

Povezanost učestalosti BRAF V600E mutiranih alela sa stupnjem proširenosti papilarnog karcinoma štitnjače

Blažeković, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:236266>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Blažeković

**Povezanost učestalosti BRAF V600E
mutiranih alela sa stupnjem
proširenosti papilarnog karcinoma
štitnjače**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Blažeković

**Povezanost učestalosti BRAF V600E
mutiranih alela sa stupnjem
proširenosti papilarnog karcinoma
štitnjače**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Tomislav Jukić, izv. prof. dr. sc. Ivan Šamija

Zahvaljujem svojim mentorima, profesoru Tomislavu Jukiću te profesoru Ivanu Šamiji, na velikodušnoj potpori u provođenju ovoga istraživanja, na ukazanom povjerenju te svim savjetima koje su mi pružili. Zahvaljujem svima koji su mi pomogli tijekom istraživanja: prof. dr. sc. Maji Franceschi, doc. dr. sc. Tihani Regović-Džombeti, kolegama Matiji Romić, Mariji Bosak Butković i Roku Graniću kao i svim suradnicima iz laboratorija, prvenstveno mag. biochem. Josipi Periši. Hvala svim kolegama i prijateljima. Na kraju, ali najbitnije, zahvaljujem svojoj obitelji - roditeljima na cjeloživotnoj neizmjerne podršci, sestri za vrijeme provedeno u drugim galaksijama, mojoj supruzi Antoneli na znanstvenom doprinosu ovom istraživanju kao i beskrajnom strpljenju prema svom suprugu, i mojim dvjema kćerkama, Mili i Evi, koje su uljepšavale svaki dan pripreme ovog doktorskog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Tumori štitnjače.....	1
1.1.1 Dobro diferencirani karcinomi štitnjače.....	1
1.1.1.1. Epidemiologija dobro diferenciranih karcinoma štitnjače	1
1.1.1.2 Etiološki čimbenici u razvoju dobro diferenciranih karcinoma štitnjače	2
1.1.1.3. Patohistološka obilježja dobro diferenciranih karcinoma štitnjače	4
1.1.1.3.1 Patohistološka obilježja papilarnog karcinoma štitnjače.....	4
1.1.1.4. Dijagnostički postupci u obradi papilarnog karcinoma štitnjače	7
1.1.1.4.1. Ultrazvučni pregled štitnjače i vrata	7
1.1.1.4.2. Laboratorijska dijagnostika u oboljelih od papilarnog karcinoma štitnjače	8
1.1.1.4.3 Citološka punkcija štitnjače i suspektnih čvorova vrata.....	9
1.1.1.4.4. Scintigrafija štitnjače i cijelog tijela jodom 131	11
1.1.1.4.5. PET/CT kod papilarnog karcinoma štitnjače.....	12
1.1.1.5. Postoperativni postupci i prognostički čimbenici u bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače	13
1.2 Genske promjene u dobro diferenciranom karcinomu štitnjače.....	20
1.2.1 Genske promjene u papilarnom karcinomu štitnjače	20
1.2.1.1 Mutacija gena <i>BRAF</i>	23
1.2.1.1.1. Mutacija gena <i>BRAF</i> V600E u patogenezi papilarnog karcinoma štitnjače	26
2. HIPOTEZA.....	29
3. CILJEVI RADA	30
4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE	31
4.1 Ispitanici	31
4.2 Prikupljanje podataka i patohistoloških uzoraka	32
4.3 Histološka analiza primarnog tumora.....	32
4.4 Izdvajanje DNA i detekcija mutacije <i>BRAF</i> V600E	33
4.5 Određivanje mutiranog proteina <i>BRAF</i> V600E metodom imunohistokemije	35

4.6 Statističke metode u obradi podataka	35
5. REZULTATI	36
5.1 Heterogenost mutiranih alela <i>BRAF</i> V600E u primarnom tumoru	38
5.2. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> i udjela mutiranih alela <i>BRAF</i> s proširenošću bolesti	40
5.3. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> i učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> s kliničko patološkim karakteristikama bolesti	42
5.3.1. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> , učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> i proširenosti bolesti s veličinom tumora.....	42
5.3.2. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> i učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> s probojem kapsule štitnjače.....	45
5.3.3. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> mutacije i učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> s angioinvazijom tumora	47
5.3.4. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> i učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> s diseminacijom u štitnjači	49
5.3.5. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> i učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> sa širenjem primarnog tumora izvan štitnjače	51
5.3.6. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> i učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> s probojem kapsule limfnog čvora	53
5.4. Povezanost mutacije <i>BRAF</i> i učestalosti mutiranih alela <i>BRAF</i> s dobi i spolom ispitanika.....	55
5.5. Usporedba vrijednosti mutiranih alela <i>BRAF</i> V600E dobivenih metodom qPCR i metodom imunohistokemije	59
6. RASPRAVA.....	63
6.1 Heterogenost tumora s obzirom na udio mutiranih alela.....	64
6.2 Povezanost mutacije <i>BRAF</i> V600E i heterogenosti mutiranih alela s proširenosti papilarnog karcinoma štitnjače	66
6.3 Povezanost mutacije <i>BRAF</i> V600E i heterogenosti mutiranih alela gena <i>BRAF</i> s kliničkim i patohistološkim karakteristikama bolesti	69
6.4 Potvrda mutacije <i>BRAF</i> V600E na proteinskoj razini	72
6.5 Pristup kvantifikaciji mutiranih alela i mogući nedostaci metode	74
7. ZAKLJUČCI	76

8. SAŽETAK.....	77
9. SUMMARY	78
10. LITERATURA.....	79
11. ŽIVOTOPIS.....	95

POPIS OZNAKA I KRATICA

^{18}F -FDG	radioaktivnim fluorom obilježena glukoza (engl. 18F-fluorodeoxyglucose)
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	izotop tehnecija
AJCC/UICC	Američka združena komisija za rak/ Međunarodno udruženje protiv raka (engl. American Joint Committee on Cancer/ Union Internationale Contre Le Cancer)
AKT1	gen za protein kinazu AKT serin/treonin 1 (engl. AKT serine/threonine kinase 1)
ATA	Američko društvo za štitnjaču (engl. American Thyroid Association)
aTg	protutijelo na protein tireoglobulin
BRAF	protoonkogen B-RAF (engl. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)
CT	kompjutorizirana tomografija (engl. Computerized Tomography)
CTNNB1	gen za beta katenin 1 (engl. Catenin beta 1)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. Deoxyribonucleic Acid)
EGFR	receptor za epidermalni čimbenik rasta (engl. Epidermal Growth Factor Receptor)
EIF1AX	gen za čimbenik inicijacije translacije u eukariota (engl. Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A X-Linked)
ERK	izvanstaničnim signalom regulirane kinaze (engl. extracellular regulated MAP kinase)

ETA	Europsko društvo za štitnjaču (engl. European Thyroid Association)
FKŠ	folikularni karcinom štitnjače
FNA	biopsija tankom iglom (engl. Fine Needle Aspiration Biopsy)
FT4	tiroksin (engl. Free Thyroxine)
GTP	gvanosin-5-trifosfat (engl. Guanosine-5'-Triphosphate)
IGF-IR	receptor za inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. Insulin-Like Growth Factor I Receptor)
MAFG	transkripcijski čimbenik MafG (engl. Transcription Factor MafG)
MAPK	mitogenima aktivirana protein kinaza (engl. Mitogen-Activated Protein Kinase)
MLH1	gen za MutL Homolog 1, (engl. MutL Homolog 1)
MR	magnetska rezonanca (engl. MRI – Magnetic Resonance Imaging)
NIFTP	neinvazivna folikularna neoplazma s obilježjima jezgre nalik papilarnom karcinomu (engl. Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm With Papillary-like Nuclear Features)
PAX8- PPAR γ	onkoprotein nastao spajanjem PAX8–PPARG (engl. PFP: Pax-8–PPAR- γ Fusion Protein)
PET/CT	pozitronska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija (engl. Positron Emission Tomography/Computerized Tomography)
PI3K	fosfatidil-inozitol-3-kinaze (Phosphoinositide 3-Kinases)
PKŠ	papilarni karcinom štitnjače

PTEN	gen za sintezu homologa fosfataze i tenzina (engl. Phosphatase and Tensin Homolog)
qPCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RAS	gen za proteine Ras (engl. Rat Sarcoma Virus)
RET/PTC	rearanžman gena RET u papilarnom karcinomu štitnjače (engl. RET/Papillary Thyroid Carcinoma)
SPECT/CT	jednofotonska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija (engl. Single Photon Emission Tomography/Computerized Tomography)
TERT	gen za reverznu transkriptazu telomeraze (engl. Telomerase Reverse Transcriptase)
Tg	tireoglobulin
TP53	gen za tumorski protein P53 (engl. Tumor Protein p53)
TRH	tireotropin oslobađajući hormon (engl. Thyrotropin-Releasing Hormone)
TSH	tireotropin (engl. Thyroid Stimulating Hormone)
TSHR	gen za receptor tireotropin stimulirajućeg hormona (engl. Thyroid Stimulating Hormone Receptor)
UZV	ultrazvuk

1. UVOD

1.1 Tumori štitnjače

Štitnjača je endokrini organ čija je glavna funkcija regulacija metaboličke aktivnosti organizma. Tumori štitnjače su najčešći tumori endokrinološkog sustava i pojavljuju se u 30 do 50 % odrasle populacije [1]. Mogu biti dobroćudni (benigni) i zloćudni (maligni). Pokazano je da prosječni rizik za zloćudnost pojedinog čvora u štitnjači iznosi oko pet posto, neovisno o broju čvorova [2]. Vrsta tumora jedan je od najznačajnijih čimbenika u procjeni rizika smrtnosti za bolesnika. Stoga je određivanje patohistološke vrste tumora od izrazite važnosti u dijagnostičkom postupku i liječenju. Maligne tumore štitnjače možemo podijeliti u pet osnovnih skupina. Papilarni i folikularni tumori štitnjače su dobro diferencirani tumori, koji su se razvili iz folikularnog epitela. Najučestaliji su oblik i čine 84%, odnosno 11%, svih zloćudnih tumora štitnjače [3]. Prognoza je u oboljelih od papilarnog karcinoma štitnjače izrazito dobra, uz preživljenje od čak 93% kroz deset godina. Preživljenje se prvenstveno smanjuje zbog udaljene diseminacije bolesti koju nalazimo u jedan do četiri posto bolesnika, a tada je preživljenje u rasponu od 24-76%, kroz desetogodišnji period [4]. Osim toga, razlikujemo i skupinu slabo diferenciranih karcinoma štitnjače te anaplastični karcinom štitnjače, kao najagresivniji oblik tumora. U petoj skupini je medularni karcinom štitnjače koji, za razliku od ostalih navedenih, nije podrijetlom iz folikularnog epitela, nego parafolikularnih, C-stanica štitnjače. Pronalazak molekularnih biljega koji bi omogućili rano prepoznavanje dobro diferenciranih tumora štitnjača kojima je biološko ponašanje obilježeno širenjem bolesti, omogućio bi rano prepoznavanje ugroženih bolesnika. Proučavanje genskih promjena, naročito mutacija, povezanih s agresivnim biološkim ponašanjem tumora nastalih od folikularnih stanica štitnjače omogućit će bolje razumijevanje temeljnih molekularnih značajki koje određuju agresivnost karcinoma štitnjače [5,6].

1.1.1 Dobro diferencirani karcinomi štitnjače

1.1.1.1. Epidemiologija dobro diferenciranih karcinoma štitnjače

Karcinom štitnjače, kao najčešći tumor endokrinološkog sustava, predstavlja 11. najčešći karcinom u općoj populaciji te čini 3% svih novootkrivenih tumora u svijetu [7]. Posljednjih desetljeća je prisutan gotovo stalan porast incidencije karcinoma štitnjače [7].

Trend je vidljiv i u hrvatskoj populaciji. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Hrvatska se nalazi na četvrtom mjestu po dobno standardiziranoj stopi incidencije karcinoma štitnjače u Europi [7,8]. Incidencija karcinoma štitnjače je u žena tri do četiri puta veća u odnosu na muškarce, što je ujedno situacija i u Republici Hrvatskoj [8]. Karcinom štitnjače je u Hrvatskoj najčešći karcinom u osoba ženskog spola u dobi od 10 do 29 godina starosti [8].

Opisano povećanje incidencije, koje je u razvijenim zemljama svijeta poput SAD-a čak u trostrukom porastu, ne prati povećanje mortaliteta, koji je, prema dugogodišnjem praćenju, gotovo nepromijenjen [7]. Navedena situacija se može dijelom objasniti unapređenjem, ali i „prekomjernom“ uporabom ultrazvučnih pregleda (UZV) štitnjače [9,10]. Čak i slučaju populacija opterećenih čimbenicima rizika za karcinom štitnjače, kao što je povećana izloženost radioaktivnom jodu ^{131}I (^{131}I) u području Rusije, autori studije su, unatoč tome, otkrili da se porast incidencije može objasniti učestalim postupcima UZV probira kojim se otkivaju klinički neznčajni tumori [11]. Zemlja s najvećom poznatom incidencijom karcinoma štitnjače je Južna Koreja u kojoj je intenzivan porast incidencije koincidirao s uvođenjem Nacionalnog programa otkrivanja karcinoma štitnjače. Probir na nacionalnoj razini je doveo do epidemije novootkrivenih karcinoma štitnjače, bez pratećeg porasta mortaliteta, te zapravo prikazao „rezervoar“ subkliničkih karcinoma štitnjače, koji se tijekom životnog vijeka vjerojatno ne bi klinički manifestirali [12]. U skladu s ovime je i podatak istraživanja provedenog u Finskoj: u više od trećine obduciranih osoba prisutan je papilarni karcinom štitnjače (PKŠ), koji se nije manifestirao klinički [13]. Važno je napomenuti da se istraživanjima vezanim uz baze u kojima se nalaze podaci vezani uz dugogodišnje praćenje bolesnika s karcinomima štitnjače, povećanje incidencije povezuje s učestalom primjenom UZV-a i biopsije tankom iglom (FNA; engl. *Fine Needle Aspiration Biopsy*), kao i promijenjenim utjecajem čimbenika okoliša [3].

1.1.1.2 Etiološki čimbenici u razvoju dobro diferenciranih karcinoma štitnjače

Potvrđeni čimbenik, koji pridonosi razvoju karcinoma štitnjače, je izloženost ionizirajućem zračenju. Utjecaj ionizirajućeg zračenja na područje glave i vrata, kao i izloženost otvorenim izvorima zračenja, poput ^{131}I , obrnuto korelira s dobi bolesnika. Utjecaj je posebno izražen u periodu do 15 godina starosti, do kada je štitnjača

najpodložnija utjecaju ionizirajućeg zračenja i statistički značajno povećava rizik razvoja karcinoma štitnjače. Relativni rizik je više od sedam puta (7.7) veći za svaki grej apsorbirane doze [1,14]. Posebno je važno istaknuti radioosjetljivosti štitnjače u mladoj dobi, uzevši u obzir povećanje broja medicinskih dijagnostičkih postupaka i time primljene kumulativne doze zračenja za bolesnika. Procjenjuje se da je prosječna kumulativna doza za pojedinca porasla sa 0.54 mSv/godina na 3 mSv/godina u SAD-u, kroz posljednjih 25 godina [15].

Primijećeno je da se porast incidencije PKŠ ne može objasniti samo povećanim brojem dijagnostičkih postupaka [16]. Nedostatak joda u prehrani je opisan kao čimbenik u nastanku karcinoma štitnjače pri čemu nadoknada joda u prehrani ima zaštitnu ulogu [17]. U područjima s adekvatnim ili prekomjernim unosom joda prisutan je relativni porast PKŠ u odnosu na druge vrste karcinoma štitnjače, prvenstveno folikularni karcinom štitnjače (FKŠ), iako je sam mehanizam utjecaja joda zasada nerazjašnjen [18].

