultne metastaze u centralnim regijama vrata kod pacijenata s papilarnim karcinomom štitnjače s klinički negativnim vratom (163).

Sung i suradnici također nalaze statistički značajnu povezanost papilarnog karcinoma štitnjače s prisutnom mutacijom V600E gena BRAF i jače ekspresije CPSF2 proteina (150).

U velikoj meta-analizi koja je uključila 2167 bolesnika, BRAF mutacija imala je osjetljivost od 65 % u identifikaciji onih tumora koji su recidivirali, ali je imala pozitivnu prediktivnu vrijednost od samo 25% u predviđanju rizik recidiva bolesti. Temeljem ovih podataka čini se da sam BRAF status nije dovoljan da značajno doprinosi poboljšanju klasifikacije rizika u većine pacijenata, što je u skladu s našim rezultatima kada smo analizirali pojavu recidiva s obzirom na samu prisutnost mutacije V600E gena BRAF (155).

Mnogi autori smatraju da su klasični prognostički faktori kao ekstratiroidno širenje i vaskularna invazija značajniji od prisustva BRAF mutacije i ne preporučuju promjene plana liječenja samo temeljem toga (29), a naši rezultati su također na ovom tragu.

U našem istraživanju razina ekspresije CPSF2 gena je kod 1 (0,68%) ispitanika bila 0, kod 34 (23,29%) ispitanika bila 1+, kod 55 (37,67%) ispitanika bila 2+ te kod 56 (38,36%) ispitanika bila 3+, što je usporedivo s rezultatima iz literature (150).

Sung i suradnici navode da je u skupini sa sniženom ekspresijom CPSF2 proteina (0 i 1+) više muških bolesnika (32.4%) u usporedbi s grupom koja ima ekspresiju 2 i 3+ (14.4%, p=0.024) (150). U našoj studiji nismo naišli na statistički značajnu razliku ekspresije ovisno o spolu.

Nilubol i suradnici su in vitro studijom usporedili ekspresiju CPSF2 u normalnim, benignim tumorima štitnjače i papilarnom karcinomu štitnjače kako bi utvrdili je li ekspresija promijenjena samo u papilarnom karcinomu štitnjače ili i kod benignih proliferativnih lezija štitnjače. Ekspresija CPSF2 bila je značajno veća u uzorcima papilarnog karcinoma štitnjače

nego u normalnom tkivu štitnjače ili u tkivu benigne multinodularne strume. Isto tako su uvidjeli trend prema ekstratiroidnom proširenju u bolesnika s nižom ekspresijom CPSF2 proteina te su stoga uspoređivali razliku u invazivnom području u odnosu na središnji dio papilarnog karcinoma štitnjače. Pronašli su niže razine ekspresije CPSF2 u invazivnom području, ali ta razlika nije bila statistički značajna (149). To može objasniti naš rezultat da CPSF2 skupine intenziteta 2 i manje imaju značajno češću limfovaskularnu invaziju. Premda Sung i suradnici nisu dobili iste rezultate (150). Nisu pronašli statistički značajnu razliku korelacije dobi, veličine tumora, ekstratiroidnom zahvaćanju ili limfovaskularnoj invaziji ovisno o ekspresiji CPSF2 proteina.

Prema dosadašnjim istraživanjima, PKŠ sa smanjenom ekspresijom proteina CPSF2 povezani su sa većom učestalosti metastaza u limfne čvorove vrata, udaljenih metastaza i recidiva, a time i s lošijim ishodom i prognozom (149,150). Suprotno dosadašnjim istraživanjima u našem istraživanju značajno je bila zastupljenija izraženost CPSF2 proteina 2+ u skupini ispitanika s prisutnim regionalnim metastazama u limfne čvorove vrata, dok korelaciju između raspodjele metastatskih regija ovisno o CPSF2 statusu nismo pronašli. U kontrolnoj skupini bolesnika bez metastaza značajno je češća zastupljenost bolesnika s pozitivnom izraženošću CPSF2 proteina (2 i 3+) (71.4%) naspram negativne izraženosti CPSF2 proteina (0 i 1+)(28,6%). Zastupljenija je izraženost CPSF2 proteina 3+ u skupini koja ima prisutne regionalne metastaze (49,0%) naspram skupine koja nema metastaze (33,0%) u limfne čvorove vrata. Premda razlika nije statistički značajna, kada bismo eventualno povećali broj ispitanika u studiji, izraženost CPSF2 proteina 3+ mogla bi imati „protektivni„ učinak. Sung i suradnici su univarijatno dokazali da su značajniji prediktori metastaza u limfne čvorove vrata tumorska veličina ≥4cm (2.72(1.07,6.92) p=0,036 i negativna CPSF2 ekspresija (0 i 1+) s tim da je i veličina tumora ≥4cm značajniji prediktor. U multivarijatnoj analizi kao jedini od ta dva značajna prediktora regionalnih metastaza u limfne čvorove vrata ostaje samo negativna CPSF2 ekspresija (0 i 1+). U njihovoj analizi postoji metodološki problem jer su u multivarijatnoj analizi uzeti svi potencijalni prediktori metastaza u limfne čvorove vrata iz univarijatne analize, bez obzira jesu li tamo bili značajni ili ne (150).

Visoka stopa regionalnih metastaza na vratu ne interferira s odličnom prognozom ove bolesti uz 10-godišnje preživljenje >90%. Prema brojnim studijama prisustvo regionalnih metastaza na vratu nema utjecaja na preživljenje (83, 176-178). Stopa recidiva za PKŠ nakon inicijalnog liječenja se prema literaturi kreće od 8%-32% (166-167). Recidiv bolesti je

čimbenik s najnegativnijim utjecajem na morbiditet. Recidiv rezultira narušenom kvalitetom života, rizikom od ponovnih operacija i izloženošću visokoj kumulativnoj dozi RAI, što dovodi do povećanog rizika od komplikacija, morbiditeta i smrti (173, 174). Prema našem istraživanju opća stopa recidiva iznosi 13%, dok je ispitivana skupina s metastazama u limfne čvorove vrata nasuprot kontrolnoj skupini bez metastaza statistički značajno povezana s recidivima. Naše istraživanje također pokazuje da CPSF2 skupine intenziteta 2 i manje imaju značajno značajno češće recidive. Nilubol i suradnici su in vitro studijom potvrdili da su razine ekspresije CPSF2 mRNA u svim uzorcima bile značajno niže u bolesnika s više recidiva i da su razine ekspresije CPSF2 mRNA bile povezane s preživljenjem do recidiva (149).

Nije bilo značajnih razlika u krivuljama kada analiziramo vrijeme preživljenja do pojave recidiva s obzirom na prisutnost mutacije V600E gena BRAF odnosno BRAF mutacija nije bila značajan prediktor preživljenja do pojave recidiva.

Kada gledamo preživljenje do recidiva skupina CPSF2 3+ ima značajno dulje preživljenje (139,7 mjeseci naprema 129,6 mjeseci za skupinu CPSF <3+ ; P=0,008). Indikativno je da nakon 49 mjeseci praćenja više nema novih promjena, odnosno novih recidiva i krivulje su ravne. Naši rezultati mogu biti preporuka za nove smjernice poslijeoperacijskog praćenja bolesnika ovisno o ekspresiji CPSF2 proteina. Sung i suradnici navode da je skupina CPSF2-negativna (ekspresija 0 i 1+) imala statistički značajno kraće preživljenje do recidiva u usporedbi sa skupinom CPSF2-pozitivnom grupom (2+ i 3+) (150).

Kada gledamo preživljenje do recidiva skupine s obzirom na kombinaciju pozitivnog nalaza mutacije V600E gena BRAF i izraženosti CPSF2 proteina <3+ ta skupina ima značajno kraće preživljenje (105,0 mjeseci naprema 146,6 mjeseci).