Pitanje utjecaja autoimune bolesti štitnjače, poput Hashimotovog tireoiditisa, na razvoj karcinoma štitnjače je opsežno istraženo [19–22]. Hashimotov tireoiditis je vrlo česta bolest kojoj je baza kronična limfocitna upala. Utjecaj kronične upale na razvoj tumora je dobro poznat [23]. Stimulirajući čimbenici razvoja tumora štitnjače su istovremena prisutnost povišenog tireotropina (TSH; *engl. Thyroid Stimulating Hormone*), kao stimulatora proliferacije tireocita, kao i prisustvo slobodnih kisikovih vrsta koje oštećuju sve biomolekule, uključujući i DNA (deoksiribonukleinska kiselina, *engl. Deoxyribonucleic Acid*) [22]. Opsežnom meta-analizom provedenih studija koje su istraživale utjecaj kroničnog tireoditisa pokazan je značajno povišen rizik za nastanak karcinoma štitnjače kao i karcinoma dojke, pluća i probavnog sustava [22]. Opisana je pozitivna povezanost autoimunih protutijela prisutnih kod Hashimoto tireoiditisa, prvenstveno protutijela na tireoglobulin i tireoidnu peroksidazu [22]. Posljednjih desetljeća ističe se utjecaj pušenja i pretilosti na razvoj karcinoma štitnjače [3,24–27]. Pretilost može pratiti i rezistenciju na inzulin, pojačanu sintezu inzulina te ekspresiju receptora za inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF-IR; *engl. Insulin-like Growth Factor I Receptor*) na stanicama tireocita, koji, ako je potaknut ligandima, stimulira njihovu proliferaciju [28]. Posredno, povećanje razine leptina dovodi do smanjenja aktivnosti enzima dejodinaze i produkcije trijodtironina, zbog čega se povećava produkcija tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH, *engl. Thyrotropin-Releasing Hormone*) i TSH,

koji također stimulatивно djeluju na tireocite [3,24]. Nasuprot tome, pokazan je utjecaj kontinuiranog pušenja na smanjenje rizika od karcinoma štitnjače u muškaraca, no bez statistički značajnog utjecaja u ženskoj populaciji [27]. Utjecaj ksenobiotika, poput pesticida i bisfenola A, kojima je stanovništvo sve više izloženo, može djelovati na štitnjaču u svojstvu karcinogena. Iako je pretpostavljen utjecaj polibromiranih difenil estera na abnormalnu proliferaciju tireocita, među 80000 poznatih korištenih kemijskih spojeva kojima je čovjek izložen još nije pokazana jasna povezanost s razvojem karcinoma štitnjače [1,24].

Istraživači koji su istraživali razloge porasta incidencije karcinoma štitnjače u posljednjim desetljećima pokazuju da je moguće procijeniti posredni učinak okolišnih čimbenika na razvoj karcinoma, praćenjem somatskih mutacija u stanicama transformiranih tireocita. Ustanovljen je porast točkastih mutacija u genima *BRAF* i *NRAS*, najvjerojatnije neizazvan zračenjem, u odnosu na broj rearanžmana gena *RET/PTC* koji su posljedica djelovanja ionizirajućeg zračenja [29]. Porast incidencije karcinoma štitnjače praćen je prvenstveno porastom papilarnog karcinoma štitnjače združenog s porastom mutacija u genu *BRAF*, što upućuje na utjecaj nepoznatih čimbenika okoline i/ili pretpostavljeni utjecaj joda u prehrani, što je opisano kao fenomen papilarizacije [30,31].

1.1.1.3. Patohistološka obilježja dobro diferenciranih karcinoma štitnjače

U skupini dobro diferenciranih karcinoma štitnjače nalaze se papilarni i folikularni karcinomi štitnjače koji nastaju iz folikularnog epitela. Dobro diferencirani karcinomi štitnjače čine više od 90 % svih karcinoma štitnjače [32].

1.1.1.3.1 Patohistološka obilježja papilarnog karcinoma štitnjače

PKŠ je najčešći karcinom štitnjače te čini više od 80% svih karcinoma štitnjače. Obuhvaća petnaest podvarijanti koje se razlikuju u odnosu na arhitekturu i citološka obilježja stanica. Stroma je fibrovaskularna, a može biti i kalcificirana. Nadalje, moguće su i cistične promjene u primarnom tumoru kao i u metastazama. Karakteristično je stvaranje papilarnih struktura unutar tumora te prisutnost folikularnih stanica s jezgrama koje izgledaju poput brušenog stakla. Podvarijante tumora posjeduju zajedničke karakteristične promjene jezgre, što podrazumijeva povećane i izdužene jezgre uz nakupljanje kromatina uz ovojnicu jezgre, zbog čega je središnji dio jezgre blijed [33].

Daljnje karakteristike tumorskih stanica PKŠ su intranuklearne pseudoinkluzije (citoplazmatske invaginacije) te pojava preklapanja jezgara. Mogu se naći, iako nisu karakteristična za karcinom štitnjače, i psamomska tjelešca, koja predstavljaju laminarne kalcificirane inkluzije u bazama papila [34].

PKŠ je često lokalno infiltrativan, nejasnih granica, a ponekad se nalazi unutar čahure. Širenje tumora unutar žlijezde često postoji kod postavljanja dijagnoze. Prvenstveno metastazira u regionalne limfne čvorove vrata dok je prisutstvo udaljenih metastaza rijedak događaj. Veći primarni PKŠ mogu probijati kapsulu štitnjače, pri čemu u rijetkim slučajevima dolazi i do infiltracije okolnog masnog tkiva, a moguća je i invazija u strukture vrata (dušnik, jednjak, mišići vrata, velike krvne žile).

Posebna skupina, koja se često izdvaja i prati u kontekstu procjene rizika od smrtnog ishoda, je papilarni mikrokarcinom; primarni PKŠ promjera ≤ 1 cm. Okultni PKŠ su česti te se mogu naći pri obdukcijama u približno 10 % osoba [35]. U pojedinim je studijama opisano postojanje okultnog PKŠ u nalazima obdukcija u čak do 35 % osoba od čega su 67% bili papilarni mikrokarcinomi [13]. Papilarni mikrokarcinom je tumor niskog rizika, stoga je predložen pristup aktivnog praćenja kako bi se izbjegla tireoidektomija i posljedično doživotno nadomjesno liječenje hormonima, a bez povećanog rizika smrtnosti ili recidiva u slučaju naknadno provedene tireoidektomije [36].

Česte podvarijante papilarnog karcinoma štitnjače

- 1- Folikularna podvarijanta papilarnog karcinoma štitnjače uključuje invazivnu podvarijantu, koja pokazuje infiltrativni rast, rizik od nastanka lokalnih metastaza, i opisanu *BRAF* mutaciju u 39% slučajeva [37]. Prema posljednjoj patohistološkoj klasifikaciji, postoji i inkapsulirana folikularna varijanta, koja je reklasificirana u neinvazivnu folikularnu neoplazmu s papilarnim obilježjima jezgre (NIFTP) [38]. Promjena histološki predstavlja kategoriju „borderline“ tumora, s vrlo niskim rizikom od recidiva (<1%), iako se zbog genetske heterogenosti prava priroda tumora se ne može sa sigurnošću odrediti [33].
- 2- Papilarni karcinom cilindričnih stanica je vrlo rijedak. Sastoji se od cilindričnih stanica sa pseudostratificiranim hiperkromatskim jezgrama te je

bez klasičnih obilježja PKŠ [33]. Predstavlja varijantu s povećanim rizikom od recidiva bolesti, kada nije inkapsuliran.

- 3- Varijanta *Hobnail* papilarnog karcinoma štitnjače čini oko 1% svih PKŠ. Prvi puta opisana 2004. godine [39]. Da bi se tumor razvrstao u skupinu „hobnail“, barem 30% stanica mora sadržavati hobnail karakteristike što podrazumijeva gubitak stanične polarnosti i svojstava kohezije. Genetske promjene uključuju mutacije gena *BRAF* i *TP53*. Ovaj tip tumora je klinički povezan s većim rizikom od lokalnog recidiva, pojavom udaljenih metastaza kao i metastaza u regionalne limfne čvorove [40].
- 4- Papilarni karcinom visokih stanica (engl. tall cell) je podvarijanta papilarnog karcinoma štitnjače, koja uz papilarni karcinom cilindričnih stanica i „hobnail“ varijantu ima agresivniji klinički tijek a čini tri do 19 posto svih PKŠ [32,41]. Stanice su izduljene (najmanje 30 % stanica ima dva do tri puta veću visinu od širine). Opisane su mutacije u genu *BRAF* V600E s učestalošću od 61% a mutacije u promotoru gena *TERT* (engl. Telomerase Reverse Transcriptase) u sedam posto slučajeva [42]. Nije osjetljiv na liječenje radioaktivnim jodom (¹³¹I). Zbog toga ima lošu prognozu.
- 5- Solidna podvarijanta PKŠ se identificira kada su ostale varijante isključene, a tumor se većinom sastoji od solidne komponente. Ova varijanta je značajno češće povezana s izloženošću ionizirajućem zračenju i učestalija je u djece i mladih osoba [43]. Stupanj agresivnosti ovog tipa papilarnog karcinoma štitnjače nije jednoznačno određen. Opisana je i manja učestalost mutacije gena *BRAF*, samo 10 % (u odnosu na 60 %, u slučaju klasičnog papilarnog karcinoma) [44].
- 6- Difuzno sklerozirajuća podvarijanta PKŠ najčešće za posljedicu ima uvećanu i difuzno promijenjenu štitnjaču. Češće je prisutna u mlađih žena. Čini dva do šest posto svih PKŠ [41]. Opisani su rearanžmani *RET/PTC* kao pokretačke mutacije ovog tipa tumora. Najčešće su prisutni rearanžmani *RET/PTC1* i *RET/PTC3*, koji čine više od 90% svih rearanžmana *RET/PTC* [45]. Ovaj tip tumora je povezan s udaljenim metastazama, metastazama u regionalne limfne čvorove te širenjem izvan štitnjače. Unatoč tome, mortalitet nije bitno različit u odnosu na klasičnu varijantu papilarnog karcinoma, što se objašnjava

nastajanjem tumora u ranijoj životnoj dobi koja pozitivno djeluje na preživljenje usprkos češćim recidivima bolesti [33]

1.1.1.4. Dijagnostički postupci u obradi papilarnog karcinoma štitnjače

1.1.1.4.1. Ultrazvučni pregled štitnjače i vrata

U sklopu obrade sumnjivog čvora u štitnjači rutinski se primjenjuje pregled ultrazvukom (UZV). Postupak je neinvazivan i bezbolan, bez popratnog ionizirajućeg zračenja. UZV-pregled je brz i učinkovit, no znatno ovisan i ograničen subjektivnom interpretacijom i iskustvom liječnika. Današnjim ultrazvučnim aparatima mogu se detektirati čvorovi veličine već od 1 mm. Ipak, zbog visoke prevalencije benignih čvorova štitnjače, rutinski se probir u općoj populaciji ne preporučuje.

Pregled ultrazvukom indiciran je u bolesnika s opipljivim čvorom ili u slučaju potrebe procjene karakteristika čvora koji je otkriven drugim dijagnostičkim postupcima. Smjernice Američkog društva za štitnjaču (engl. American Thyroid Association) i Europskog društva za štitnjaču (engl. European Thyroid Association) naglašavaju važnost prepoznavanja nepovoljnih UZV obilježja čvora u štitnjači koji zahtijevaju daljnju obradu [32,46]. Karakteristike čvora koje imaju visoku pozitivnu prediktivnu vrijednost u prepoznavanju zloćudne promjene su: postojanje mikrokalcifikata, hipoehogenost čvora, nepravilni rubovi, pojačana prokrvljenost vidljiva metodom obojenog Dopplera, infiltracija izvan kontura štitnjače te anteroposteriorni promjer veći od lateromedijalnog. Prilikom postavljanja sumnje na maligni potencijal čvora radi se citološka punkcija pod kontrolom UZV. UZV-metodom je također u moguće prikazati i patološki promijenjene limfne čvorove na vratu.

Svim bolesnicima u kojih je citološkom punkcijom postavljena sumnja na karcinom štitnjače, prije operativnog zahvata (totalne ili parcijalne tireoidektomije) preporučuje se učiniti predoperativni UZV vrata kako bi se procijenila lokoregionalna proširenosti bolesti i eventualna potreba za disekcijom, u slučaju da se bolest proširila lokalno.

Postoperativno, UZV se koristi za redovite kontrolne preglede bolesnika. Pregledom je omogućeno praćenje promjena u ležištu štitnjače, što uključuje prepoznavanje recidiva bolesti ili postojanja ostatnog tkiva štitnjače. Također omogućuje pregled područja vrata, koji je najčešće mjesto širenja PKŠ limfom.

1.1.1.4.2. Laboratorijska dijagnostika u oboljelih od papilarnog karcinoma štitnjače

U svrhu dijagnostike PKŠ koristi se UZV štitnjače, scintigrafija štitnjače te FNA. Određivanje hormonskog statusa, i vrijednosti tireoglobulina, korisno je u kliničkom praćenju nakon odstranjenja štitnjače i karcinoma, ali ne i u otkrivanju bolesti.

U slučaju potvrde karcinoma štitnjače, te po učinjenom odstranjenju štitnjače, određuje se vrijednost TSH kako bi se procijenila mogućnost provedbe liječenja radiojodom. Smatra se da je vrijednosti TSH iznad 30 mIU/mL potrebna za uspješnu stimulaciju tireocita štitnjače kao i za nakupljanje ^{131}I u stanicama tumora [32]. Postoperativno se provodi i kontrola razine kalcija radi moguće jatrogene hipokalcemije i potrebe za davanjem kalcija. Kontrolnim pregledima se redovito prate vrijednosti TSH i tiroksina (FT4, engl. *Free Thyroxine*) zbog nadomjesnog ili suprimirajućeg liječenja L-tiroksinom, ovisno o stupnju rizika povrata bolesti.

Nakon tireoidektomije zbog papilarnog karcinoma štitnjače bitno je redovito praćenje vrijednosti tireoglobulina (Tg) i protutijela na tireoglobulin (aTg). Ovi pokazatelji služe za procjenu uspješnosti liječenja te otkrivanja povrata bolesti. Tireoglobulin je specifičan tumorski biljeg, podrijetlom od tireocita. Nije koristan u prijeoperacijskoj dijagnostici zbog toga što ga izlučuju i zdravi tireociti. Nakon potpunog odstranjenja zdrave štitnjače i ablacije ostatnog tkiva štitnjače pomoću ^{131}I koristi se s visokom specifičnošću i osjetljivošću u procjeni recidiva karcinoma. Vrijednost Tg se određuje zajedno s vrijednošću aTg, zbog toga što povišene vrijednosti aTg mogu činiti vrijednost Tg nepouzdanom time što negativno djeluju na osjetljivost imunometrijskih testova za Tg [47]. Samostalno povišenje aTg se također može smatrati surogat-biljekom u praćenju karcinoma štitnjače [32,47]. Laboratorijsko određivanje navedenih vrijednosti može se izvesti u stanju stimulacije uz visok TSH, kada je bolesnik bez nadomjesnog liječenja L-tiroksinom, uz primjenu rekombinantnog TSH čovjeka (rhTSH), ili bez stimulacije, uz liječenje L-tiroksinom. Izravna usporedba tumorskih biljega može se provoditi samo u stanjima jednakog hormonskog statusa, što podrazumijeva ili stanje tijekom dvaju razdoblja korištenja nadomjesnog liječenja levotiroksinom, ili tijekom dvaju razdoblja stimuliranog TSH bez prisutnog nadomjesnog liječenja. U svrhu usporedivosti nalaza kontrolnih onkoloških obrada bitno je provoditi analizu u jednakom hormonskom statusu kao i istim analitičkim metodama. Analiza vrijednosti Tg uz

stimulaciju TSH je osjetljivija u otkrivanju minimalnog ostatnog tkiva ili povrata bolesti u odnosu na analizu Tg u stanju hormonskog nadomjesnog liječenja [48]. Važno je naglasiti da je značaj Tg i aTg visok u dobro diferenciranom karcinomu štitnjače kao što je PKŠ. Ako postoji izrazita dediferencijacija u određenim slučajevima progresije bolesti biljeg gubi svoju vrijednost, zbog toga što dediferencirani tireociti ponekad gube mogućnost sinteze Tg.

1.1.1.4.3 Citološka punkcija štitnjače i suspektih čvorova vrata

Suspektni čvor u štitnjači može se otkriti vizualno i palpacijski, scintigrafijom štitnjače u slučaju postojanja hipofunkcionalnih ili nefunkcionalnih čvorova, UZV-pregledom ili kao slučajan nalaz drugim slikovnim metodama poput CT-a (kompjutorizirana tomografija) ili MR-a (magnetska rezonanca). Nakon učinjenog UZV-pregleda, u slučaju postojanja čvora štitnjače suspektih obilježja, potrebno je učiniti citološku punkciju čvora pod kontrolom UZV. Citološka punkcija se, ovisno o UZV obilježjima čvora, provodi u slučaju promjera čvora većeg (ili jednakog) od 1 cm. Ukoliko je dostupan podatak o pozitivnoj obiteljskoj anamnezi, zračenju glave i vrata u djetinjstvu ili u situaciji slučajnog nalaza pojačanog metabolizma čvora primjenom 18FDG-PET (engl. 18F-fluorodeoxyglucose, pozitronska emisijska tomografija) može se učiniti punkcija i čvorova manjih od 1 cm [32].

Svrha citološke punkcije je razlikovati benigne čvorove od onih za koje je potrebna kirurška intervencija u smislu lobektomije ili totalne tireoidektomije. Uspostavljen je standardizirani i kategorizirani sustav izvještavanja o nalazima citološke punkcije čvorova štitnjače pod nazivom Bethesda klasifikacija [49]. Prema navedenoj podijeli, postoji šest kategorija rezultata:

1. **tehnički nezadovoljavajući uzorak** je najčešće posljedica aspiracije cističnog sadržaja ili krvi. U ovakvim slučajevima je potrebno ponoviti citološku punkciju.
2. **benigna promjena** je nalaz koji opisuje benigne folikularne čvorove, Hashimotov ili granulomatozni tireoiditis. Ove promjene ne zahtjevaju kiruršku intervenciju te nose minimalan rizik karcinoma (0- 3%).
3. **atipija neodređenog značaja** opisuje uzorak u kojem karakteristike stanice ne omogućuju razlikovanje benignih i malignih tvorbi. U ovakvim se slučajevima

preporučuje se ponavljanje citološke punkcije, s obzirom na to da rizik za postojanje malignog čvora iznosi 5-15% [49].

4. folikularna neoplazma ili sumnja na folikularnu neoplazmu - citološkom punkcijom ne može se razlučiti benigni folikularni adenom od folikularnog karcinoma, zbog toga što je kriterij za njihovo razlikovanje proboj kapsule i angioinvazija. Stoga je u ovom slučaju preporučena lobektomija radi analize postojanja proboja kapsule i angioinvazije tumora. Rizik za malignost iznosi 15-30 %.

5. sumnja na zloćudni proces opisuje čvorove koji su izrazito sumnjivi na malignost, ali bez svih karakteristika nužnih za definitivnu dijagnozu. Preporučuje se totalna tireoidektomija. Rizik za malignost iznosi 60-75% [49].

6. zloćudni proces - vidljive su sve karakteristike malignog čvora; potrebna je totalna tireoidektomija. Rizik za malignost je 97-99 % [49].

U sklopu klasifikacije posebno mjesto ima kategorija „neodređeni značaj“, koji nosi značajan rizik za malignu bolest. Priroda čvora se često ne može razjasniti, niti ponovljenom citološkom punkcijom. Kako bi se povećala osjetljivost i specifičnost pretrage istraživana je i analiza molekularnih biljega u uzorcima dobivenim citološkom punkcijom. Najčešća mutacija PKŠ je mutacija gena *BRAF*. Iako samostalna analiza *BRAF* u uzorcima FNA ima visoku specifičnost (99%), osjetljivost je niska. Zbog toga je moguće dobiti lažno negativne rezultate. U cilju povećanja osjetljivosti, uvedeni su paneli koji se najčešće sastoje od određivanja mutacija sljedećih gena: *BRAF*, *TERT*, *RAS* (*NRAS*, *HRAS*, *KRAS*), *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPAR γ* [32,50]. Također, opisane su i sljedeće genske promjene, koje su sada uključene u komercijalne panele poput mutacija u genima *TP53*, *AKT1*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TSHR* i *EIF1AX* [51]. Navedeni panel u bolesnika s citološkim nalazom atipije neodređenog značaja ima osjetljivost od 91% te specifičnost od 92% [51]. Prednost molekularnog testiranja je što u konačnici omogućuje selekciju bolesnika kojima je potreban operativni zahvat. Ujedno omogućuje procjenu rizika od trajne bolesti i recidiva u slučaju kasnije učinjene tireoidektomije, što koristi bolesnicima u izboru aktivnog praćenja papilarnog mikrokarcinoma koji se još nisu odlučili na operativni zahvat.

Citološka punkcija je od velikog značaja nakon učinjene tireoidektomije, tijekom praćenja bolesnika. U slučaju postojanja suspektnog čvora u ležištu štitnjače, kao i lezije ili promijenjenog limfnog čvora u području vrata potrebno je učiniti citološku punkciju

uz određivanje Tg u punktatu. Tg je, u ovom slučaju, dodatni biljeg u citološkoj analizi, jer se nalazi jedino kao produkt stanica štitnjače ili karcinoma štitnjače te stoga ukazuje na ostatak štitnjače ili recidiv.

1.1.1.4.4. Scintigrafija štitnjače i cijelog tijela jodom ^{131}I

Scintigrafija štitnjače je nuklearno-medicinska slikovna dijagnostička metoda koja se koristi u svrhu procjene veličine, položaja, i funkcije tkiva štitnjače. Provodi se izotopom tehnecija ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ili radioaktivnim jodom, najčešće s izotopom ^{131}I . Scintigrafija štitnjače omogućava procjenu funkcije suspektih čvorova te usmjerava na potrebu za citološkom punkcijom. U slučaju hiperfunkcionalnog čvora štitnjače, smatra se da je rizik maligne bolesti manji od 1% te se stoga citološka punkcija ne preporučuje. U slučaju postojanja hipofunkcionalnog ili afunkcionalnog čvora preporučuje se citološka punkcija zbog toga što je rizik za malignosti do 15% [52].

Nakon tireoidektomije zbog karcinoma štitnjače provodi se ablacija ostatnog tkiva štitnjače. Time se ujedno uklanjaju moguća mikrožarišta tumorskih stanica te omogućuje daljnje kliničko praćenje bolesnika, mjerenjem vrijednosti tireoglobulina i provođenjem scintigrafije ^{131}I [32]. Scintigrafija cijelog tijela omogućava procjenu diseminacije bolesti ili pojave recidiva. Dobro diferencirani karcinomi štitnjače su tireocitnog podrijetla. Na staničnoj membrani imaju ispoljen suprijenosnik Na/I, zbog čega imaju mogućnost akumulacije joda. Scintigrafija cijelog tijela provodi se pomoću radiojoda koji se nakuplja istim mehanizmom. Stanice PKŠ su, kao i stanice štitnjače, osjetljive na stimulaciju s TSH te se postoperativna scintigrafija provodi u stanju stimulacije, kako bi se dodatno aktivirao Na/I suprijenosni mehanizam te povećala osjetljivost za otkrivanje ostatnog tkiva ili diseminirane bolesti. Također, nakon operativnog zahvata, a prije scintigrafije, bitno je provođenje dijete sa smanjenim unosom joda kako bi se omogućila bolja akumulacija radiojoda prilikom pretrage. U današnjoj kliničkoj praksi scintigrafija nije rutinski indicirana prije liječenja ^{131}I zbog mogućeg fenomena ošamućenja (engl. *stunning*). Ošamućenje podrazumijeva smanjenje akumulaciju terapijske doze ^{131}I u stanicama tkiva štitnjače i tumora štitnjače zbog prethodnog djelovanja beta ionizirajućeg zračenja na stanice tijekom primjene dijagnostičke doze ^{131}I . Na staničnim kulturama pokazano je smanjenje sinteze mRNA i posljedično smanjene sinteze proteina nužnih za izgradnju Na/I suprijenosnika na

staničnoj membrani tireocita, nakon što je stanica izložena ionizirajućem zračenju [53]. Ustanovljeno je da nakon trećeg dana od primitka dijagnostičke doze dolazi do značajnog pada sinteze mRNA. Stoga je upotreba terapijske doze moguća unutar tri dana ili tek nakon dva tjedna, od dijagnostičkog postupka [54]. Druga opcija je korištenje radiojoda I-123 kako bi se smanjio učinak ošamućenja. Njegovo korištenje povezano je s bržim oporavkom, ali i brzim nastankom ošamućenja, čak unutar jednog dana od primjene dijagnostičke doze [55]. Uzevši u obzir sve navedeno, te mogući utjecaj na ablacijsku uspješnost terapijske doze ^{131}I , predablacijska scintigrafija se uglavnom koristi u slučajevima kada je potrebno procijeniti adekvatan opseg operacijskog zahvata ili kada je upitna doza radiojoda koja se planira primijeniti. Bitno je naglasiti da nakupljanje radiojoda u metastazama karcinoma štitnjače predstavlja pozitivan prognostički znak koji upućuje na adekvatno nakupljanje terapijske doze te isključuje dediferencijaciju tumora. Nakon što bolesnik primi terapijsku dozu ^{131}I provodi se naredna scintigrafija koja je, zbog veće primijenjene doze ^{131}I u sklopu liječenja, znatno osjetljivija u prikazu proširenosti bolesti [32]. U svrhu točnije procjene proširenosti bolesti, pretraga se može nadopuniti i SPECT/CT-om. (jednofotonska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija, engl. *Single Photon Emission Tomography/Computerized Tomography*).

1.1.1.4.5. PET/CT kod papilarnog karcinoma štitnjače

PET/CT (pozitronska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija engl. *Positron Emission Tomography/Computerized Tomography*) je nuklearno-medicinski slikovni dijagnostički postupak koji omogućuje morfološku i funkcionalnu analizu metaboličke aktivnosti tkiva korištenjem analoga glukoze [18F]FDG . [18F]FDG ulazi u stanicu putem glukoznog transportera (GLUT) procesom olakšane difuzije te poput glukoze slijedi proces fosforilacije heksokinazom [56]. U stanicama tumora postoji pojačana ekspresija glukoznog transportera i heksokinaze zbog povećane potrošnje energije. FDG-6-fosfat, u odnosu na glukoza-6-fosfat, ne može sudjelovati u daljnjim metaboličkim procesima, oksidativnoj fosforilaciji i/ili glikolizi, a ne može niti jednostavno izaći iz stanice zbog toga što stanice tumora imaju nisku razinu glukoza-6-fosfataze koja je potrebna za defosforilaciju i izlazak iz stanice. Zbog navedenog, FDG-6-fosfat se pojačano nakuplja u stanici, što omogućuje oslikavanje tumorskih stanica upotrebom gama zraka nastalih anihilacijom pozitrona emitiranog iz 18F koji je u sastavu [18F]FDG.

S obzirom na to da se [18F]FDG PET/CT koristi u dijagnostici i praćenju mnogih tumora, u 1-2 % nalaza se opisuje pojačan metabolizam analoga glukoze u tkivu štitnjače. U ovakvim slučajevima je potrebna daljnja obrada i potencijalno ciljana citološka punkciju pod kontrolom UZV, zbog toga što približno trećina [18F]FDG PET/CT pozitivnih čvorova štitnjače može biti zloćudna [57].

Nakon učinjene tireoidektomije zbog PKŠ, metoda izbora za otkrivanje ostatnog tkiva i mogućih metastaza je scintigrafija ^{131}I jer je PKŠ dobro diferencirani tumor koji ima održanu funkciju sinteze Tg i Na/I suprijenosnika za akumulaciju joda. Prilikom dediferencijacije prvenstveno dolazi do gubitka sposobnosti akumulacije joda prije gubitka mogućnosti sinteze Tg te će se pacijent prezentirati s povišenim tumorskim markerom Tg, a bez jasnog prikaza primjenom scintigrafije ^{131}I . Ako tijekom bolesti i liječenja postoji sumnja na povrat bolesti, a bez vidljivih metastaza na scintigrafiji ^{131}I , preporučuje se [18F]FDG PET/CT. Promjena vidljiva na [18F]FDG PET/CT potvrđuje dediferencijaciju i ukazuje na lošiji ishod bolesti zbog otpornosti na liječenje radiojodom.

1.1.1.5. Postoperativni postupci i prognostički čimbenici u bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače

Citološki postavljena sumnja na PKŠ je indikacija za totalnu tireoidektomiju. Ukoliko se predoperativnom obradom posumnja na postojanje regionalnih metastaza na vratu zahvat uključuje i selektivnu disekciju područja vrata [58].

Nakon provedenog operativnog zahvata provodi se liječenje radiojodom kako bi se postigla ablacija ostatnog tkiva štitnjače i uništila moguća mikrožarišta neoplastičnih stanica te time spriječila mogućnost recidiva. U slučaju uspješne ablacije, vrijednost Tg ne mogu se izmjeriti. Primjenjena doza ^{131}I ovisi karakteristikama tumora i proširenosti bolesti što zajedno određuje stupanj rizika od recidiva za oboljele od PKŠ. Jedino u bolesnika s vrlo niskim rizikom za recidiv, s mikrokarcinomom ograničenim na štitnjaču te bez znakova diseminacije nije nužno provesti liječenje radiojodom. No, ni istaknuta društva koja propisuju smjernice za bolesti štitnjače poput Američkog društva za štitnjaču, Europskog udruženja za nuklearnu medicinu te Europskog društva za štitnjaču i dalje nemaju usuglašen stav o liječenju radiojodom u bolesnika s niskim rizikom za recidiv [59]. Nakon liječenja radiojodom praćenje bolesti obuhvaća praćenje tumorskih biljega Tg i aTg, UZV vrata te scintigrafiju cijelog tijela korištenjem ^{131}I .

Suvremene smjernice za praćenje i liječenje bolesnika oboljelih od PKŠ temelje se na konvencionalnim čimbenicima u prognostičkoj klasifikaciji bolesnika. Ovo uključuje patohistološki tip i veličinu tumora, infiltraciju kapsule štitnjače, lokalne i udaljene metastaze, multifokalnost, vaskularnu invaziju te dob. Trenutno korišteni sustavi klasifikacije bolesnika u određene rizične skupine uključuju i genske promjene: mutaciju V600E gena *BRAF* i mutaciju gena *TERT* u području promotora [32].

Jedan od najčešće korištenih sustava stupnjevanja karcinoma štitnjače je TNM-sustav (engl. *Tumour-Node-Metastasis*) prikazan u Tablici 1 [60]. Osim patohistoloških karakteristika tumora (veličina, širenje izvan štitnjače, invazija struktura vrata), postojanja lokalnih i udaljenih metastaza, uzima u obzir i dob bolesnika. Stoga se svi bolesnici mlađi od 55 godina razvrstavaju u stadij bolesti I ili II, ovisno o odsustvu (stadij I) ili postojanju udaljenih metastaza (stadij II). Samo bolesnici stariji od 55 godina mogu biti razvrstani skupine u III i IV (Tablica 2).