Neki autori su multivarijantnom analizom pokazali da je prisutna BRAF mutacija kod PKŠ povezana s većom učestalosti regionalnih metastaza u limfne čvorove, multifokalnom pojavom u štitnjači, probojem kapsule štitnjače i ekstratiroidnim širenjem, mlađim dobnim skupinama i većim stupnjem recidiva (152-154).

Od prediktorskih varijabli u predikciji nastanka recidiva se izdvaja CPSF2 izraženost <3+ (P=0,039) kao najjači prediktor, BRAF V600E pozitivnost (P=0,043) kao drugi po jačini te starija dob kao protektivni čimbenik jer smanjuje vjerojatnost recidiva (P=0,020), a kontrolirano na utjecaj svih ostalih varijabli u modelu. Osim procjene potencijalnih biomarkera, svrha našeg istraživanja je i preciznije određivanje male skupine bolesnika koji bi imali

indikaciju za primjenu pametnih lijekova možda već u početnoj fazi bolesti. Vemurafenib (inhibitor tirozin kinaze) koji cilja BRAF mutaciju nije trenutno predmet istraživanja samo u slučaju inoperabilnog papilarnog karcinoma štitnjače refrakternog na RAI, nego i kao incijalni tretman lokalno agresivnog papilarnog karcinoma štitnjače. Osnovna premisa ovih kliničkih studija je da blokirajući ovu mutaciju lijek može ubiti stanice raka s mutacijom i/ili zaustaviti rast tumora, a time i pojačati avidnost na RAI.

Zbog visoke prevalencije BRAF mutacije u papilarnim karcinomima štitnjače, za koju se pokazalo da je povezana s agresivnom bolešću, Nilubol i suradnici su pokušali pokazati je li CPSF2 regulirao BRAF ili je bio cilj BRAF mutacije. Liječili su mutantne stanice karcinoma štitnjače BRAF V600E s inhibitorom tirozin kinaze - vemurafenibom. Nije bilo razlike u ekspresiji proteina CPSF2 između kontrolnih i tretiranih stanica te su stoga zaključili da je ekspresija CPSF2 proteina neovisna o BRAF inhibiciji.

Sung i suradnici zaključuju da je negativna ekspresija CPSF2 proteina samostalno povezana s lošijim kliničkim ishodom u bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače i da bi CPSF2 mogao biti koristan prognostički biljeg u papilarnom karcinomu štitnjače u zemljama s visokom prevalencijom mutacije BRAF V600E (71% u ovoj studiji) (150). Temeljem naših rezultata mišljenja smo da za sada nema dovoljan broj studija koje bi dokazale da se smanjena ekspresija CPSF2 proteina može koristiti kao samostalan i neovisan prediktivni faktor nepovoljnijeg oblika bolesti.

Postoji nekoliko razloga zbog kojih je PKŠ u žarištu kliničkog interesa svih medicinskih struka koje se bave bolestima štitnjače. Izraziti porast incidencije u svijetu uglavnom se opravdava povećanom dostupnošću ultrazvučne dijagnostike koja se sada nudi prilikom preventivnih i sistematskih pregleda zdrave i „asimptomatske" populacije (8-10). Takvi „preventivni" pregledi dovode i do toga da se u ukupnom broju oboljelih nalazi veći broj onih kojima je PKŠ dijagnosticiran u ranom stadiju bolesti (102). Uz pojačan klinički interes, raslo je i nesuglasje vezano uz optimalan opseg kirurškog liječenja primarnog tumora, ali i metastatske bolesti. Do nedavno je većina studija zagovarala totalnu tireoidektomiju kao jedini modalitet kirurškog liječenja s obzirom na veliki postotak multifokalnih tumora (78-80), a neki su čak zagovarali i elektivnu disekciju vrata zbog visokog postotka limfogene lokoregionalne diseminacije bolesti te okultnih metastaza na vratu (151). Svi ovi napori nisu doveli do smanjivanja smrtnosti i još dužeg preživljenja kod bolesti ionako indolentnog tijeka i odlične prognoze (3). Naprotiv, takav pristup doveo je do većeg broja kirurških komplikacija koje

mogu imati trajne posljedice za kvalitetu života oboljelih, a koji su većinom žene mlađe i srednje životne dobi. Osim ozbiljnih komplikacija kirurškog liječenja, daljnji postupak kod ovih bolesnika predviđa primjenu radiojodne terapije te provođenje TSH-supresije tj. doživotne supstitucijske terapije hormonima štitnjače. Ovakav pristup nadalje financijski opterećuje zdravstveni sustav, a opetovano narušava zdravlje i kvalitetu života ovih bolesnika. Pogotovo kada se uzme u obzir da je bolest izlječiva, čak i u slučaju prisustva limfogenih metastaza. U malog udjela bolesnika s PKŠ, razvit će se hematogene metastaze, a pouzdanije identificiranje ovakvih slučajeva u ranoj fazi bolesti omogućilo bi agresivniji terapijski pristup, češća i opsežnija praćenja samo te skupine. Dosadašnji sustavi za procjenu kategorije rizika bolesnika s karcinomom štitnjače započinju poslijeoperacijski s uvidom u histopatološke karakteristike tumora. Zadnjih desetljeća pokušavaju se utvrditi i određeni molekularni biljezi iz tumorskog tkiva koji bi omogućili identificiranje bolesnika s dobro diferenciranim karcinomima štitnjače koji su pod povećanim rizikom, bilo od lokalnog/lokoregionalnog povrata bolesti, a osobito pod povećanim rizikom od hematogene diseminacije bolesti. Pojačani napori se nadasve ulažu u pronalazak prognostičkih biomarkera određenih već iz citološkog punktata koji bi uz poznate kliničke parametre i ultrazvučne karakteristike bili dovoljni za procjenu kategorije rizika preoperativno. Time bi identificirali ovaj manji udio bolesnika koji zahtijevaju agresivniji kirurški pristup, učestalije poslijeoperacijsko praćenje, a možda i primarnu primjenu ciljane terapije jer su ovi karcinomi dijelom i refrakterni na standardnu radiojodnu ablaciju. Predklinička istraživanja ukazuju na to da prisustvo BRAFV600E mutacije značajno smanjuje ekspresiju NIS-a i time nakupljanje RAI (147), stoga je prisustvo ove mutacije važno i u kasnijem ciljanom liječenju takvih PKŠ inhibitorima tirozin-kinaze. Trenutno tri kliničke studije imaju za cilj procjenu učinkovitosti vemurafeniba (inhibitor tirozin-kinaze) kod PKŠ u različitim indikacijama (175).

7. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se prisutna mutacija V600E gena BRAF i niska ekspresija CPSF2 proteina ne mogu smatrati samostalnim prediktivnim čimbenicima za razvoj regionalnih metastaza. Unatoč tome što hipoteza ovog istraživanja o povezanosti mutacije gena BRAF i ekspresije CPSF2 proteina s regionalnim metastazama u limfne čvorove vrata nije potvrđena, rezultati ih povezuju s učestalošću recidiva i dužinom preživljenja do recidiva kao relevantnijim parametrima lošijeg ishoda.