Tablica 1. TNM - klasifikacija dobro diferenciranih karcinoma štitnjače prema AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer/ Union Internationale Contre Le Cancer, 8. izdanje, 2016. godine) [60]

Tx	Veličina primarnog tumora ne može se procijeniti
T0	nema znakova primarnog tumora
T1a	tumor ≤ 1 cm, ograničen na štitnjaču
T1b	tumor > 1 cm, ali ≤ 2 cm u najvećem promjeru, ograničen na štitnjaču
T2	tumor > 2 cm, ali ≤ 4 cm u najvećem promjeru, ograničen na štitnjaču
T3	tumor > 4 cm u najvećem promjeru, ograničen na štitnjaču ili proširen u mišiće vrata
T3a	tumor > 4 cm u najvećem promjeru, ograničen na štitnjaču
T3b	Tumor bilo koje veličine koji širenjem izvan štitnjače invadira samo mišiće vrata (sternohioidni, sternotiroidni, omohioidni, tirohioidni)
T4	Širenje izvan štitnjače invadira ostale strukture vrata
T4a	tumor bilo koje veličine koji invadirasupkutana meka tkiva, grkljan, dušnik, jednjak ili povratni laringealniživac
T4b	tumor bilo koje veličine koji invadira prevertebralnu fasciju ili okružuje karotidnu arteriju ili medijastinalne krvne žile
Nx	Postojanje regionalnih limfnih čvorova ne može se procijeniti
N0	Bez dokaza metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N0a	Jedan ili više citološki ili histološki potvrđenih benignih limfnih čvorova
N0b	Bez radioloških ili kliničkih dokaza lokoregionalnih limfnih metastaza
N1a	metastaze u limfnim čvorovima regije VI i VII (pretrahealni, paratrahealni iprelaringealni/delfijski limfni čvorovi). Uni ili bilateralno.
N1b	metastaze u unilateralnim, bilateralnim ili kontralateralnim vratnim regijama (regija I, II, III, IV ili V) ili retrofaringealnim limfnim čvorovima
M0	nema udaljenih metastaza
M1	prisutne udaljene metastaze

Tablica 2. TNM klasifikacija stadija bolesti dobro diferenciranog karcinoma štitnjače prema AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer/ Union Internationale Contre Le Cancer, 8. izdanje, 2016.) [60]

T	N	M	DOB	STADIJ
Bilo koji T	Bilo koji N	M0	Mlađi od 55 godina	I
Bilo koji T	Bilo koji N	M1	Mlađi od 55 godina	II
T1	N0/Nx	M0	55 godina ili stariji	I
T1	N1	M0	55 godina ili stariji	II
T2	N0/Nx	M0	55 godina ili stariji	I
T2	N1	M0	55 godina ili stariji	II
T3a/T3b	Bilo koji N	M0	55 godina ili stariji	II
T4a	Bilo koji N	M0	55 godina ili stariji	III
T4b	Bilo koji N	M0	55 godina ili stariji	IVa
Bilo koji T	Bilo koji N	M1	55 godina ili stariji	IVb

U odnosu na navedene TNM-klasifikacije kojima se stadiji bolesti definiraju ovisno o riziku od smrti, u kliničkoj praksi se koristi i klasifikacija u odnosu na rizik od perzistentne bolesti ili recidiva usvojen od strane Američkog društva za štitnjaču (ATA, American Thyroid Association). Sustav koristi patohistološke karakteristike tumora, no i podatke dobivene obradom nakon prvog provedenog liječenja radiojodom. Usto, uključuje i status mutacije gena *BRAF* i *TERT*. Bolesnici su podjeljeni u tri skupine: nizak ($\leq 5\%$), srednji (6%–20%) i visok (>20%) rizik [32] (Tablica 3).

Tablica 3. ATA (American Thyroid Association) sustav stratifikacije rizika papilarnog karcinoma štitnjače od perzistente bolesti ili recidiva [32]

<p>ATA-niskorizični (sa svime navedenim):</p> <ul style="list-style-type: none">- potpuna resekcija makroskopskog tumora- bez tumorske invazije u lokoregionalna tkiva i bez lokalnih metastaza- klinički N0 ili patohistološki N1 (<5 mikrometastaza , sve manje od 2 mm)- bez udaljenih metastaza i vaskularne invazije- bez histološki agresivnih varijanti PKŠ- ako je primijenjeno liječenje ¹³¹I, bez scintigrafski vidljivih metastatskih sjela izvan ležišta štitnjače na prvoj postterapijskoj radiojodnoj scintigrafiji- <i>BRAF</i> V600E mutirani PKŠ; tumor <1cm
<p>ATA-srednjerizični (s barem jednom od navedenih karakteristika)</p> <ul style="list-style-type: none">- mikroskopska invazija u peritiroidna meka tkiva- postojanje simptoma vezanih uz tumor- tumor u štitnjači manji od 4 cm, s <i>BRAF</i> V600E mutacijom (ako je poznato)- agresivni histološki tip- vaskularna invazija- multifokalni papilarni mikrokarcinom sa širenjem izvan štitnjače i poznatom <i>BRAF</i> V600E mutacijom- klinički N1 ili patohistološki N1 (>5 zahvaćenih limfnih čvorova, svi manji od 3 cm)- scintigrafski vidljiv metastatski fokus nakupljanja ¹³¹I na vratu tokom prve postterapijske scintigrafije cijelog tijela
<p>ATA-visokorizični (s barem jednom od navedenih karakteristika)</p> <ul style="list-style-type: none">- makroskopska invazija peritiroidnog mekog tkiva- patohistološki N1 bolest: jedna ili više metastaza >3 cm- ekстранodularna ekstenzija- istovremena <i>BRAF</i> V600E i <i>TERT</i> mutacija- postoperativni serumski Tg (upućuje na postojanje udaljenih metastaza)- nepotpuna resekcija tumora- udaljene metastaze

Nakon učinjene tireoidektomije te nakon tretmana s radiojodom u bolesnika se provodi procjena odgovora na liječenje uzimajući u obzir nalaze scintigrafije pomoću ^{131}I , UZV vrata te vrijednosti Tg i aTg u serumu (Tablica 4). Ovisno o odgovoru na liječenje, planira se daljnje liječenje radiojodom, razina TSH supresije ili nadomjesno liječenje levotiroksinom, kao i sljedeće kontrole.

Klinički značaj metastaza u lokalne limfne čvorove još uvijek nije potpuno jasan. Dok pojedine studije povezuju ove metastaze samo s ponovnom pojavom bolesti, ali ne i preživljenjem, jedna opsežna studija s uključenih 203 bolesnika s papilarnim mikrokarcinomom povezala je prisutnost metastaza u lokalnim limfnim čvorovima s 11 puta većom stopom udaljenih metastaza [61]. Preporučeno liječenje za lokoregionalnu bolest je kirurško liječenje odstranjenjem lokalnih metastaza, odnosno metastaza u limfne čvorove područja vrata. Resekcija velikih, klinički značajnih lokoregionalnih metastaza, često je korisna za bolesnika, iako je nejasno da li je reoperacija u odnosu na ponovljeno liječenje ^{131}I bolji izbor kod manjih lokalnih recidiva. Udaljene metastaze su izuzetno rijetke, no, ukoliko su prisutne, desetogodišnja stopa preživljenja je svega 50% [62]. U dijagnostičkom se postupku citološka dijagnoza upotpunjuje s istodobnim mjerenjem Tg u aspiratu sumnjivih čvorova, kako bi se potvrdila zloćudnost. No, Tg nije pokazatelj agresivnosti tumora i metastatskog potencijala, nego samo trenutnog stanja bolesti. Stoga bi analiza potencijalnih mutacija u bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače mogla značajno poboljšati postoperativno praćenje bolesnika.

Tablica 4. Klasifikacija bolesnika s dobro diferenciranim karcinomom štitnjače s obzirom na odgovor na liječenje

Odličan odgovor <ul style="list-style-type: none">- negativan nalaz slikovne dijagnostike, uredan nalaz aTg i Tg <0.2 ng/ml ili stimulirani Tg <1 ng/ml
Biokemijski nepotpun odgovor <ul style="list-style-type: none">- negativan nalaz slikovne dijagnostike, Tg \geq1 ng/ml ili stimulirani Tg \geq10 ng/ml ili rastuće vrijednosti aTg
Slikovnim parametrima nepotpuni odgovor <ul style="list-style-type: none">- slikovnim dijagnostičkim metodama vidljivi znakovi bolesti (neovisno o vrijednosti Tg i aTg)
Neodređen odgovor <ul style="list-style-type: none">- nespecifični nalazi slikovne dijagnostike ili- slabo nakupljanje ^{131}I u ležištu štitnjače tijekom scintigrafije cijelog tijela ili- Tg 0.2–1 ng/ml ili stimulirani Tg 1–10 ng/ml i aTg stabilan ili u padu u bolesnika bez znakova bolesti slikovnim dijagnostičkim metodama

1.2 Genske promjene u dobro diferenciranom karcinomu štitnjače

Dobro diferencirani tumori štitnjače, prema standardnom prihvaćenom modelu onkogeneze, nastaju postupnom zloćudnom preobrazbom folikularnih stanica štitnjače [63]. Iako je zloćudna preobrazba postupan, višestupnjeviti proces, smatra se da je karcinom štitnjače relativno jednostavan, u smislu genskih promjena [64]. Najčešće mutacije odgovorne za nastanak PKŠ, poput mutacija u genima *BRAF*, *RAS* i *RET/PTC* prisutne su u približno 70% svih karcinoma štitnjače [65]. Usto, uključujući i sve ostale poznate pokretačke mutacije gena odgovornih za nastanak PKŠ, iz rezultata The Cancer Genome Atlas (TCGA) projekta koji uključuje opsežne multiplatformske analize 496 uzoraka PKŠ može se pretpostaviti da su pokretačke mutacije prisutne u čak 96,5 % svih karcinoma štitnjače [6]. Posljedica djelovanja tih mutacija je ubrzano dijeljenja stanica koje omogućavaju komparativnu prednost u rastu tumorskog tkiva u odnosu na normalno tkivo štitnjače. Najčešće genske promjene u podlozi većine papilarnih karcinoma štitnjače uključuju mutacije u genima *BRAF* i *RAS* koje dovode do poremećaja regulacije signalnih putova MAPK (protein-kinaze aktivirane mitogenima) i PI3K/AKT (fosfatidil-inozitol-3-kinaza). Folikularni karcinomi štitnjače posjeduju nisku učestalost mutacije gena *BRAF*, koja prema istraživanjima iznosi tek 1,4 %. Najčešće su prisutne točkaste mutacije gena *RAS* (*NRAS*) u rasponu 17-57% te genske fuzije *PAX8-PPARG*, u rasponu 12-53% [6,66]. Daljnju dediferencijaciju i progresiju dobro diferenciranih tumora prema slabo diferenciranim karcinomima štitnjače uzrokuju dodatne mutacije poput promjene *TP53* tumor-supresorskog gena i mutacije u promotorskoj regiji gena *TERT* koje su značajno češće prisutne u agresivnijim varijantama karcinoma štitnjače [64].

1.2.1 Genske promjene u papilarnom karcinomu štitnjače

Najčešće mutacije u PKŠ su mutacije gena *BRAF*, gena *RAS* i rearanžmani *RET/PTC* koje se smatraju pokretačkim mutacijama, te mutacije gena *TERT* koje nastaju u kasnijem stadiju razvoja tumora i pridonose agresivnosti tumora [6,67,68].

Prema literaturi, postojanje promjena *RET/PTC* može upućivati na radijacijsku podlogu razvoja papilarnog karcinoma štitnjače (16,17). *RET/PTC1* i *RET/PTC3* su najčešći rearanžmani, a opisana im je veća učestalost u djece izložene ionizirajućem zračenju nakon katastrofe u nuklearnom postrojenju Černobil [69]. U navedenim

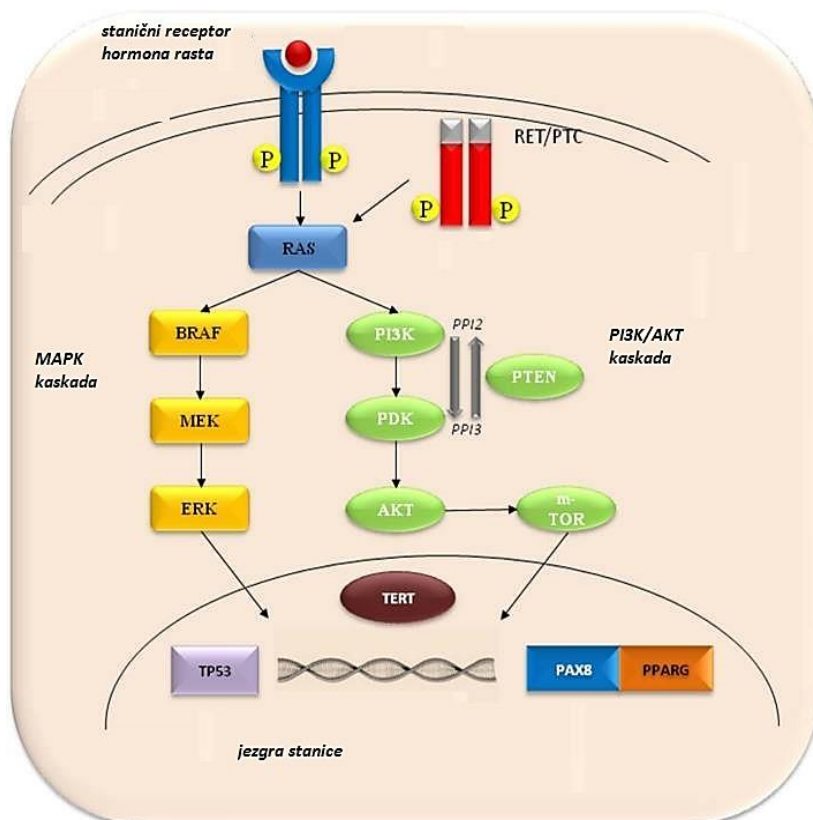
rearanžmanima dolazi do fuzije gena *RET* i gena *CCD6* odnosno gena *NCO4* što dovodi do stvaranja fuzijskih proteina *RET/PTC1* i *RET/PTC3* i posljedične nekontrolirane aktivacije signalne kaskade MAPK [70]. Radi utjecaja vanjskih čimbenika okoliša na razvoj *RET/PTC* mutacija, regionalna incidencija mutacija je izrazito varijabilna. Smatra se da *RET/PTC3* varijanta nosi veći rizik agresivnosti i lošijeg ishoda bolesti [70].

Mutacija gena *BRAF V600E* je svakako najčešća mutacija u PKŠ, s prosječnom incidencijom od približno 45%, u rasponu od 27,3 do 87,1% [71,72]. U tumorima ljudi opisano je približno 200 različitih mutacija gena *BRAF*, od kojih je 30 povezano s funkcionalnim promjenama proteina. Mutacije gena *BRAF* mogu se podijeliti u tri klase, od kojih su prva i druga klasa i njihovi transkripcijski produkti neovisni o aktivaciji RAS-kinaznim putem (slika 2). U odnosu na njih, mutacije treće klase mogu ostvariti učinak na MAPK kaskadu tek uz aktivaciju djelovanjem RAS-kinaznog puta [73]. Kinaza *BRAF* se nalazi nizvodno od kinaze RAS, a odgovorna je za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije, rasta i apoptoze (slika 1). U karcinomu štitnjače je najčešća *BRAF* mutacija V600E, koja je mutacije prve klase i stoga može biti samostalan pokretač tumora, neovisno o aktivaciji uzvodnim RAS-signalom [73]. Mutacija aktivira signalni put MAPK a MAPK signalni put se smatra kritičnim u razvoju papilarnog karcinoma štitnjače [74]. U slučaju postojanja mutacije gena *BRAF V600E*, aktivnost mutirane kinaze *BRAF* je 480 puta aktivnija u odnosu na *BRAF* divlji tip [74].

RAS predstavlja skupinu proteina koji djeluju putem MAPK i PI3K-AKT signalnih puteva. Geni *KRAS*, *NRAS* i *HRAS* kodiraju za četiri proteina (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A i K-Ras4B) koji su uključeni u rast i diferencijaciju stanice. Točkaste mutacije gena za posljedicu imaju aktiviranje signalnog puta RAS, koji je glavni poticatelj signalnog puta PI3K, zajedno s mutacijama gena *PTEN*, *PIK3K* i *AKT1*. Mutacije gena *RAS* često su prisutne u FKŠ (mutacije N-ras: 17-57%) , no mogu se naći i u do 10% PKŠ [6]. „Missense“ mutacije na kodonima 12,13 i 61 gena *NRAS* vode do aktivacije RAS signalnog puta i ubrzane proliferacije te preživljenja stanice tumora [64]. Također je bitno da se mutacija gena *RAS* pojavljuje u NIFTP tipu karcinoma štitnjače, koji se, prema posljednjoj klasifikaciji, karakterizira kao „borderline“ tumor, te u benignom folikularnom adenomu. Mutacije gena *BRAF* ne nalaze se u navedenim „borderline“ i benignim tumorima, a RAS pozitivni tumori su prema kliničkim i patohistološkim pokazateljima benignijeg karaktera. Shodno tome, smatra se da je mutacija gena *RAS* u

usporedbi s mutacijom gena *BRAF* prognostički pokazatelj karcinoma manje agresivnosti, na temelju čega se PKŠ potencijalno mogu razvrstati u *BRAF*-slične tumore s lošijom prognozom i *RAS*-slične tumore s boljom prognozom [75].