Premda rezultati naše studije u kojem visoka stopa multifokalnih PKŠ ide u prilog totalnoj tireoidektomiji, a statistički značajna povezanost multifokalnih tumora s prisutnim regionalnim metastazama zagovara elektivnu disekciju vrata kao jedine ispravne modalitete kirurškog liječenja, iskustva drugih zemalja koje su se vodile istim rezultatima nas uče drugačije. Značajno povećanje incidencije zahvaljujući screening metodama dijagnosticiranja i agresivno liječenje ovih tumora ne samo da ne smanjuje stopu smrtnosti, nego značajno povećava stopu komplikacija i trajno narušavaju kvalitetu života ovim bolesnicima. Daljnji porast incidencije ovih tumora zahvaljujući sve većoj dostupnosti dijagnostike je neizbježan, stoga je nužno daljnje ispitivanje potencijalnih prognostičkih čimbenika, kako bi se boljim planiranjem opsega liječenja smanjio perioperacijski pobol te racionaliziralo poslijeoperacijsko praćenje bolesnika.

S obzirom na to da CPSF2 skupine intenziteta 2 i manje imaju značajno češće recidive, možemo izvesti zaključak da su ovim bolesnicima potrebne učestalije kontrole u cilju ranog otkrivanja eventualnih recidiva. Skupina s kombinacijom pozitivnog nalaza mutacije V600E gena BRAF i izraženosti CPSF2 proteina <3+ ima značajno kraće preživljenje do recidiva. Iz ovih rezultata možemo izvesti zaključak da bi određivanje ekspresije ovog proteina unaprijedilo važeće smjernice i klasifikacijski sustav za procjenu rizika ATA-e (ovaj sustav već uzima u obzir prisustvo BRAF mutacije). Skupina CPSF 3+ ima značajno dulje preživljenje do recidiva naspram drugih s niskom ekspresijom CPSF2 proteina. Indikativno je da nakon 49 mjeseci praćenja više nema novih promjena, odnosno novih recidiva. Ako uzmemo sve ove parametre u obzir, naši rezultati mogu biti preporuka za nove smjernice poslijeoperacijskog praćenja bolesnika ovisno o ekspresiji CPSF2 proteina.

Dodatnu sigurnost u predikciji nastanka recidiva nam daje multivarijantna analiza na temelju koje zaključujemo da su mlađi bolesnici s ekspresijom CPSF2 <3+ i prisutnom BRAF V600E mutacijom u povećanom riziku od razvoja recidiva i zahtijevaju intenzivnije praćenje.

Značajnu povezanost mutacije V600E gena BRAF i okultnih metastaza nas navodi na zaključak da bi preoperativna analiza BRAF statusa u uzorku dobivenom aspiracijskom biopsijom iglom pod kontrolom ultrazvuka mogla predvidjeti okultne metastaze u centralnim regijama vrata kod pacijenata s PKŠ, a klinički negativnim vratom. Preoperativno određivanje veličine tumora (T statusa) i prisustvo multifokalnosti uz određivanje mutacije gena BRAF mogu pomoći odluci o elektivnoj disekcija centralne regije vrata. Osim procjene potencijalnih biomarkera, naše istraživanje može pomoći i u preciznijem određivanju male skupine bolesnika koji bi imali indikaciju za primjenu pametnih lijekova možda već u početnoj fazi bolesti.

Uključujući našu studiju i dalje nema dovoljan broj istraživanja koja bi dokazala da se smanjena ekspresija CPSF2 proteina može koristiti kao samostalan i neovisan prediktivni faktor nepovoljnijeg oblika bolesti.

8. SAŽETAK

Mnogobrojne studije usmjerene su na utvrđivanje prognostičkih biomarkera koji bi nam pouzdano izdvojili agresivne oblike papilarnog karcinoma štitnjače već u početnom stadiju bolesti i time omogućili bolju strategiju liječenja. Većina studija naglašava veliku varijabilnost u prevalenciji mutacije V600E gena BRAF u PKŠ, a kreće se između 30% i 80%, ovisno o zemljopisnom položaju regije i konzumaciji joda. Jedna od novijih studija navodi da je i smanjena ekspresija gena zaduženog za specifični faktor za cijepanje i poliadenilaciju, podjedinica 2 (CPSF2) povezana s invazivnošću karcinomskih stanica i agresivnim oblikom PKŠ. Cilj je ove retrospektivne studije određivanje prisutnosti mutacije V600E gena BRAF i ekspresije proteina CPSF2 na arhivskom bioptičkom materijalu PKŠ i time definiranja pouzdanih biomarkera za prognozu te progresiju metastaziranja PKŠ koji bilježi značajan i stalan porast incidencije.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da se prisutna mutacija V600E gena BRAF i niska ekspresija CPSF2 proteina ne mogu smatrati samostalnim prediktivnim čimbenicima za razvoj regionalnih metastaza. Utvrdili smo značajnu povezanost mutacije V600E gena BRAF i okultnih metastaza u klinički negativnom vratu. Rezultati ukazuju na to da CPSF2 skupine intenziteta 2 i manje imaju značajno češće recidive, a skupina s kombinacijom pozitivnog nalaza mutacije V600E gena BRAF i izraženosti CPSF2 proteina <3+ ima značajno kraće preživljenje do recidiva.

Na temelju našeg istraživanja možemo zaključiti da bi određivanje prisustva BRAF mutacije i ekspresije CPSF2 proteina u tumorskim tkivima PKŠ unaprijedilo važeće smjernice i klasifikacijski sustav za procjenu rizika ATA.

Ključne riječi: mutacija V600E gena BRAF, CPSF2, papilarni karcinom štitnjače, metastaze

9. SUMMARY

BRAF V600E mutation and CPSF2 expression as prognostic markers for papillary thyroid cancer, Irena Ivković, 2022.

Numerous studies have focused on identifying prognostic biomarkers that reliably predict aggressive forms of papillary thyroid cancer at the early stages of disease and thus enable better treatment strategy. Most studies underline wide variation in the prevalence of BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer, which varies between 30% and 80% depending on geographic region and iodine consumption. Recent study reported that the loss of cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 (CPSF2) is associated with increased cellular invasion and aggressive form of papillary thyroid cancer. The aim of this retrospective study was to determine the presence of BRAF V600E mutation and CPSF2 protein expression in papillary thyroid cancer archived specimens, thus defining a reliable biomarker for prognosis and progression of metastatic papillary thyroid cancer, which has recorded a significant and steady increase in the incidence.

Based on the obtained results, we can conclude that the presence of the V600E mutation of the BRAF gene and the low expression of the CPSF2 protein cannot be considered independent predictive factors for the development of regional metastases. We found a significant association between the V600E mutation of the BRAF gene and occult metastases in the clinically negative neck. The results indicate that CPSF2 groups with an expression intensity of 2 and less have significantly more frequent relapses, and the group with a combination of a positive finding of the V600E mutation of the BRAF gene and expression of the CPSF2 protein <3+ has a significantly disease-free survival.

Based on our research, we can conclude that determining the presence of BRAF mutation and CPSF2 protein expression in papillary thyroid cancer would improve the current guidelines and classification system for ATA risk assessment.

Keywords: BRAF V600E mutation, CPSF2, papillary thyroid carcinoma, metastases

POPIS LITERATURE

1. Cramer JD, Fu P, Harth KC, Margevicius S, Wilhelm SM. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the surveillance, epidemiology and end results national cancer data registry. Surgery. 2010;148(6):1147-52. doi: 10.1016/j.surg.2010.10.016.

2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, i sur. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer. 2019;144(8):1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937.

3. Powell GJ, Hay ID. Papillary Carcinoma of the Thyroid. U: Randolph GW, ur. Surgery of the thyroid and parathyroid glands. Philadelphia: WB Saunders; 2003. Str. 188-211.

4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, i sur. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin. 2006;56(2):106-30. doi: 10.3322/canjclin.56.2.106.

5. Bleyer A, Viny A, Barr R. Cancer in 15- to 29-year-olds by primary site. Oncologist. 2006;11(6):590-601. doi: 10.1634/theoncologist.11-6-590.

6. Wu X, Groves FD, McLaughlin CC, Jemal A, Martin J, Chen VW. Cancer incidence patterns among adolescents and young adults in the United States. Cancer Causes Control. 2005;16(3):309-20. doi: 10.1007/s10552-004-4026-0.

7. Wu XC, Chen VW, Steele B, Roffers S, Klotz JB, Correa CN, i sur. Cancer incidence in adolescents and young adults in the United States, 1992-1997. J Adolesc Health. 2003;32(6):405-15. doi: 10.1016/s1054-139x(03)00057-0.

8. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA. 2006;295(18):2164-7.64. doi: 10.1001/jama.295.18.2164.

9. Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? Hormones (Athens). 2010;9(2):103-8. doi: 10.14310/horm.2002.1260.

10. Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, i sur. Papillary microcarcinoma of the thyroid: how should it be treated? World J Surg. 2004;28(11):1115-21. doi: 10.1007/s00268-004-7644-5.

11. Görges R. The changing epidemiology of thyroid cancer. U: Biersack H-J, Grunwald F, ur. Thyroid cancer. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. Str. 3-27.

12. Reynolds RM, Weirt J, Stockton DL, Brewster DH, Thekkepat C, Strachan S, i sur. Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. Clin Endocrinol (Oxf). 2005;62(2):156-62. doi: 10.1111/j.1365-2265.2004.02187.x.

13. Schneider AB, Ron E. Carcinoma of follicular epithelium. Epidemiology and pathogenesis. U: Bravermann LE, Utiger RD, ur. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 9. izd. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2005. Str. 889-906.

14. Collins SL. Thyroid cancer: controversies and etiopathogenesis. U: Falk SA ur. Thyroid disease: endocrinology, surgery, nuclear medicine, and radiotherapy. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 1997. Str. 531–4.

15. Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, i sur. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. Radiat Res. 1995;141(3):259-77.

16. Wong FL, Ron E, Gierlowski T, Schneider AB. Benign thyroid tumors: general risk factors and their effects on radiation risk estimation. Am J Epidemiol. 1996;144(8):728-33. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a008996

17. Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, Malakhova I, Shibata Y, Khrouch V, i sur. Risk of thyroid cancer after exposure to 131I in childhood. J Natl Cancer Inst. 2005;97(10):724-32. doi: 10.1093/jnci/dji129.

18. Fagin JA. Molecular genetics of tumors of thyroid follicular cells. U: Bravermann LE, Utiger RD, ur. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text, 9. izd. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2005. Str. 906-27.

19. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Butó S, Collini P, Pilotti S, i sur. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. Am J Pathol. 1999:155(6):1967-76. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65515-0.

20. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F, i sur. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(2):656-8. doi: 10.1210/jcem.86.2.7226.

21. Soh EY, Eigelberger MS, Kim KJ, Wong MG, Young DM, Clark OH, i sur. Neutralizing vascular endothelial growth factor activity inhibits thyroid cancer growth in vivo. Surgery. 2000;128(6):1059-65. doi: 10.1067/msy.2000.110430.

22. Martinez-Tello FJ, Martinez-Cabruja R, Fernandez-Martin J, Lasso-Oria C, Ballestin-Carcavilla C. Occult carcinoma of the thyroid. A systematic autopsy study from Spain of two series performed with two different methods. Cancer. 1993;71(12):4022-9. doi: 10.1002/1097-0142(19930615)71:12<4022::aid-cncr2820711236>3.0.co;2-o.

23. Harach HR, Franssila KO, Wasenius VM. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study. Cancer. 1985;56(3):531-8. doi: 10.1002/1097-0142(19850801)56:3<531::aid-cncr2820560321>3.0.co;2-3.

24. Neuhold N, Kaiser H, Kaserer K. Latent carcinoma of the thyroid in Austria: a systematic autopsy study. Endocr Pathol. 2001;12(1):23-31. doi: 10.1385/ep:12:1:23.

25. Baloch ZH, Livolsi VA. Pathology. U: Bravermann LE, Utiger RD, ur. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text, 9. izd. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2005. Str. 422-49.

26. LiVolsi V. Pathology of Thyroid Disease. U: Falk SA ur. Thyroid disease: endocrinology, surgery, nuclear medicine, and radiotherapy. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 1997. Str. 65-104.

27. Rosai J, Albores-Saavedra J, Asioli S. Papillary Thyroid Carcinoma. U: Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J, ur. WHO Classification of tumours: tumours of endocrine organs, 4. izd. Lyon: IARC Press; 2017. Str. 81-91.

28. Nikiforov YE, Ohori NP. Papillary Carcinoma. U: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LDR, ur. Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. Str. 160- 214.

29. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, i sur. 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):1-133. doi: 10.1089/thy.2015.0020.

30. Vickery AL, Jr., Carcangiu ML, Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M. Papillary carcinoma. Semin Diagn Pathol. 1985;2(2):90-100.

31. Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J. Papillary thyroid carcinoma: a study of its many morphologic expressions and clinical correlates. Pathol Annu. 1985;20 Pt 1:1-44.

32. Dzepina D, Zurak K, Petric V, Cupic H. Pathological characteristics and clinical perspectives of papillary thyroid cancer: study of 714 patients. Eur Arch Otorhinolaryngol 2014;271(1):141-8. doi: 10.1007/s00405-013-2472-6.

33. Chernock RD, Lewis JS Jr. Classification of psammoma bodies in the revised College of American Pathologists Thyroid Cancer Protocol. Arch Pathol Lab Med. 2015;139(8):967. doi: 10.5858/arpa.2014-0483-LE.

34. Wang X, Cheng W, Liu C, Li J. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: current evidence on clinicopathologic features and molecular biology. Oncotarget. 2016;7(26):40792-40799. doi: 10.18632/oncotarget.8215.

35. Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary thyroid carcinoma variants. Head Neck Pathol. 2011;5(1):51-6. doi: 10.1007/s12105-010-0236-9.

36. Asa SL. My approach to oncocytic tumours of the thyroid. J Clin Pathol. 2004;57(3):225-32. doi: 10.1136/jcp.2003.008474.

37. Schröder S, Böcker W. Clear-cell carcinomas of thyroid gland: a clinicopathological study of 13 cases. Histopathology. 1986;10(1):75-89. doi: 10.1111/j.1365-2559.1986.tb02462.x.

38. Paliogiannis P, Attene F, Trogu F, Trignano M. Warthin-like papillary carcinoma of the thyroid gland: case report and review of the literature. Case Rep Oncol Med. 2012;2012:689291. doi: 10.1155/2012/689291

39. Chow SM, Chan JK, Law SC, Tang DL, Ho CM, Cheung WY, i sur. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma--clinical features and outcome. Eur J Surg Oncol. 2003;29(5):446-9. doi: 10.1016/s0748-7983(03)00005-2.

40. Mizukami Y, Nonomura A, Michigishi T, Noguchi M, Nakamura S, Hashimoto T. Columnar cell carcinoma of the thyroid gland: a case report and review of the literature. Hum Pathol. 1994;25(10):1098-101. doi: 10.1016/0046-8177(94)90071-x.

41. Baloch Z, LiVolsi VA. Pathology of the Thyroid Gland. U: Livolsi VA, Asa S, ur. Endocrine pathology. Philadelphia: Churchill Livingston; 2002. Str. 61-88.

42. Mazzaferri EL. Long-term outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma: effect of therapy. Endocr Pract. 2000;6(6):469-76. doi: 10.4158/EP.6.6.469.

43. Mazzaferri EL, Massoll N. Management of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer: new paradigms using recombinant human thyrotropin. Endocr Relat Cancer. 2002;9(4):227-47. doi: 10.1677/erc.0.0090227

44. Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J. Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. Cancer. 1985;55(4):805-28. doi: 10.1002/1097-0142(19850215)55:4<805::aid-cncr2820550419>3.0.co;2-z.