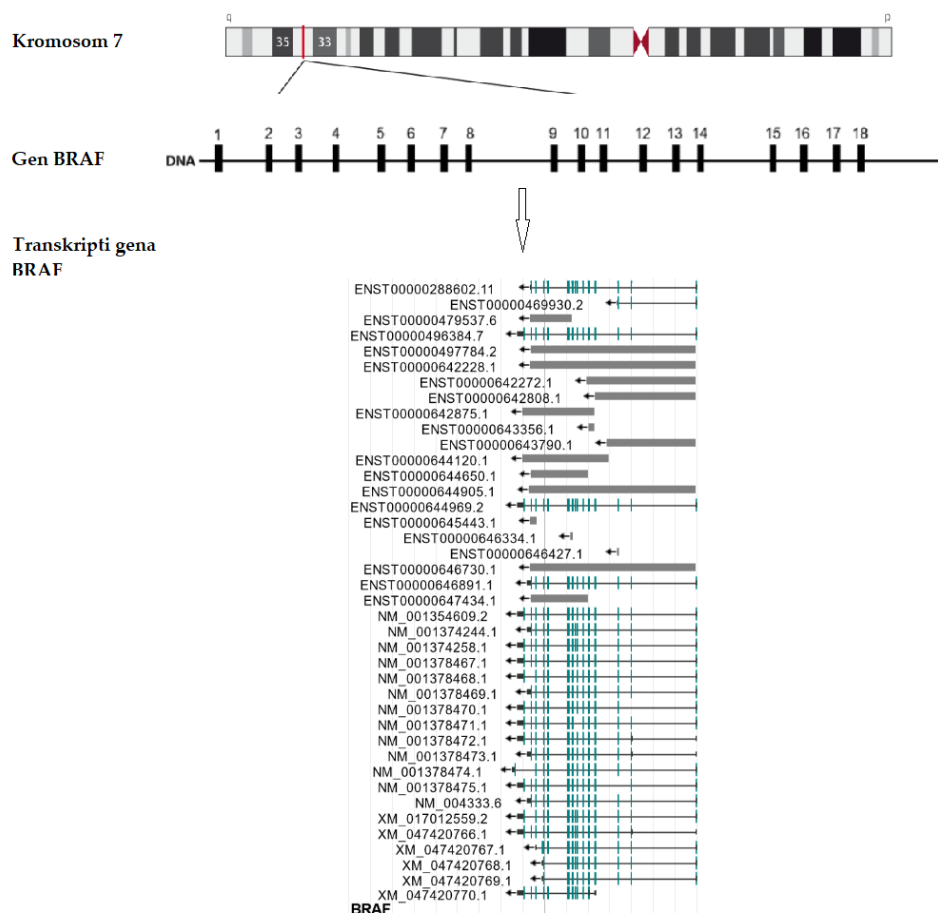
Gen *TERT* kodira za telomeraznu reverznu transkriptazu te, za razliku od ostalih učestalih mutacija karcinoma štitnjače, nije povezana s MAPK i PI3K/AKT signalnim putovima. Mutacije u genu *TERT*, od kojih se najznačajnije C228T i C250T nalaze u promotorskoj regiji, kod karcinoma štitnjače potiču *TERT* transkripciju te povećavaju aktivnost telomeraze i održavanje dužine telomera u stanicama karcinoma. Zbog toga stanice ne umiru, a mutacija predstavlja čimbenik rizika za pojačanu agresivnosti karcinoma štitnjače. Ovo je vidljivo kod prisutne same mutacije u genu *TERT* genu, ali je još izraženije kada su ove mutacije prisutne zajedno s mutacijama u genu *BRAF* [32,76].



Slika 1. Shematski prikaz mehanizama koji su aktivni u stanicama tireocita te gena i njihovih produkata čija promjena dovodi do razvoja papilarnog karcinoma štitnjače. Ilustracija prepravljena prema Prete i sur. 2020. [64]

1.2.1.1 Mutacija gena *BRAF*

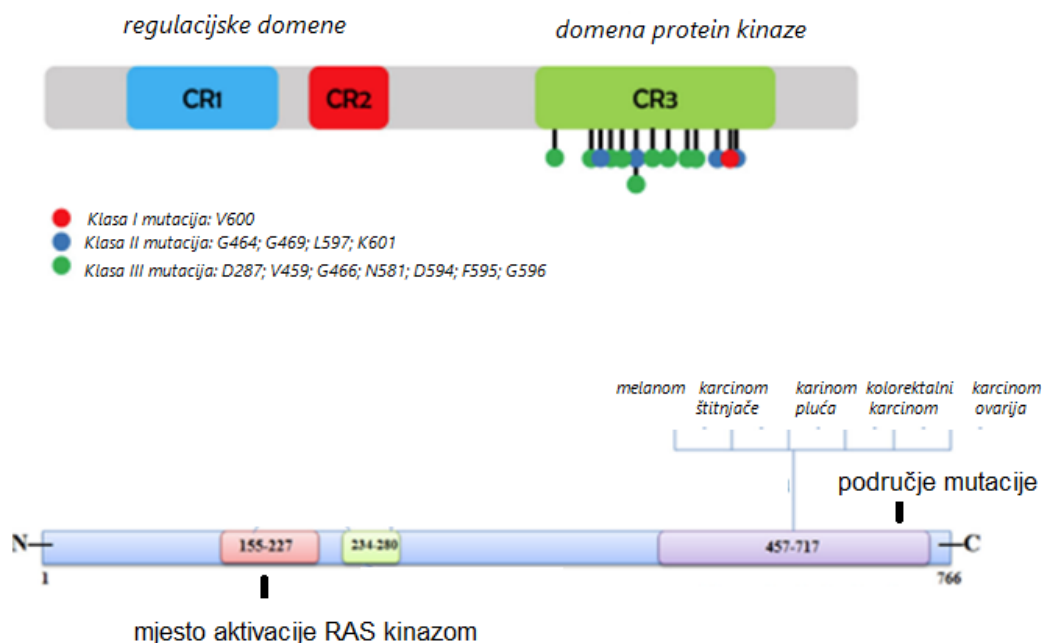
Gen *BRAF* (engl. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) nalazi se na dugom kraku kromosoma 7 (7q34), (GRCh38: 7:140,713,328-140,924,929). Najdulja inačica glasničke RNA gena *BRAF* (NM_004333) sastoji se od 18 egzona koji se sastoji od 6459 baza[77]. Transkripti gena *BRAF* prikazani su na slici 2.



Slika 2. Transkripcijske inačice gena *BRAF* (prilagođeno prema alliancegenome.org) [78]

Protein BRAF se sastoji od 766 aminokiselina i ima molekularnu masu od 95 kDa. U strukturi proteina se nalaze tri konzervirane domene: regulacijske CR1 i CR2 te domena protein kinaze CR3 [79]. N-terminalna CR1 regija sadrži RAS-veznu domenu i domenu bogatu cisteinom, dok C-terminalna CR3 regija sadrži serin/treonin kinaznu domenu i motiv koji, ukoliko fosforiliran, služi kao mjesto vezivanja proteina 14-3-3. Srednja, CR2 regija, također posjeduje vezno mjesto za protein 14-3-3 [80]. Proteini 14-3-3 stvaraju

dimere koji vežu specifične fosforilirane motive serina ili treonina u različitim signalnim proteinima.



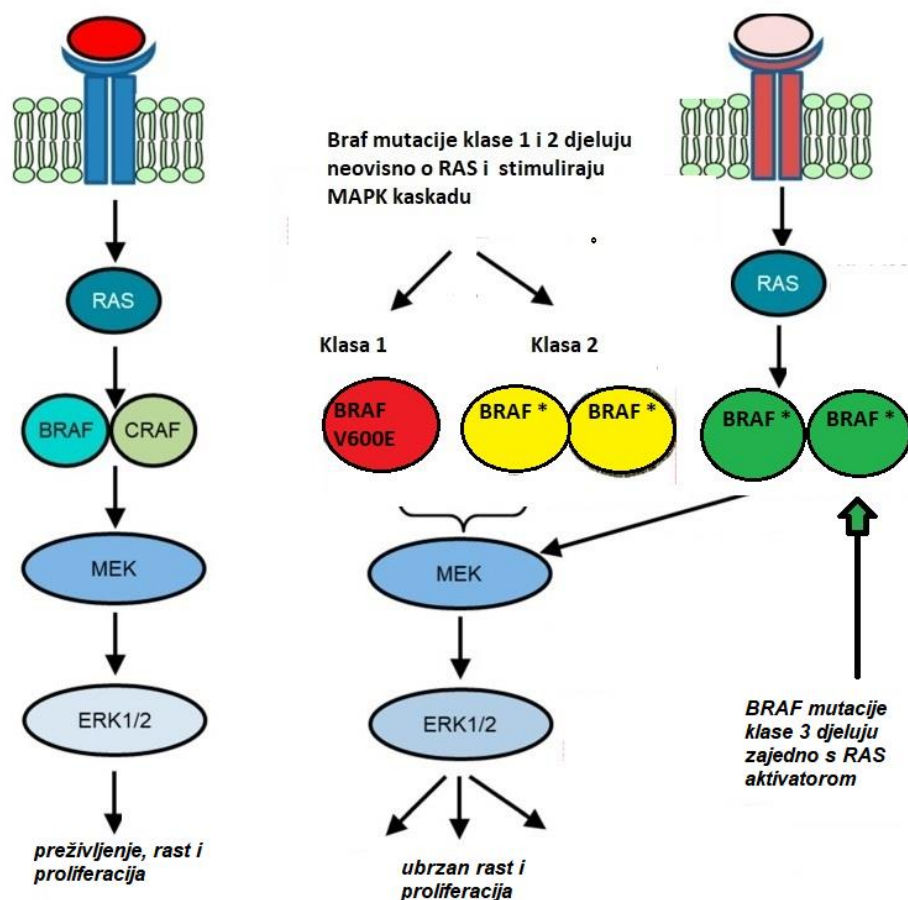
Slika 3. Struktura proteina BRAF i položaji mutacija u odnosu na domene proteina. Ilustracija prepravljena prema Šmiech i sur. 2020. I Hussain MRM. i sur. 2015 [79,81]

Protein BRAF dio je kaskade MAPK [82]. Smatra se da je aktivnost kaskade MAPK promijenjena u 30% svih tumora dok je mutacija gena *BRAF* prisutna u približno 7% svih tumora [83]. Fiziološki, put prijenosa signala posredovan kinazama MAPK započinje vezanjem ekstracelularne signalne molekule na membranski receptor (na primjer, receptor EGFR), koji, nakon aktivacije omogućuje vezanje GTP na RAS, što za posljedicu ima njegovu aktivaciju. Protein RAS nadalje aktivira kinazu RAF. Kinaza RAF u sisavaca dolazi u tri različita oblika proteina: ARAF, BRAF i CRAF. Sve tri imaju ulogu u fiziološkim procesima, a BRAF je često mutacijom promijenjen u mnogim tipovima karcinoma [84]. Aktivirajuće mutacije gena *BRAF* dokazane su u nekoliko tipova solidnih tumora uključujući, osim štitnjače, i melanom u oko 60 % slučajeva, 15% kolorektalnih karcinoma te do 8% karcinoma pluća nemalih stanica [73,85]. Važna je uloga mutacije gena *BRAF* u patogenezi leukemije vlasastih stanica u kojima se pojavljuje u svim analiziranim slučajevima bolesti (48 bolesnika) [86]. Također je opisana u 95 %

slučajeva papilarnog kraniofaringeoma (36 od 39 tumora) i to u obliku monoklonskog papilarnog kraniofaringeoma s *BRAF* V600E mutacijom, bez drugih prisutnih mutacija [87].

Gen *BRAF* kodira istoimenu kinazu koja gotovo uvijek čini heterodimer s CRAF-kinazom. Aktivacija heterodimera je u fiziološkom stanju ovisna o djelovanju RAS-kinaze i u svom aktivnom obliku posjeduje serin/treonin specifičnu kinaznu aktivnost. U slučaju mutacije *BRAF* V600E, koji predstavlja prvu klasu mutacije, *BRAF* V600E kinazna aktivnost je prisutna, neovisno o RAS-signalnom putu. Aktivnost je prisutna i u slučaju postojanja mutacije *BRAF* V600E kao aktivna kinaza i u obliku monomera [88]. Kinaza *BRAF* fosforilira i aktivira MEK1 ili MEK2 kinaze koje nadalje fosforiliraju i aktiviraju ERK [89]. Protein kinazni put MAPK u konačnici regulira transkripciju gena, i translaciju mRNA potrebnih za staničnu proliferaciju i odgovor na stres. Navedeni učinak se odvija putem nizvodnih MAPK aktiviranih protein kinaza koje čine pet skupina kinaza: p90 ribosomalna S6 kinaza, mitogenom i stresom aktiviranom kinazom, MAPK-interaktivnom kinazom, MAPK-aktivirano protein kinazom 2/3 i p38-reguliranom /aktiviranom protein kinazom [90].

Opsežno je prikazan utjecaj mutacije V600E gena *BRAF* na onkogenezu melanoma. Profiliranje uzoraka melanoma dobivenih od pacijenata na cijelom transkriptomu dovelo je do identifikacije specifičnih uzoraka povezanih s glavnim podtipovima onkogeni. Nadalje, The Cancer Genome Atlas studija je na temelju genskih funkcija 1500 diskriminirajućih transkriptata mRNA podijelila melanome na tri skupine tumora, što se može nazvati profiliranje prema transkriptomu [91]. Osim utjecaja na translaciju, zabilježena je pojava supresije transkripcije tumor-supresorskog gena *MLH1* (MutL Homolog 1) putem selektivne hipermetilacije izazvane *BRAF* mutacijom, što omogućuje progresiju tumora [92]. Mutacija *BRAF* V600E potiče utišavanje transkripcije putem pojačanog *BRAF*/*MEK*/*ERK* signaliziranja, što rezultira fosforilacijom *MAFG*. Fosforilacija *MAFG* sprječava proteasomalno posredovanu degradaciju koja dovodi do povećanih razina *MAFG*. Dakle, *MAFG* postaje stabiliziran fosforilacijom u mutiranim stanicama *BRAF* V600E što dovodi do hipermetilacije promotora tumor supresorskog gena *MLH1* i supresije transkripcije gena *MLH1*.



Slika 4. BRAF mutacija i utjecaj mutiranih oblika BRAF-kinaza na MAPK-kaskadu. Ilustracija prepravljena prema Zaman i sur. 2019. [73]

1.2.1.1.1. Mutacija gena BRAF V600E u patogenezi papilarnog karcinoma štitnjače

Više od 90% pronađenih *BRAF*-mutiranih PKŠ karakterizirano je transverzijom T1799A zbog koje se valin na položaju 600 zamjenjuje glutaminskom kiselinom (V600E). Promjena se događa unutar aktivirajuće domene proteina (CR3) koja se nalazi u području 457-717 položaja aminokiselina (prikazano na slici 3.) [93]. Ova mutacija rezultira konstitutivnom aktivacijom signalnog puta MAP-kinaze, što može uzrokovati promjenu ekspresije gena, ubrzane proliferacije i izbjegavanja apoptoze. U staničnim linijama PKŠ primjećen je i značajan učinak mutacije *BRAF* na hipermetilaciju i utišavanje gena *NIS* koji kodira nastanak suprijenosnika Na/I. Proces dediferencijacije PKŠ uključuje gubitak ekspresije Na/I suprijenosnika te pridonosi mogućoj

neosjetljivosti na liječenje radiojodom [94]. Iako je povezanost prisutnosti mutacije *BRAF* V600E i kliničko-patoloških prognostičkih čimbenika PKŠ-a opsežno istražena, još uvijek nije pokazana jednoznačna povezanosti između te mutacije i lošijeg ishoda bolesti [95]. Smatra se da je mutacija u genu *BRAF*, kao prognostički čimbenik u PKŠ, upitna [96,97]. Rezultati istraživanja temeljenih na povezanosti mutacije s kliničko-patološkim prognostičkim čimbenicima PKŠ (bilateralnost, multifokalnost, infiltracija kapsule štitnjače i metastaze u limfne čvorove) nisu jednoznačni. Dok pojedina istraživanja pokazuju povezanost prisutnosti mutacije s navedenim čimbenicima [98,99], u drugoj skupini istraživanja ovakve povezanosti nema [97]. U ovim istraživanjima pokazana je samo prisutnost ili odsutnost *BRAF* V600E mutacije, bez daljnje kvantifikacije, u pozitivnim slučajevima. Jedno od predloženih objašnjenja nerazjašnjenog odnosa između prisutnosti *BRAF* V600E mutacije i prognostičkih čimbenika koji određuju agresivnost PKŠ jest heterogena raspodjela stanica s *BRAF* V600E mutacijom, unutar tkiva tumora [100–103]. Monoklonalnost PKŠ nedavno je dovedena u pitanje te je pokazano da je *BRAF* V600E mutacija heterogeno distribuirana i ograničena na dio stanica tumora u većini uzoraka PKŠ [101,104]. Ukoliko je neka somatska mutacija rani događaj u razvoju tumora očekujemo njezinu nazočnost u mnogim ili svim stanicama tumora, dok su mutacije koje se događaju kao kasniji događaji u tijeku bolesti prisutne u manjem broju stanica. Ako smatramo da je mutacija gena *BRAF* vrlo rani događaj, očekivani udio mutiranih alela gena *BRAF* bio bi 50%, pod pretpostavkom da stanice PKŠ nose jedan mutirani i jedan alel divljeg tipa gena *BRAF*. Guerra i suradnici su ipak pokazali prisutnost mutacije gena *BRAF* samo u maloj podskupini stanica. U njihovoj je studiji 66% PKŠ s *BRAF* mutacijom imalo frekvenciju mutiranog alela manju od 25% što upućuje na to da je *BRAF* mutacija često oligoklonalni događaj [101]. Da bi dodatno ispitali biološku važnost mutacije u genu *BRAF*, Cheng i suradnici su istražili povezanost između učestalosti mutiranih alela i kliničko-patoloških čimbenika te pokazali da su veći tumori i tumori s infiltracijom kapsule štitnjače imali značajno veću učestalost mutiranih alela [104]. Mutacije *BRAF*, *RAS* i *TERT* prisutne su i u metastatskom DKŠ-u i pokazano je da mutacije pronađene u metastazama diferenciranog karcinoma štitnjače odgovaraju mutacijama u uzorcima primarnog tumora [105]. Ovo je u skladu s istraživanjima koja su pokazala da primarni tumori posjeduju ključne somatske promjene koje su prisutne i u metastazama [106,107]. Također su

pokazali da je učestalost mutiranog alela gena *BRAF* bila 25% (50% stanica s heterozigotnom mutacijom) u primarnom PKŠ-u, a 38% (76% stanica s heterozigotnom mutacijom) u metastatskom PKŠ [105]. Gandolfi i suradnici su prikazali drugačije podatke; od 35 PKŠ i pripadajućih 40 metastaza u limfnim čvorovima prosječan postotak mutiranih alela gena *BRAF* je bio značajno niži u metastazama limfnih čvorova u odnosu na primarni tumor (18,6% prema 28,6%) [103] što dodatno upućuje na mogućnost istraživanja važnosti određivanja postotka mutiranih alela. Ranije navedena istraživanja pokazuju različit prognostički značaj mutacije *BRAF* V600E u odnosu na agresivnost bolesti i nepovoljnu prognozu za bolesnika. Kako bi se dodatno razjasnila prediktivna snaga mutacije *BRAF* kao molekularnog biljega za progresiju PKŠ korisno bi bilo određivanje kliničkog značaja učestalosti *BRAF* V600E mutiranih alela u odnosu na stupanj proširenosti bolesti.

2. HIPOTEZA

Udio stanica tumora s mutiranim alelom *BRAF* V600E u papilarnom karcinomu štitnjače povezan je sa stupnjem proširenosti bolesti.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Cilj doktorskog rada je istražiti povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* V600E u stanicama papilarnog karcinoma štitnjače u odnosu na proširenost bolesti.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Procijeniti postotak zloćudnih stanica u prerezu tkiva tumora dobivenog iz histološkog bloka s najvećim dostupnim promjerom tumora;
2. Odrediti prisutnost mutacije *BRAF* V600E u tkivu tumora metodom qPCR;
3. Odrediti frekvenciju mutiranih alela *BRAF* V600E te normalizirati s obzirom na ranije određen postotak stanica tumora u prerezu;
4. Potvrditi mutacijski status gena *BRAF* na razini proteina imunohistokemijom u dijelu *BRAF* V600E pozitivnih i negativnih uzoraka;
5. Odrediti postoji li povezanost između učestalosti *BRAF* V600E mutiranih alela i stupnja proširenosti bolesti;
6. Odrediti postoji li povezanost između učestalosti *BRAF* V600E mutiranih alela i drugih relevantnih kliničkih i patohistoloških obilježja analiziranih tumora.

4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

4.1 Ispitanici

Ovo retrospektivno istraživanje provedeno je na Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. U istraživanje su uključene odrasle osobe koje su u bolničke ambulante zaprimljene u sklopu redovne obrade karcinoma štitnjače, a imaju dostupne patohistološke (PH) preparate, nakon provedene tireoidektomije. Analiza genskih promjena provedena je na arhivskim uzorcima tkiva primarnog tumora PKŠ. Klinički podaci o bolesnicima dobiveni su korištenjem dostupne medicinske dokumentacije i prikupljeni su u sklopu rutinske onkološke obrade.

Istraživanje je provedeno na 173 bolesnika, probirom tijekom tri godine, na temelju uključnih i isključnih kriterija:

Uključni kriteriji:

1. punoljetne osobe;
2. osobe liječene od PKŠ kojima je provedena totalna tireoidektomija.

Isključni kriteriji:

1. neodgovarajuća kvaliteta PH uzorka;
2. postojanje druge zloćudne bolesti;
3. arhivski uzorak stariji od 10 godina.

Bolesnici su podijeljeni u tri skupine, u obliku otvorenog kohortnog istraživanja:

Prva skupina obuhvaća 81 bolesnika oboljelih od PKŠ koji su pri inicijalnoj postoperativnoj onkološkoj obradi bili bez znakova diseminacije bolesti – T1-4N0M0 (AJCC/TNM sustav stratifikacije – 8. izdanje) [60].

Druga skupina obuhvaća 61 bolesnika oboljelih od PKŠ koji su pri inicijalnoj postoperativnoj onkološkoj obradi imali regionalne metastaze u limfnim čvorovima – T1-4N1M0 (AJCC/TNM sustav stratifikacije – 8. izdanje) [60].

Treća skupina obuhvaća 31 bolesnika oboljelih od PKŠ s potvrđenim udaljenim metastazama PKŠ, pri inicijalnoj postoperativnoj onkološkoj obradi – T1-4NxM1 (AJCC/TNM sustav stratifikacije – 8. izdanje) [60].

4.2 Prikupljanje podataka i patohistoloških uzoraka

Nakon potpisanog informiranog pristanka prikupljeni su podaci o patohistološkim karakteristikama tumora, klinički podaci i podaci o postoperativnoj onkološkoj obradi te parafinski blokovi primarnog tumora štitnjače. Tijekom prikupljanja i obrade podataka identiteti bolesnika zaštićeni su korištenjem dodijeljenog koda u svrhu zaštite imena, osobnih podataka i osobne medicinske dokumentacije. Svi postupci provedeni su u skladu s dobrom kliničkom praksom i Helsinškom deklaracijom iz 1975. godine, revidiranom 2013. godine.

Klinički podaci o bolesnicima su uključivali dob, spol, te patohistološku dijagnozu.

Na temelju patohistološkog nalaza prikupljeni su sljedeći podaci: veličina primarnog tumora, područje zahvaćenosti štitnjače (lijevi ili desni lobus, istmus), širenje tumora unutar žlijezde, infiltracija kapsule štitnjače tkivom tumora, infiltracije okolnog masnog i vezivnog tkiva te angioinvazija.

Na temelju nalaza postoperativne onkološke obrade, kao i PH nalaza preuzeti su podaci o postojanju metastatski pozitivnih limfnih čvorova vrata kao i postojanju udaljenih mjesta diseminacije. U slučaju postojanja pozitivnih limfnih čvorova, izdvojeni su podaci o promjeru najvećeg metastatskog limfnog čvora te eventualnom proboju kapsule limfnog čvora.

Uzorci PH preuzeti iz arhive obrađeni su na Kliničkom zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak" Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice.

4.3 Histološka analiza primarnog tumora

Za potrebe histološke analize, odstranjeno tkivo štitnjače obrađeno je standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu, dehidriranje u rastućim koncentracijama alkohola, uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 μm , deparafiniranje u ksilolu i bojenje standardnom metodom hemalaunom i eozinom (H&E). Za svakog bolesnika je ponovno pregledan sav dostupan arhivski materijal i odabran je po jedan reprezentativni parafinski blok na temelju najvećeg dostupnog promjera tumora. Iz svakog bloka rezani su rezovi na slijedeći način: prvi rez koji je bojan H&E korišten je u svrhu procjene udjela stanica tumora u cijelom rezu pojedinog preparata, izražen u postotku u odnosu na sve preostale

stanice u tom rezu. Sljedećih nekoliko rezova je potom korišteno za izdvajanje genomske DNA u svrhu analize postojanja *BRAF* V600E mutacije. Dodatni rez, dobiven iz 45 odabranih parafinskih blokova bolesnika (pozitivnih i negativnih u odnosu na postojanje mutacije *BRAF* V600E) korišten je za analizu ispoljenosti mutiranog alela *BRAF* na razini proteina, metodom imunohistokemije.

4.4 Izdvajanje DNA i detekcija mutacije *BRAF* V600E

Genomska DNA izdvojena je upotrebom komercijalnog kompleta kemikalija za izdvajanje DNA iz fiksiranih tkiva uklopljenih u parafin (QIAamp DNA FFPE Tissue kit, Qiagen). Rez debljine 5 μm je stavljen u mikrotubicu zapremnine 1,5 mL i dodano je 1 mL ksilola. Uzorak sa ksilolom je zatim snažno vorteksiran 10 sekundi te centrifugiran pri brzini od 14000 rpm (Eppendorf 5415C) tijekom dvije minute na sobnoj temperaturi (15-25°C). Supernatant je odstranjen, a talog se resuspendirao u puferu s dodatkom proteinaze K te je inkubiran sat vremena na temperaturi od 56°C te sat vremena na 90°C. Dobiveni lizat se zatim pročistio u tri navrata kroz QIAamp MinElute kolonu s odgovarajućim puferima. Završni korak bilo je ispiranje pročišćene DNA sa QIAamp MinElute kolone u 30 μL vode bez RNaza. Ovako izdvojena DNA pohranjena je na -80°C.

Koncentracija i čistoća izdvojene DNA određena je korištenjem nanospektrofotometra Nanodrop 2000 (Thermo Fisher), mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama 260 nm i 280 nm te računanjem omjera A260/A280. U daljnjim koracima korištena je DNA iz uzoraka u kojima je omjer A260/A280 bio $\geq 1,7$.

Detekcija mutacije *BRAF* V600E provedena je kompetitivnom alel-specifičnom TaqMan lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (PCR, *engl. Polymerase Chain Reaction*) korištenjem instrumenta 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems), uz korištenje odgovarajućih proba TaqMan (TaqMan® Mutation Detection Assay, Applied Biosystems). U ovom je istraživanju korištena proba TaqMan (TaqMan® Mutation Detection Assay) specifična za mutaciju *BRAF* V600E (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), u kombinaciji s referentnom genskom probom TaqMan (TaqMan® Mutation Detection Reference Assay) za gen *BRAF* (Applied Biosystems) kojom se umnaža područje gena *BRAF* unutar kojeg nema mutacija/polimorfizama. Svaka reakcija provedena je u triplicatu, korištenjem 25 ng DNA. Za svaku reakciju je pomiješano: 10 μL TaqMan® Genotyping Master Mix-a (Applied Biosystems), 4 μL

DNA radne koncentracije 6,25 µg/mL, 2 µL TaqMan® Mutation Detection Assay, odnosno TaqMan® Mutation Assay Reference Assay i 4 µL deionizirane vode u ukupnom volumenu od 20 µL. TaqMan® Genotyping Master Mix sadrži AmpliTaq Gold® DNA polimerazu, smjesu deoksinukleotida bez dUTP-a, pasivnu referentnu boju ROX i pufer koji omogućuje optimalne uvjete reakcije. Uvjeti u kojima se odvijala PCR reakcija bili su sljedeći: 10 minuta na 95°C, 5 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi na 92°C i 1 minute na 58°C, 40 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi na 92°C i 1 minute na 60 C. U svakoj je reakciji, uz uzorke, analizirana i negativna kontrola (uzorak za koji je ranije potvrđeno da nema mutaciju V600E u genu *BRAF*) te pozitivna kontrola (uzorak za koje je ranije potvrđeno da ima V600E mutaciju gena *BRAF*).

Analiza podataka reakcije PCR provedena je programom Mutation Detector software (Applied Biosystems). Tim programom je izračunata vrijednost ΔC_t , određena je prisutnost ili odsutnost mutacije u uzorku te kvantificiran udio mutiranih alela *BRAF* V600E. Iz dobivenih vrijednosti C_t reakcije s TaqMan probom za detekciju mutacije i TaqMan referentnom genskom probom izračunata je normalizirana ΔC_t vrijednost prema sljedećoj formuli:

normalizirani ΔC_t =

[C_t (proba za mutaciju) – C_t (referentna genska proba)] – kalibracijski ΔC_t

Vrijednost kalibracijskog ΔC_t iznosi 2,008. Kalibracijska ΔC_t vrijednost je razlika u pojavljivanju signala između eseja za mutirani alel i eseja za odgovarajuću referentnu gensku probu. Kalibracijska ΔC_t vrijednost je nužna za mogućnost kvantitativne analize postotka mutiranih alela u uzorku.

Iz ovako određene normalizirane vrijednosti ΔC_t izračunat je postotak mutiranih alela prema sljedećoj formuli:

%mutacija = $[1/2^{\Delta C_t} \div (1/2^{\Delta C_t} + 1)] \times 100\%$

Budući da procjena genske heterogenosti u uzorcima tumora može biti neprecizna zbog prisustva stanica tkiva netumora, podaci vezani uz postotni udio mutacije normalizirani su s obzirom na ranije određen postotak stanica tumora u uzorku, prema formuli:

Normalizirani % mutacije u tumoru =

% mutacije / % stanica tumora u rezu preparata

4.5 Određivanje mutiranog proteina BRAF V600E metodom imunohistokemije

Analiza metodom imunohistokemije provedena je na 45 uzoraka, standardnim postupkom, korištenjem instrumenta Ventana Benchmark GX (Ventana Medical Systems) i kompleta kemikalija za detekciju, Opti View DAB (Roche, Switzerland). Rezovi tkiva su 28 minuta inkubirani s primarnim monoklonskim protutijelom miša koje specifično prepoznaje mutaciju *BRAF* V600E (Ventana anti-BRAF V600E/VE1, Roche, Njemačka). Navedeno protutijelo je ranije validirano u svrhu detekcije BRAF V600E proteina u karcinomu štitnjače [108]. Kontrastno bojenje pozadine provedeno je hematoksilinom. Kao pozitivna kontrola je korišteno tkivo metastatskog melanoma s potvrđenom mutacijom *BRAF*. Imunohistokemijom je određeno postojanje BRAF mutiranog proteina V600E te je u slučaju pozitivnog nalaza procijenjen postotak stanica karcinoma sa izraženim promijenjenim proteinom u analiziranom uzorku.