45. Iacobone M, Jansson S, Barczyński M, Goretzki P. Multifocal papillary thyroid carcinoma--a consensus report of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). Langenbecks Arch Surg. 2014;399(2):141-54. doi: 10.1007/s00423-013-1145-7.

46. Grebe SK, Hay ID. Thyroid cancer nodal metastases: biologic significance and therapeutic considerations. Surg Oncol Clin N Am. 1996;5(1):43-63.

47. Shaha AR. Management of the neck in thyroid cancer. Otolaryngol Clin North Am. 1998;31(5):823-31. doi: 10.1016/s0030-6665(05)70090-6.

48. McGregor GI, Luoma A, Jackson SM. Lymph node metastases from well-differentiated thyroid cancer. A clinical review. Am J Surg. 1985;149(5):610-2. doi: 10.1016/s0002-9610(85)80137-9.

49. Machens A, Hinze R, Thomusch O, Dralle H. Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer. World J Surg. 2002;26(1):22-8. doi: 10.1007/s00268-001-0176-3

50. Kliseska E, Makovac I. Skip metastases in papillary thyroid cancer. Coll Antropol. 2012;36(Suppl 2):S59-62.

51. Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. Skip metastases in thyroid cancer leaping the central lymph node compartment. Arch Surg. 2004;139(1):43-5. doi: 10.1001/archsurg.139.1.43.

52. Pingpank JF Jr, Sasson AR, Hanlon AL, Friedman CD, Ridge JA. Tumor above the spinal accessory nerve in papillary thyroid cancer that involves lateral neck nodes: a common occurrence. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2002;128(11):1275-8. doi: 10.1001/archotol.128.11.1275.

53. Schlumberger M, Tubiana M, De Vathaire F, Hill C, Gardet P, Travagli JP, i sur. Long-term results of treatment of 283 patients with lung and bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 1986;63(4):960-7. doi: 10.1210/jcem-63-4-960.

54. Shoup M, Stojadinovic A, Nissan A, Ghossein RA, Freedman S, Brennan MF, i sur. Prognostic indicators of outcomes in patients with distant metastases from differentiated thyroid carcinoma. J Am Coll Surg. 2003;197(2):191-7. doi: 10.1016/S1072-7515(03)00332-6.

55. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, i sur. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(5):1941-6. doi: 10.1210/jcem.87.5.8504.

56. Eustatia-Rutten CF, Smit JW, Romijn JA, van der Kleij-Corssmit EP, Pereira AM, Stokkel MP, i sur. Diagnostic value of serum thyroglobulin measurements in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma, a structured meta-analysis. Clin Endocrinol (Oxf). 2004;61(1):61-74. doi: 10.1111/j.1365-2265.2004.02060.x.

57. David A, Blotta A, Rossi R, Zatelli MC, Bondanelli M, Roti E, i sur. Clinical value of different responses of serum thyroglobulin to recombinant human thyrotropin in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. Thyroid. 2005;15(3):267-73. doi: 10.1089/thy.2005.15.267.

58. Pacini F, Molinaro E, Lippi F, Castagna MG, Agate L, Ceccarelli C, i sur. Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(12):5686-90. doi: 10.1210/jcem.86.12.8065.

59. Huic D, Medvedec M, Dodig D, Popovic S, Ivancevic D, Pavlinovic Z, i sur. Radioiodine uptake in thyroid cancer patients after diagnostic application of low-dose 131I. Nucl Med Commun. 1996;17(10):839-42.

60. Lassmann M, Luster M, Hänscheid H, Reiners C. Impact of 131I diagnostic activities on the biokinetics of thyroid remnants. J Nucl Med. 2004;45(4):619-25.

61. Park HM, Park YH, Zhou XH. Detection of thyroid remnant/metastasis without stunning: an ongoing dilemma. Thyroid. 1997;7(2):277-80. doi: 10.1089/thy.1997.7.277.

62. Yin Y, Mao Q, Chen S, Li N, Li X, Li Y. A Clinical trial of optimal time interval between ablation and diagnostic activity when a pretherapy RAI scanning is performed on patients with differentiated thyroid carcinoma. Medicine (Baltimore). 2015;94(31):e1308. doi: 10.1097/MD.0000000000001308.

63. Pacini F, Capezzone M, Elisei R, Ceccarelli C, Taddei D, Pinchera A. Diagnostic 131-iodine whole-body scan may be avoided in thyroid cancer patients who have undetectable stimulated serum Tg levels after initial treatment. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(4):1499-501. doi: 10.1210/jcem.87.4.8274.

64. Fatourechi V, Hay ID, Mullan BP, Wiseman GA, Eghbali-Fatourechi GZ, Thorson LM, i sur. Are posttherapy radioiodine scans informative and do they influence subsequent therapy of patients with differentiated thyroid cancer? Thyroid. 2000;10(7):573-7. doi: 10.1089/thy.2000.10.573.

65. Pacini F, Lippi F, Formica N, Elisei R, Anelli S, Ceccarelli C, i sur. Therapeutic doses of iodine-131 reveal undiagnosed metastases in thyroid cancer patients with detectable serum thyroglobulin levels. J Nucl Med. 1987;28(12):1888-91.

66. Sherman SI, Tielens ET, Sostre S, Wharam MD Jr, Ladenson PW. Clinical utility of posttreatment radioiodine scans in the management of patients with thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 1994;78(3):629-34. doi: 10.1210/jcem.78.3.8126134.

67. Avram AM. Radioiodine scintigraphy with SPECT/CT: an important diagnostic tool for thyroid cancer staging and risk stratification. J Nucl Med. 2012;53(5):754-64. doi: 10.2967/jnumed.111.104133.

68. Yamamoto Y, Nishiyama Y, Monden T, Matsumura Y, Satoh K, Ohkawa M. Clinical usefulness of fusion of 131I SPECT and CT images in patients with differentiated thyroid carcinoma. J Nucl Med. 2003;44(12):1905-10.

69. Casara D, Rubello D, Saladini G, Masarotto G, Favero A, Girelli ME, i sur. Different features of pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: natural history and multivariate statistical analysis of prognostic variables. J Nucl Med. 1993;34(10):1626-31.

70. Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpção LV, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. Cancer Lett. 2003;200(1):85-91. doi: 10.1016/s0304-3835(03)00392-6.

71. Dietlein M, Scheidhauer K, Voth E, Theissen P, Schicha H. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and iodine-131 whole-body scintigraphy in the follow-up of differentiated thyroid cancer. Eur J Nucl Med. 1997;24(11):1342-8. doi: 10.1007/s002590050158.

72. Hooft L, Hoekstra OS, Devillé W, Lips P, Teule GJ, Boers M, i sur. Diagnostic accuracy of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the follow-up of papillary or follicular thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(8):3779-86. doi: 10.1210/jcem.86.8.7777.

73. Wang W, Larson SM, Fazzari M, Tickoo SK, Kolbert K, Sgouros G, i sur. Prognostic value of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomographic scanning in patients with thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(3):1107-13. doi: 10.1210/jcem.85.3.6458.

74. Kebebew E, Clark OH. Locally advanced differentiated thyroid cancer. Surg Oncol. 2003;12(2):91-9. doi: 10.1016/s0960-7404(03)00032-x.

75. Takashima S, Matsushita T, Takayama F, Kadoya M, Fujimori M, Kobayashi T. Prognostic significance of magnetic resonance findings in advanced papillary thyroid cancer. Thyroid. 2001;11(12):1153-9. doi: 10.1089/10507250152741000.

76. Datz FL. Cerebral edema following iodine-131 therapy for thyroid carcinoma metastatic to the brain. J Nucl Med. 1986;27(5):637-40.