4.6 Statističke metode u obradi podataka

Povezanost postojanja mutacije *BRAF* V600E i stupnja proširenosti bolesti testirana je χ^2 -testom, dok je povezanost učestalosti mutiranih alela *BRAF* V600E sa stupnjem proširenosti PKŠ ispitana statističkim testom jednosmjerne ANOVA. Nadalje, povezanost mutacije *BRAF* V600E i ostalih kliničkih i patohistoloških podataka iz dostupne medicinske dokumentacije, testirana je χ^2 -testom, testom Mann-Whitney te koeficijentom korelacije Spearman. Usporedba podudarnosti rezultata postojanja mutacije *BRAF* i rezultata dobivenih metodom imunohistokemije testirana je metodom Cohen's kappa dok je podudarnost učestalosti mutiranih alela *BRAF* i postotka BRAF mutiranog proteina uspoređena metodom Bland-Altman. Za statističku obradu rezultata korišten je program Statistica (StatSoft, Inc). Statistički značajnim rezultatom smatran je onaj u kojem je $p < 0,05$.

5. REZULTATI

Cjelokupna analiza, pri čemu nisu sve analize učinjene na svim uzorcima, napravljena je na 173 bolesnika koji su probrani kroz tri godine. Broj bolesnika je manji od 173 u pojedinim analiziranim skupinama zbog nedostupnosti pojedinih podataka.

U Tablici 5. prikazana je razdioba bolesnika u odnosu na spol, stupanj proširenosti bolesti i patohistološke karakteristike tumora.

Tablica 5. Spol i dob bolesnika, stupanj proširenosti bolesti i kliničko patološke karakteristike tumora.

Osnovne karakteristike bolesnika		Broj bolesnika	%
Spol N=173	Žene	109	63,0
	Muškarci	64	37,0
Dob N=173	<55	114	65,9
	≥55	59	34,1
Stadij bolesti N=173	0	81	46,8
	1	61	35,3
	2	31	17,9
Veličina tumora N=162	T1	88	54,3
	T2	31	19,1
	T3	36	22,2
	T4	7	4,3
Proboj kapsule štitnjače N=167	Da	37	22,2
	Ne	130	77,8
Diseminacija unutar štitnjače N=169	Da	67	39,6
	Ne	102	60,4
Širenje izvan štitne žlijezde N=164	Da	37	22,6
	Ne	127	77,4
Angioinvazija N=132	Da	12	9,1
	Ne	120	90,9

Proboj kapsule limfnog čvora N=47	Da	6	12,8
	Ne	41	87,2
Zahvaćenost lobusa štitnjače tumorom N=171	Desni lobus	75	43,9
	Lijevi lobus	68	39,8
	Istmus	5	2,9
	Ostalo	23	13,5

N=broj bolesnika

Ukupno je 43,9% bolesnika imalo tumorom zahvaćen desni lobus, 39,8% lijevi lobus, 2,9% istmus, 13,5% kombinaciju navedenog. Diseminacija tumora unutar štitnjače je bila prisutna u 39,6% bolesnika, a infiltracija kapsule štitnjače je bila prisutna u 22,2% bolesnika. Kod ukupno 9,1 % bolesnika je opisana angioinvazija, a u 22,6% bolesnika opisana je širenje izvan štitne žlijezde. U 12,8% bolesnika iz skupine bolesnika s lokalnim metastazama u limfnim čvorovima opisan je proboj kapsule limfnog čvora.

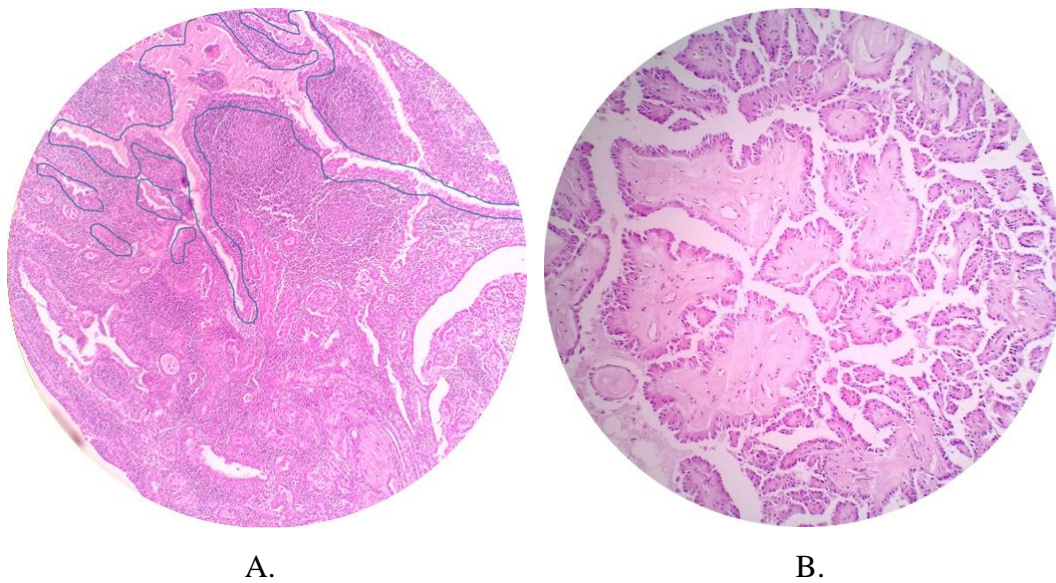
Bolesnici su podijeljeni u tri skupine, u odnosu na proširenost bolesti (Tablica 6). Mutacija *BRAF V600E* u primarnom tumoru dokazana je u 104 (60,1%), od ukupno 173 bolesnika. Prisutnost mutacije nije povezana sa stupnjem proširenosti bolesti ($\chi^2(1, N=173) = 3.737; p=0,154$; Tablica 6).

Tablica 6. Raspodjela bolesnika u odnosu na stupanj proširenosti bolesti i postojanje mutacije *BRAF V600E*.

PROŠIRENOST BOLESTI	<i>BRAF V600E</i> mutacija /n (%)/		
	Nema	Ima	Ukupno
BEZ DISEMINACIJE	31 (38,3%)	50 (61,7%)	81
LOKALNE METASTAZE	21 (34,4%)	40 (65,6%)	61
UDALJENE METASTAZE	17 (54,8%)	14 (45,2%)	31
SVI	69 (39,9%)	104 (60,1%)	173
$(\chi^2(1, N=173) = 3.737; p=0,154)$			

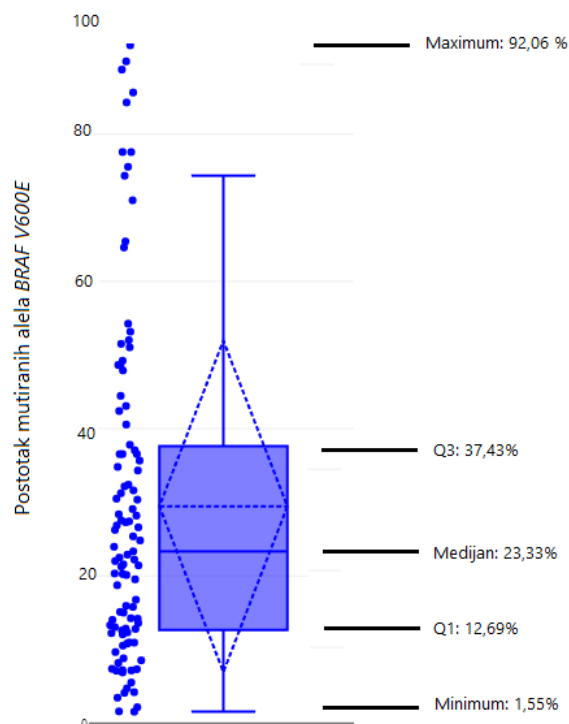
5.1 Heterogenost mutiranih alela *BRAF* V600E u primarnom tumoru

Nakon što su 173 tumora analizirani s obzirom na prisustvo mutacije, izdvojeno je 100 tumora, u kojima je određen udio *BRAF* V600E mutiranih alela. Za ovih 100 tumora bili su dostupni podaci o patohistološkim karakteristikama tumora i bilo je moguće procijeniti broj tumorskih stanica na histološkom preparatu. Metodom qPCR određen je postotni udio mutacije u dobro obilježenom tkivu tumora (Slika 5) koji je bio u rasponu od 0,5% do 41,6%, uz medijan 5,91%. Procijenjeni udio stanica tumora u uzorku je bio u rasponu od 5% do 90% s medijanom od 30%. Uzevši u obzir navedene podatke za pojedinog bolesnika, normalizirani udio mutiranih alela *BRAF* V600E se kretao u rasponu od 1,55% do 92,06%, s medijanom od 23,33% (slika 6.).



Slika 5. PKŠ, hemalaun-eozin, povećanje 40x te 100x.

A. 20% jezgara pripadaju tumoru B. 90% jezgara pripadaju tumoru



Slika 6. Box-plot prikaz udjela mutiranih alela u primarnom tumoru svih *BRAF* V600E pozitivnih bolesnika. Pojedina točka označava postotak mutiranih alela za svakog pojedinog *BRAF* pozitivnog bolesnika. Na slici su označeni: medijan, maksimalna i minimalna vrijednost, prva i treća kvartila.

Bolesnici su, na temelju vrijednosti normaliziranog udjela mutiranih alela *BRAF* podijeljeni u tri skupine, na način naveden u tablici 7. Postavili smo raspon od 40% do 60% kako bismo razlikovali heterozigotnu prisutnost mutiranog alela *BRAF* u većini tumorskih stanica te slučajeve s niskim (<40%) ili visokim (>60%) udjelom mutiranih alela *BRAF*. Uočili smo širok spektar vrijednosti normaliziranog udjela mutiranih alela *BRAF* (slika 7.) i primijetili da je najveći broj bolesnika (76%) imao manje od 40% mutiranih alela *BRAF* (tablica 7.).

Tablica 7. Raspodjela bolesnika prema učestalosti mutiranog alela *BRAF* V600E

Skupine u odnosu na normalizirani postotak mutiranih alela <i>BRAF</i> V600E	Skupina	Broj bolesnika
	Do 40%	76
	40 do 60%	12
	Više od 60%	12

5.2. Povezanost mutacije *BRAF* i udjela mutiranih alela *BRAF* s proširenošću bolesti

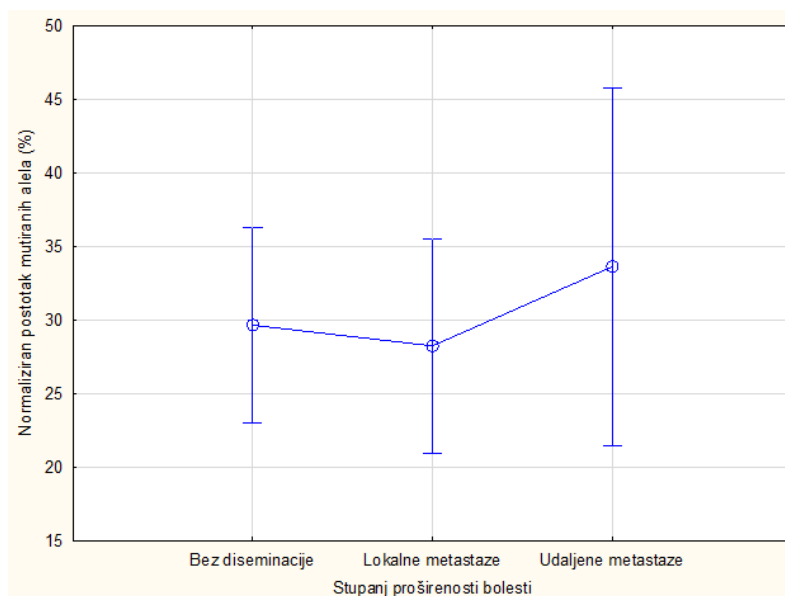
Učinjenim χ^2 -testom nije ustanovljena statistički značajna povezanost postojanja *BRAF* V600E mutacije sa stupnjem proširenosti bolesti (tablica 6.; χ^2 (1,N=173) = 3.737; p=0,154).

Nadalje, uspoređene su vrijednosti normaliziranog udjela mutiranih alela *BRAF* u tumoru sa stupnjem proširenosti bolesti korištenjem analize varijance. Izračun nije ukazao na postojanje statistički značajnih razlika između skupina bolesnika s obzirom na udio mutiranih alela *BRAF* V600E (ANOVA test, $F(2, 97)=0,28287$, p=0,754) (tablica 8, slika 7).

Tablica 8. Normalizirani postotak mutiranih alela *BRAF* V600E u odnosu na stupanj proširenosti bolesti

Normalizirani postotak mutiranih alela.				
Proširenost bolesti	Aritmetička sredina (%)	CI-95,00%	CI +95,00%	N
Bez diseminacije	29,63	22,99	36,27	47
Lokalne metastaze	28,23	20,94	35,52	39
Udaljene metastaze	33,61	21,44	45,78	14

ANOVA test, $F(2, 97)=0,28287$, p=0,754



Slika 7. Raspodjela mutiranih alela *BRAF* V600E u odnosu na proširenost PKŠ.

Nakon što su bolesnici razvrstani u tri skupine prema udjelu mutiranih alela *BRAF*, primijećena je veća učestalost mutiranih alela *BRAF* u bolesnika s udaljenim metastazama, u usporedbi s bolesnicima bez metastaza kao i s bolesnicima s lokalnim metastazama (21.4% bolesnika s udaljenim metastazama je imalo više od 60% mutiranih alela, za razliku od 10,6% odnosno 10,3% u ostale dvije skupine; Tablica 9). Provedenim χ^2 -testom ustanovljeno je da povezanost sa stupnjem proširenosti bolesti nije statistički značajna ($\chi^2(4,N=100) = 3,257; p=0,515$)

Tablica 9. Podjela bolesnika ovisno o stupnju proširenosti bolesti te udjelu mutiranih alela *BRAF* V600E

BROJ BOLESNIKA					
		Skupine po postotku mutiranih alela <i>BRAF</i> V600E			Ukupno
		Do 40%	40% do 60%	Više od 60%	
Proširenost bolesti	Nema metastaza	36 (74.5%)	7 (14.9%)	5 (10.6%)	47
	Lokalne metastaze	30 (76.9%)	5 (12.8%)	4 (10,3%)	39
	Udaljene metastaze	11 (78.6%)	0 (0%)	3 (21.4%)	14
Ukupno		76	12	12	100
$(\chi^2 (4,N=100) = 3,257; p=0,515)$					

5.3. Povezanost mutacije *BRAF* i učestalosti mutiranih alela

BRAF s kliničko patohistološkim karakteristikama bolesti

U našem istraživanju analizirali smo povezanost postojanja mutacije *BRAF* V600E kao i normalizirane vrijednosti udjela mutiranih alela *BRAF* V600E s veličinom tumora, probojem kapsule, angioinvazijom, diseminacijom u štitnjači, širenjem primarnog tumora izvan štitnjače i probojem kapsule limfnog čvora u slučaju postojanja lokalnih metastaza.

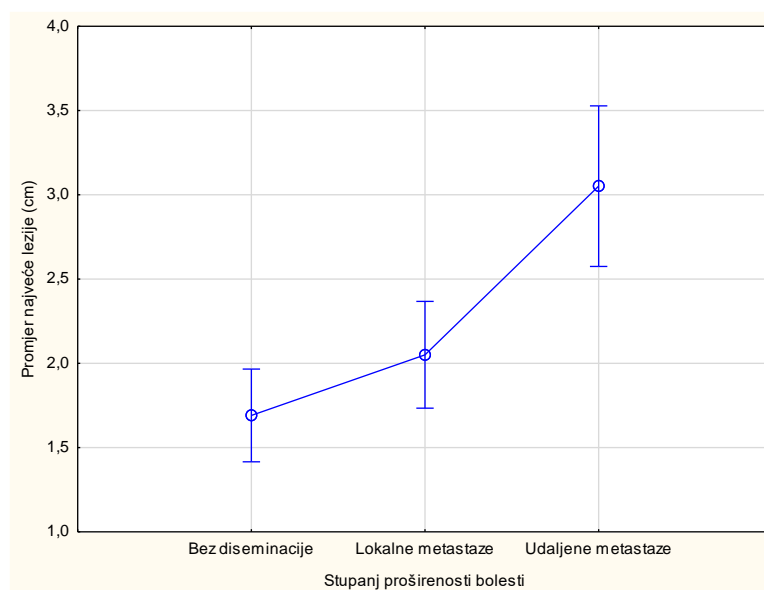
5.3.1. Povezanost mutacije *BRAF*, učestalosti mutiranih alela *BRAF* i proširenosti bolesti s veličinom tumora

Pokazan je statistički značajno veći promjer tumora u skupini s udaljenim metastazama (ANOVA, $F(2, 166)=11,914$, $p < 0,001$, tablica 10., slika 8.)