77. Cady B. Hayes Martin Lecture. Our AMES is true: how an old concept still hits the mark: or, risk group assignment points the arrow to rational therapy selection in differentiated thyroid cancer. Am J Surg. 1997;174(5):462-8. doi: 10.1016/s0002-9610(97)00162-1.

78. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS, i sur. Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. Ann Surg. 2007;246(3):375-81. doi: 10.1097/SLA.0b013e31814697d9.

79. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, i sur. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. World J Surg. 2002;26(8):879-85. doi: 10.1007/s00268-002-6612-1.

80. Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. Arch Surg. 1998;133(4):419-25. doi: 10.1001/archsurg.133.4.419.

81. Haddad RI, Lydiatt WM, Bischoff L, Busaidy NL, Byrd D, Callender G i sur. NCCN Clinical practice guidelines in oncology for thyroid carcinoma. National Comprehensive Cancer Network. [pristupljeno 04.06.2016]. Dostupno na: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/thyroid.pdf

82. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Hauger BR, Kloos RT, Lee SL, i sur. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Thyroid. 2009;19(11):1167-214. doi: 10.1089/thy.2009.0110.

83. Beasley NJ, Lee J, Eski S, Walfish P, Witterick I, Freeman JL. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2002;128(7):825-8. doi: 10.1001/archotol.128.7.825.

84. Shindo M, Wu JC, Park EE, Tanzella F. The importance of central compartment elective lymph node excision in the staging and treatment of papillary thyroid cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;132(6):650-4. doi: 10.1001/archotol.132.6.650.

85. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W; European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. Eur J Endocrinol. 2006;154(6):787-803. doi: 10.1530/eje.1.02158

86. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. Am J Med. 1994;97(5):418-28. doi: 10.1016/0002-9343(94)90321-2.

87. Kusacic Kuna S, Samardzic T, Tesic V, Medvedec M, Kuna K, Bracic I, i sur. Thyroid remnant ablation in patients with papillary cancer: a comparison of low, moderate, and high activities of radioiodine. Nucl Med Commun. 2009;30(4):263-9. doi: 10.1097/MNM.0b013e3283299992.

88. Prpic M, Kruljac I, Kust D, Kirigin LS, Jukic T, Dabelic N, i sur. Re-ablation I-131 activity does not predict treatment success in low- and intermediate-risk patients with differentiated thyroid carcinoma. Endocrine. 2016;52(3):602-8. doi: 10.1007/s12020-015-0846-9.

89. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(4):1447-63. doi: 10.1210/jcem.86.4.7407

90. Robbins RJ, Schlumberger MJ. The evolving role of (131)I for the treatment of differentiated thyroid carcinoma. J Nucl Med. 2005;46(Suppl 1):S28-S37.

91. Schlumberger M, Charbord P, Fragu P, Lumbroso J, Parmentier C, Tubiana M. Circulating thyroglobulin and thyroid hormones in patients with metastases of differentiated thyroid carcinoma: relationship to serum thyrotropin levels. J Clin Endocrinol Metab. 1980;51(3):513-9. doi: 10.1210/jcem-51-3-513.

92. Edmonds CJ, Hayes S, Kermode JC, Thompson BD. Measurement of serum TSH and thyroid hormones in the management of treatment of thyroid carcinoma with radioiodine. Br J Radiol. 1977;50(599):799-807. doi: 10.1259/0007-1285-50-599-799.

93. Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, i sur. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(8):2892-9. doi: 10.1210/jc.2005-2838.

94. Nam SH, Bae MR, Roh JL, Gong G, Cho KJ, Choi SH, i sur. A comparison of the 7th and 8th editions of the AJCC staging system in terms of predicting recurrence and survival in patients with papillary thyroid carcinoma. Oral Oncol. 2018;87:158-64. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.11.003.

95. Biondi B, Cooper DS. Benefits of thyrotropin suppression versus the risks of adverse effects in differentiated thyroid cancer. Thyroid. 2010;20(2):135-46. doi: 10.1089/thy.2009.0311.

96. Schlumberger M, Brose M, Elisei R, Leboulleux S, Luster M, Pitoia F, i sur, Definition and management of radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014;2(5):356-8. doi: 10.1016/S2213-8587(13)70215-8.

97. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. Nat Rev Endocrinol. 2011;7(10):569-80. doi: 10.1038/nrendo.2011.142.

98. Schlumberger M. Prise en charge des cancers réfractaires de la thyroïde [Liječenje refraktornih tiroidnih karcinoma]. Ann Endocrinol (Paris). 2011;72(2):149-57. doi: 10.1016/j.ando.2011.03.020.

99. Robbins RJ, Wan Q, Grewal RK, Reibke R, Gonen M, Strauss HW, i sur. Real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography scanning. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(2):498-505. doi: 10.1210/jc.2005-1534.

100. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res. 2003;63(7):1454-7.

101. Wang Y, Hou P, Yu H, Wang W, Ji M, i sur. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(6):2387-90. doi: 10.1210/jc.2006-2019.

102. Johannessen JV. Sobrinho-Simoes M. The origin and significance of thyroid psamoma bodies. Lab Invest. 1980;43(3):287-296.

103. Haigh PI, Urbach DR, Rotstein LE. Extent of thyroidectomy is not a major determinant of survival in low- or high-risk papillary thyroid cancer. Ann Surg Oncol. 2005;12(1):81-9. doi: 10.1007/s10434-004-1165-1.

104. Barney BM, Hitchcock YJ, Sharma P, Shrieve DC, Tward JD. Overall and cause-specific survival for patients undergoing lobectomy, near-total, or total thyroidectomy for differentiated thyroid cancer. Head Neck. 2011;33(5):645-9. doi: 10.1002/hed.21504.

105. Mendelsohn AH, Elashoff DA, Abemayor E, St John MA. Surgery for papillary thyroid carcinoma: is lobectomy enough? Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;136(11):1055-61. doi: 10.1001/archoto.2010.181.

106. Nixon IJ, Ganly I, Patel SG, Palmer FL, Whitcher MM, Tuttle RM, i sur. Thyroid lobectomy for treatment of well differentiated intrathyroid malignancy. Surgery. 2012;151(4):571-9. doi: 10.1016/j.surg.2011.08.016.

107. Matsuzu K, Sugino K, Masudo K, Nagahama M, Kitagawa W, Shibuya H, i sur. Thyroid lobectomy for papillary thyroid cancer: long-term follow-up study of 1,088 cases. World J Surg. 2014;38(1):68-79. doi: 10.1007/s00268-013-2224-1.

108. Vaisman F, Shaha A, Fish S, Michael Tuttle R. Initial therapy with either thyroid lobectomy or total thyroidectomy without radioactive iodine remnant ablation is associated with very low rates of structural disease recurrence in properly selected patients with differentiated thyroid cancer. Clin Endocrinol (Oxf). 2011;75(1):112-9. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04002.x.

109. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Staging systems for papillary thyroid carcinoma: a review and comparison. Ann Surg. 2007;245(3):366-78. doi: 10.1097/01.sla.0000250445.92336.2a

110. Moreno-Egea A, Rodriguez-Gonzalez JM, Sola-Perez J, Soria-Cogollos T, Parrilla-Paricio P. Multivariate analysis of histopathological features as prognostic factors in patients with papillary thyroid carcinoma. Br J Surg. 1995;82(8):1092-4. doi: 10.1002/bjs.1800820828.

111. Toniato A, Boschin I, Casara D, Mazzarotto R, Rubello D, Pelizzo M. Papillary thyroid carcinoma: factors influencing recurrence and survival. Ann Surg Oncol. 2008;15(5):1518-22. doi: 10.1245/s10434-008-9859-4

112. Spriano G, Ruscito P, Pellini R, Appetecchia M, Roselli R. Pattern of regional metastases and prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2009;29(6):312-6.

113. Ito Y, Miyauchi A. Prognostic factors and therapeutic strategies for differentiated carcinomas of the thyroid. Endocr J. 2009;56(2):177-92. doi: 10.1507/endocrj.k08e-166.

114. Jung TS, Kim TY, Kim KW, Oh YL, Park DJ, Cho BY, i sur. Clinical features and prognostic factors for survival in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma and comparison to the patients with the aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. Endocr J. 2007;54(2):265-74. doi: 10.1507/endocrj.k06-166.

115. Tuttle RM. Risk-adapted management of thyroid cancer. Endocr Pract. 2008;14(6):764-74. doi: 10.4158/EP.14.6.764.

116. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. Nature. 2002;418(6901):934. doi: 10.1038/418934a

117. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. Endocr Rev. 2007;28(7):742-62. doi: 10.1210/er.2007-0007.

118. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, i sur. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(9):4393-7. doi: 10.1210/jc.2003-030305.

119. Barollo S, Pennelli G, Vianello F, Watutantrige Fernando S, Negro I, Merante Boschin I, i sur. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with (131)I and 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability. Eur J Endocrinol. 2010;163(4):659-63. doi: 10.1530/EJE-10-0290.

120. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, i sur. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(11):5399-404. doi: 10.1210/jc.2003-030838.

121. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, i sur. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(12):6373-9. doi: 10.1210/jc.2005-0987.

122. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, i sur. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. J Clin Oncol. 2015;33(1):42-50. doi: 10.1200/JCO.2014.56.8253.

123. Ritterhouse LL, Barletta JA. BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):400-8. doi: 10.1053/j.semdp.2015.02.010.

124. Czarniecka A, Kowal M, Rusinek D, Krajewska J, Jarzab M, Stobiecka E, i sur. The risk of relapse in papillary thyroid cancer (PTC) in the context of BRAFV600E mutation status and other prognostic factors. PLoS One. 2015;10(7):e0132821. doi: 10.1371/journal.pone.0132821.

125. Hong AR, Lim JA, Kim TH, Choi HS, Yoo WS, Min HS, i sur. The frequency and clinical implications of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid cancer patients in Korea over the past two decades. Endocrinol Metab (Seoul). 2014;29(4):505-13. doi: 10.3803/EnM.2014.29.4.505.

126. Kim SK, Woo JW, Lee JH, Park I, Choe JH, Kim JH, i sur. Role of BRAF V600E mutation as an indicator of the extent of thyroidectomy and lymph node dissection in conventional papillary thyroid carcinoma. Surgery. 2015;158(6):1500-11. doi: 10.1016/j.surg.2015.05.016.

127. Howell GM, Nikiforova MN, Carty SE, Armstrong MJ, Hodak SP, Stang MT, i sur. BRAF V600E mutation independently predicts central compartment lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. Ann Surg Oncol. 2013;20(1):47-52. doi: 10.1245/s10434-012-2611-0.

128. Fraser S, Go C, Aniss A, Sidhu S, Delbridge L, Learoyd D, i sur. BRAF(V600E) mutation is associated with decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. World J Surg. 2016;40(7):1618-24. doi: 10.1007/s00268-016-3534-x.

129. Prescott JD, Sadow PM, Hodin RA, Le LP, Gaz RD, Randolph GW, i sur. BRAF V600E status adds incremental value to current risk classification systems in predicting papillary thyroid carcinoma recurrence. Surgery. 2012;152(6):984-90. doi: 10.1016/j.surg.2012.08.039.

130. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, i sur. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. JAMA. 2013;309(14):1493-501. doi: 10.1001/jama.2013.3190.

131. Tallini G, de Biase D, Durante C, Acquaviva G, Bisceglia M, Bruno R, i sur. BRAF V600E and risk stratification of thyroid microcarcinoma: a multicenter pathological and clinical study. Mod Pathol. 2015;28(10):1343-59. doi: 10.1038/modpathol.2015.92.

132. Paulson L, Shindo M, Schuff K, Corless C. The role of molecular markers and tumor histological type in central lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2012;138(1):44-9. doi: 10.1001/archoto.2011.226.

133. Kim HJ, Sohn SY, Jang HW, Kim SW, Chung JH. Multifocality, but not bilaterality, is a predictor of disease recurrence/persistence of papillary thyroid carcinoma. World J Surg. 2013;37(2):376-84. doi: 10.1007/s00268-012-1835-2.

134. Zheng X, Wei S, Han Y, Li Y, Yu Y, Yun X, i sur. Papillary microcarcinoma of the thyroid: clinical characteristics and BRAF(V600E) mutational status of 977 cases. Ann Surg Oncol. 2013;20(7):2266-73. doi: 10.1245/s10434-012-2851-z.

135. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Máximo V, Silva P, Magalhães J, i sur. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. J Pathol. 2004;202(2):247-51. doi: 10.1002/path.1511.

136. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, i sur. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. Oncogene. 2003;22(41):6455-7. doi: 10.1038/sj.onc.1206739.

137. Mathur A, Moses W, Rahbari R, Khanafshar E, Duh QY, Clark O, i sur. Higher rate of BRAF mutation in papillary thyroid cancer over time: a single-institution study. Cancer. 2011;117(19):4390-5. doi: 10.1002/cncr.26072.

138. Sykorova V, Dvorakova S, Ryska A, Vcelak J, Vaclavikova E, Laco J, i sur. BRAFV600E mutation in the pathogenesis of a large series of papillary thyroid carcinoma in Czech Republic. J Endocrinol Invest. 2010;33(5):318-24. doi: 10.1007/BF03346593.

139. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer. 2005;12(2):245-62. doi: 10.1677/erc.1.0978.

140. Ahn HY, Chung YJ, Kim BS, Kang KH, Seok JW, Kim HS, i sur. Clinical significance of the BRAF V600E mutation in multifocal papillary thyroid carcinoma in Korea. Surgery. 2014;155(4):689-95. doi: 10.1016/j.surg.2013.12.025.

141. Yim JH, Kim WG, Jeon MJ, Han JM, Kim TY, Yoon JH, i sur. Association between expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein and the clinical outcome in a BRAF V600E-prevalent papillary thyroid cancer population. Thyroid. 2014;24(4):689-94. doi: 10.1089/thy.2012.0585.

142. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, i sur. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. Cancer. 2012 1;118(7):1764-73. doi: 10.1002/cncr.26500.

143. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, i sur. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2005;63(5):588-93. doi: 10.1111/j.1365-2265.2005.02389.x.

144. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, i sur. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2006;65(3):364-8. doi: 10.1111/j.1365-2265.2006.02605.x.

145. Kim TY, Kim WG, Kim WB, Shong YK. Current status and future perspectives in differentiated thyroid cancer. Endocrinol Metab (Seoul). 2014;29(3):217-25. doi: 10.3803/EnM.2014.29.3.217.

146. Nikiforov YE, Nikiforova MN, Gnepp DR, Fagin JA. Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. Oncogene. 1996;13(4):687-93.

147. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C Jr, Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. Cancer Res. 2005;65(6):2465-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3314.

148. Nilubol N, Sukchotrat C, Zhang L, He M, Kebebew E. Molecular pathways associated with mortality in papillary thyroid cancer. Surgery. 2011;150(6):1023-31. doi: 10.1016/j.surg.2011.09.021.

149. Nilubol N, Boufraqech M, Zhang L, Kebebew E. Loss of CPSF2 expression is associated with increased thyroid cancer cellular invasion and cancer stem cell population, and more aggressive disease. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(7):E1173-82. doi: 10.1210/jc.2013-4140.

150. Sung TY, Kim M, Kim TY, Kim WG, Park Y, Song DE, i sur. Negative expression of CPSF2 predicts a poorer clinical outcome in patients with papillary thyroid carcinoma. Thyroid. 2015;25(9):1020-5. doi: 10.1089/thy.2015.0079.

151. Sakorafas GH, Sampanis D, Safioleas M. Cervical lymph node dissection in papillary thyroid cancer: current trends, persisting controversies, and unclarified uncertainties. Surg Oncol. 2010;19(2):e57-70. doi: 10.1016/j.suronc.2009.04.002.

152. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M, Lupi C, Sensi E, i sur. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(9):4197-205. doi: 10.1210/jc.2010-0337.

153. Lin KL, Wang OC, Zhang XH, Dai XX, Hu XQ, Qu JM. The BRAF mutation is predictive of aggressive clinicopathological characteristics in papillary thyroid microcarcinoma. Ann Surg Oncol. 2010;17(12):3294-300. doi: 10.1245/s10434-010-1129-6.

154. Li F, Chen G, Sheng C, Gusdon AM, Huang Y, Lv Z, i sur. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. Endocr Relat Cancer. 2015;22(2):159-68. doi: 10.1530/ERC-14-0531.

155. Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2012;91(5):274-286. doi: 10.1097/MD.0b013e31826a9c71.

156. Shattuck TM, Westra WH, Ladenson PW, Arnold A. Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. N Engl J Med. 2005;352(23):2406-12. doi: 10.1056/NEJMoa044190.

157. Iida F, Yonekura M, Miyakawa M. Study of intraglandular dissemination of thyroid cancer. Cancer. 1969;24(4):764-71. doi: 10.1002/1097-0142(196910)24:4<764::aid-cncr2820240416>3.0.co;2-s.

158. Katoh R, Sasaki J, Kurihara H, Suzuki K, Iida Y, Kawaoi A. Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. Cancer. 1992;70(6):1585-90. doi: 10.1002/1097-0142(19920915)70:6<1585::aid-cncr2820700623>3.0.co;2-z.

159. Sakorafas GH, Stafyla V, Kolettis T, Tolumis G, Kassaras G, Peros G. Microscopic papillary thyroid cancer as an incidental finding in patients treated surgically for presumably benign thyroid disease. J Postgrad Med. 2007;53(1):23-6. doi: 10.4103/0022-3859.30323.

160. Chrisoulidou A, Boudina M, Tzemailas A, Doumala E, Iliadou PK, Patakiouta F, i sur. Histological subtype is the most important determinant of survival in metastatic papillary thyroid cancer. Thyroid Res. 2011;4(1):12. doi: 10.1186/1756-6614-4-12.

161. Yan C, Huang M, Li X, Wang T, Ling R. Relationship between BRAF V600E and clinical features in papillary thyroid carcinoma. Endocr Connect. 2019;8(7):988-996. doi: 10.1530/EC-19-0246.

162. Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(12):4559-70. doi: 10.1210/jc.2012-2104.

163. Joo JY, Park JY, Yoon YH, Choi B, Kim JM, Jo YS, i sur. Prediction of occult central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma by preoperative BRAF analysis using fine-needle aspiration biopsy: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(11):3996-4003. doi: 10.1210/jc.2012-2444.

164. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of nodal and distant metastasis based on histologic varieties in differentiated carcinoma of the thyroid. Am J Surg. 1996;172(6):692-4. doi: 10.1016/s0002-9610(96)00310-8

165. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. Surgery. 1988;104(6):947-53.

166. Popadich A, Levin O, Lee JC, Smooke-Praw S, Ro K, Fazel M, i sur. A multicenter cohort study of total thyroidectomy and routine central lymph node dissection for cN0 papillary thyroid cancer. Surgery. 2011;150(6):1048-57. doi: 10.1016/j.surg.2011.09.003.

167. Guo K, Wang Z. Risk factors influencing the recurrence of papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(9):5393-403.

168. Hartl DM, Mamelle E, Borget I, Leboulleux S, Mirghani H, Schlumberger M. Influence of prophylactic neck dissection on rate of retreatment for papillary thyroid carcinoma. World J Surg. 2013;37(8):1951-8. doi: 10.1007/s00268-013-2089-3.

169. Liu J, Singh B, Tallini G, Carlson DL, Katabi N, Shaha A, i sur. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. Cancer. 2006;107(6):1255-64. doi: 10.1002/cncr.22138.

170. Scheumann GF, Gimm O, Wegener G, Hundeshagen H, Dralle H. Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in papillary thyroid cancer. World J Surg. 1994;18(4):559-67. doi: 10.1007/BF00353765.

171. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. Surgery. 1993;114(6):1050-7.

172. Thompson AM, Turner RM, Hayen A, Aniss A, Jalaty S, Learoyd DL, i sur. A preoperative nomogram for the prediction of ipsilateral central compartment lymph node metastases in papillary thyroid cancer. Thyroid. 2014;24(4):675-82. doi: 10.1089/thy.2013.0224.

173. Pai SI, Tufano RP. Reoperation for recurrent/persistent well-differentiated thyroid cancer. Otolaryngol Clin North Am. 2010;43(2):353-63, ix. doi: 10.1016/j.otc.2010.02.004.

174. Zaydfudim V, Feurer ID, Griffin MR, Phay JE. The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. Surgery. 2008;144(6):1070-7. doi: 10.1016/j.surg.2008.08.034.

175. Brose MS, Cabanillas ME, Cohen EE, Wirth LJ, Riehl T, Yue H, i sur. Vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-positive metastatic or unresectable papillary thyroid cancer refractory to radioactive iodine: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2016;17(9):1272-82. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30166-8.

176. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. Mayo Clin Proc. 1986;61(12):978-96. doi: 10.1016/s0025-6196(12)62641-x.

177. Shah JP, Loree TR, Dharker D, Strong EW, Begg C, Vlamis V. Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. Am J Surg. 1992;164(6):658-61. doi: 10.1016/s0002-9610(05)80729-9.

178. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis. Head Neck. 1996;18(2):127-32. doi: 10.1002/(SICI)1097-0347(199603/04)18:2<127::AID-HED3>3.0.CO;2-3.

10. ŽIVOTOPIS AUTORA

Irena Ivković rođena je 4. prosinca 1982. godine u Slavonskom Brodu (djevojačko prezime Makovac). Nakon završetka osnovne i srednje škole u rodnom gradu, upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2001. godine. Diplomirala je 2008. godine, a nakon završenog pripravničkog staža i položenog državnog ispita, od 2009. do 2011. godine radila je kao liječnik hitne medicine DZ-a Koprivničko-križevačke županije. 2011. godine započinje specijalizaciju iz otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata u Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata koju uspješno završava 2016. godine. Godine 2020. položila je subspecijalistički ispit iz plastične kirurgije glave i vrata.

Tijekom studija medicine, za vrijeme specijalizacije i subspecijalizacije, u više navrata boravila je na edukaciji u inozemstvu. Članica je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva za otorinolaringologiju, kirurgiju glave i vrata te aktivno sudjeluje u radu Hrvatskog društva za tumore glave i vrata kojeg je i član te Europskog društva za tumore glave i vrata (EHNS).

Autorica je brojnih kongresnih sažetaka, vodila je organizacijske odbore tečajeva i simpozija te je autorica niza znanstvenih radova.

Njezina trenutna pozicija je v.d. voditelja Dječjeg odjela Klinike za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC-a Zagreb, a uži fokus interesa u struci je dječja otorinolaringologija, minimalno invazivna kirurgija žlijezda slinovnica i kirurgija štitne žlijezde.