Tablica 10. Analiza povezanosti stupnja proširenosti bolesti s veličinom primarnog tumora

Promjer lezije				
Proširenost bolesti	Aritmetička sredina (cm)	CI -95,00%	CI +95,00%	N
Bez diseminacije	1,69	1,41	1,97	81
Lokalne metastaze	2,05	1,73	2,37	61
Udaljene metastaze	3,05	2,58	3,53	27

ANOVA test, $F(2, 166)=11,914$, $p < 0,001$

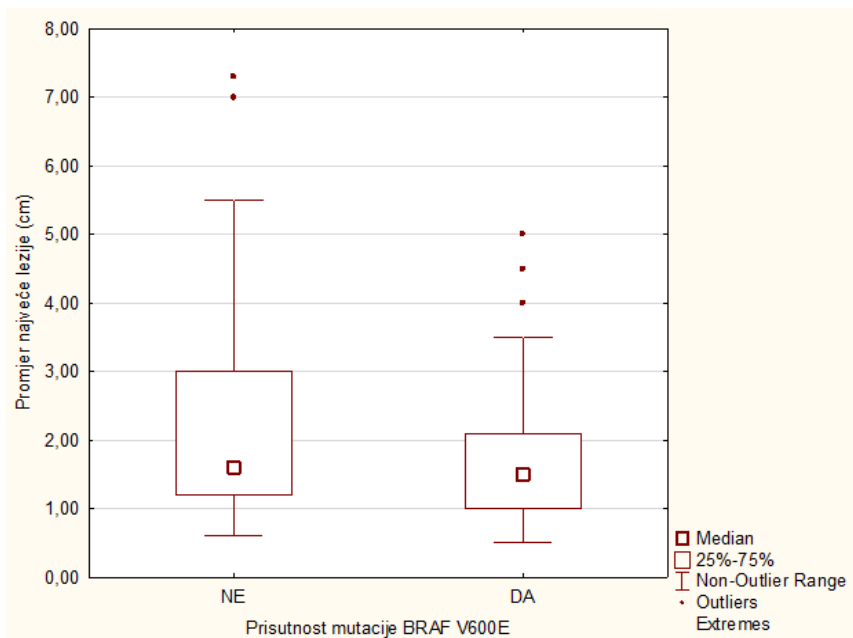


Slika 8. Grafički prikaz povezanosti stupnja proširenosti bolesti s veličinom primarnog tumora

Analizirana je povezanost prisutnosti mutacije BRAF V600E s veličinom tumora, što nije pokazano statistički značajno (Mann Whitney U test; $U=2890,5$, $Z=-1,69$, $p=0,09$; tablica 11; slika 9).

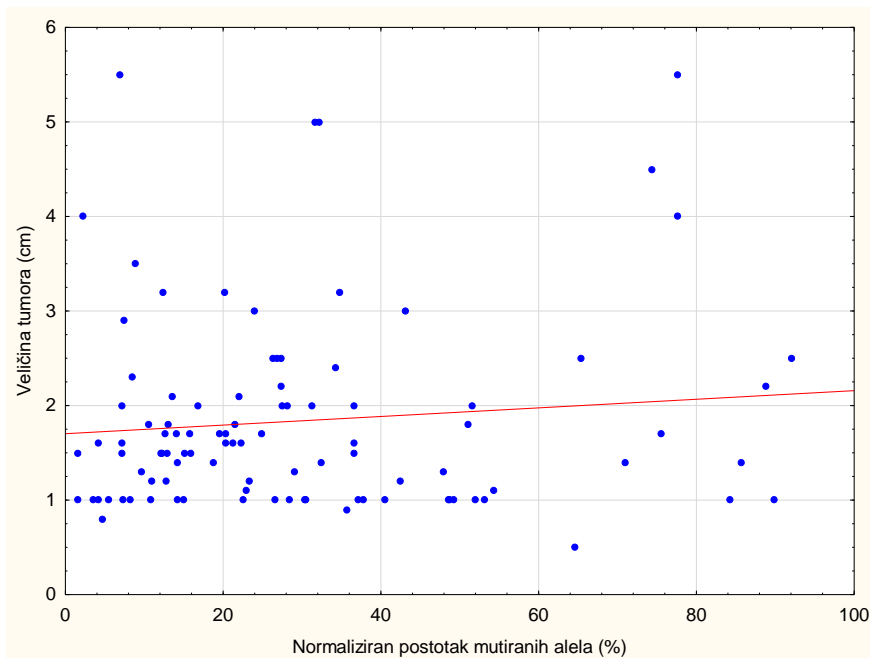
Tablica 11. Analiza povezanosti stupnja proširenosti bolesti s veličinom primarnog tumora

		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	Min.	Maks.	Q1	Q3
Prisutnost mutacije	DA	102	1,84	1,05	1,50	0,5	5,5	1	2,1
	NE	67	2,35	1,6	1,6	0,6	7,3	1,2	3,0
Mann Whitney U test; $U=2890,5$, $Z=-1,69$, $p=0,09$									



Slika 9. Grafički prikaz povezanosti prisutnosti mutacije BRAF V600E i veličine primarnog tumora

Promjer tumora s prisutnom mutacijom *BRAF* bio je u rasponu od 0,5 cm do 5,5 cm; medijan 1,5 cm. Daljnjom analizom nije pokazana statistički značajna korelacija između postotka mutiranih alela i veličine tumora (Spearmanov test, $N=98$, $R=0,0196$; $t=0,192$; $p=0,847$) (slika 10.)



Slika 10. Nepostojanje korelacije između postotka mutiranih alela i veličine tumora (Spearmanov test, $N=98$, $R=0,0196$; $t=0,192$; $p=0,847$).

5.3.2. Povezanost mutacije BRAF i učestalosti mutiranih alela BRAF s probojem kapsule štitnjače

Analizirana je povezanost proboja kapsule štitnjače sa stupnjem proširenosti bolesti i postojanjem mutacije *BRAF* V600E. Pokazana je statistički značajna povezanost proboja kapsule štitnjače i proširenosti PKŠ (χ^2 (2,N=167)=6,56; p = 0,038). Nije pokazana povezanost prisutnosti same mutacije s probojem kapsule (χ^2 (1,N=167)=0,373; p = 0,541; tablica 12.).

Tablica 12. Prikaz raspodjele bolesnika s obzirom na stupanj proširenosti bolesti, postojanje mutacije *BRAF* V600E i prisutnosti proboja kapsule štitnjače

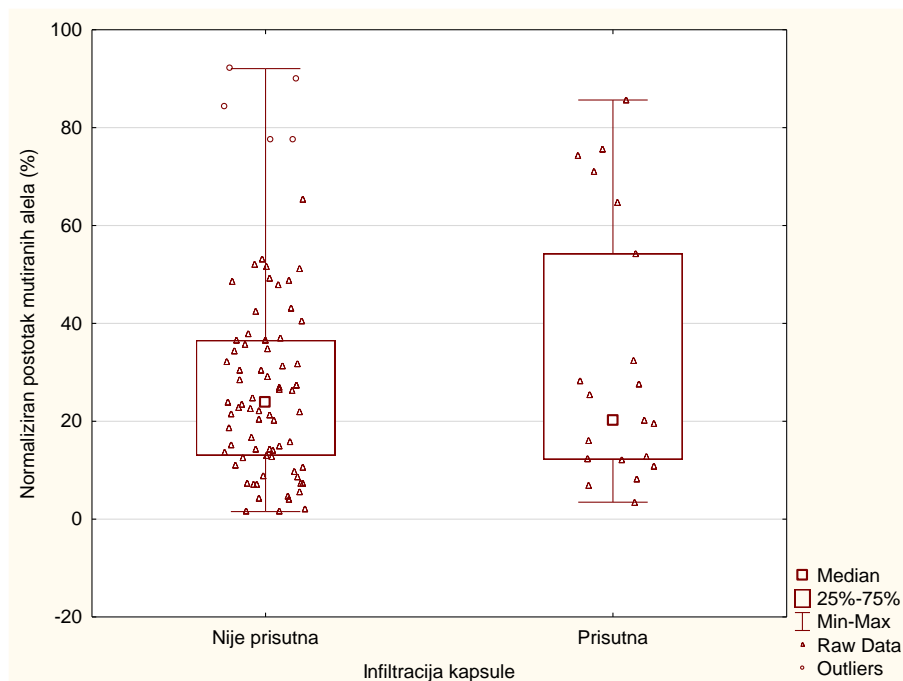
PROŠIRENOST BOLESTI		Proboj kapsule štitnjače /n (%)/		
		Nema	Ima	Ukupno
BEZ DISEMINACIJE	<i>BRAF</i> +	43 (62,3)	7(63,6)	50 (62,5)
	<i>BRAF</i> -	26 (37,7)	4 (36,4)	30 (37,5)
	UKUPNO	69 (86,3)	11 (13,7)	80 (100)
	χ^2 (1,N=80)=0,007; p = 0,933			
LOKALNE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	30 (69,8)	10 (58,8)	40 (66,7)
	<i>BRAF</i> -	13 (30,2)	7 (41,2)	20 (33,3)
	UKUPNO	43 (71,7)	17 (28,3)	60 (100)
	χ^2 (1,N=60)=0,657; p = 0,418			
UDALJENE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	8 (44,4)	4 (44,4)	12 (44,4)
	<i>BRAF</i> -	10 (55,6)	5 (55,6)	15 (55,6)
	UKUPNO	18 (66,7)	9 (33,3)	27 (100)
	χ^2 (1,N=27)=0; p = 1			
SVI	<i>BRAF</i> +	81 (62,3)	21 (56,8)	102 (61,1)
	<i>BRAF</i> -	49 (37,7)	16 (43,2)	65 (38,9)
	UKUPNO	130(77,8)	37(22,2)	167 (100)
	χ^2 (1,N=167)=0,373; p = 0,541			
χ^2 (2,N=167)=6,56; p = 0,038*				
*povezanost proboja kapsule i proširenosti bolesti bez obzira na prisutnost mutacije				

Daljnja analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s probojem kapsule štitnjače nije pokazala statistički značajnu povezanost (Mann Whitney U test; $U=808$, $Z=0$, $p=1,000$; tablica 13; slika 11).

Tablica 13. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s probojem kapsule štitnjače

Postotak mutacija		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	Min.	Maks.	Q1	Q3
<i>Proboj kapsule</i>	<i>DA</i>	21	32,06	26,72	20,12	3,45	85,65	12,22	54,25
	<i>NE</i>	77	28,32	20,91	23,95	1,55	92,06	13,02	36,54

Mann Whitney U test; U=808, Z=0, p=1,000



Slika 11. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s probojem kapsule štitnjače

5.3.3. Povezanost mutacije *BRAF* i učestalosti mutiranih alela *BRAF* s angioinvazijom tumora

Nije pokazana statistički značajna povezanost učestalosti mutiranih alela gena *BRAF* s angioinvazijom tumora (Mann-Whitney U test; $U=72$, $Z=-1,663$, $p=0,096$; tablica 15, slika 12.) unatoč pokazanoj statističkoj povezanosti postojanja *BRAF* mutacije s angioinvazijom ($\chi^2(1, N=132)=4,112$; $p=0,043$; tablica 14).

Tablica 14. Prikaz raspodjele bolesnika s obzirom na stupanj proširenosti bolesti, postojanje mutacije *BRAF* V600E i prisutnost angioinvazije

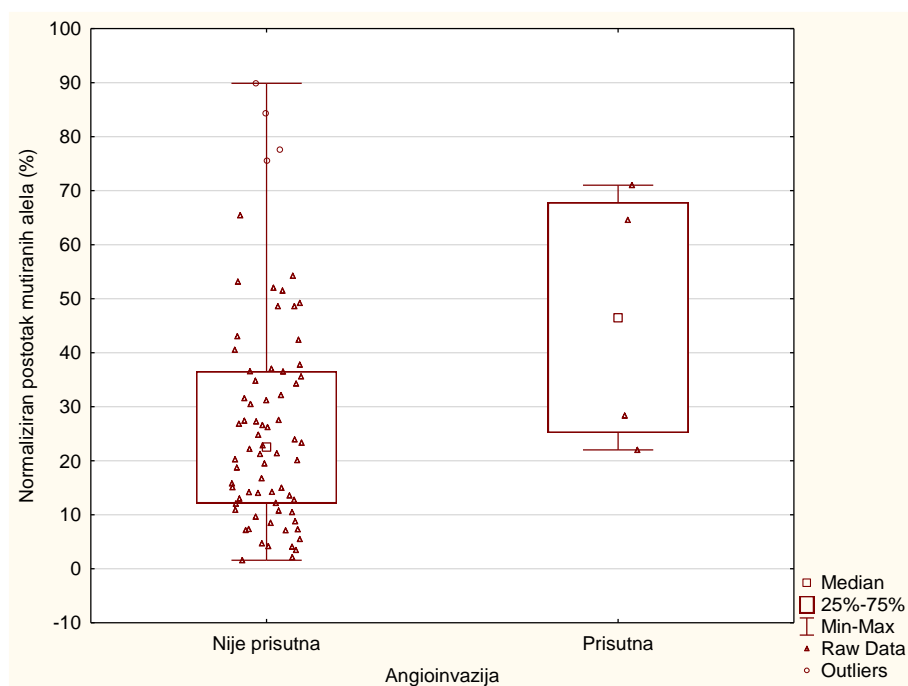
PROŠIRENOST BOLESTI		Angioinvazija /n (%)/		
		Nema	Ima	Ukupno
BEZ DISEMINACIJE	<i>BRAF</i> +	42 (62,7)	1(100)	43 (63,2)
	<i>BRAF</i> -	25 (37,3)	0 (0)	25 (36,8)
	UKUPNO	67 (98,5)	1 (1,5)	68 (100)

LOKALNE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	27 (65,9)	0 (0)	27 (65,9)
	<i>BRAF</i> -	14 (34,1)	0 (0)	14 (34,1)
	UKUPNO	41 (100)	0 (0)	41(100)

UDALJENE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	7 (58,3)	3 (27,3)	10 (44,4)
	<i>BRAF</i> -	5 (41,7)	8 (72,7)	13 (55,6)
	UKUPNO	12 (52,2)	11 (47,8)	23 (100)
	$X^2(1, N=23)=2,253; p=0,133$			
SVI	<i>BRAF</i> +	76 (63,3)	4(33,3)	80 (60,6)
	<i>BRAF</i> -	44 (36,7)	8 (66,7)	52 (39,4)
	UKUPNO	120 (90,9)	12 (9,1)	132(100)
	$X^2(1, N=132)=4,112; p=0,043$			
$X^2(2, N=132)=50,634; p<0,001*$				
*povezanost angioinvazije i proširenosti bolesti bez obzira na prisutnost mutacije				

Tablica 15. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s angioinvazijom

Postotak mutacija		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	Min.	Maks.	Q1	Q3
Angioinvazija	DA	4	46,49	24,88	46,48	22,01	71,01	25,18	67,80
	NE	72	26,91	20,06	22,55	1,59	89,88	12,13	36,53
<i>Mann-Whitney U test; U=)72, Z=-1,663, p=0,096</i>									



Slika 12. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s angioinvazijom

5.3.4. Povezanost mutacije *BRAF* i učestalosti mutiranih alela *BRAF* s diseminacijom u štitnjači

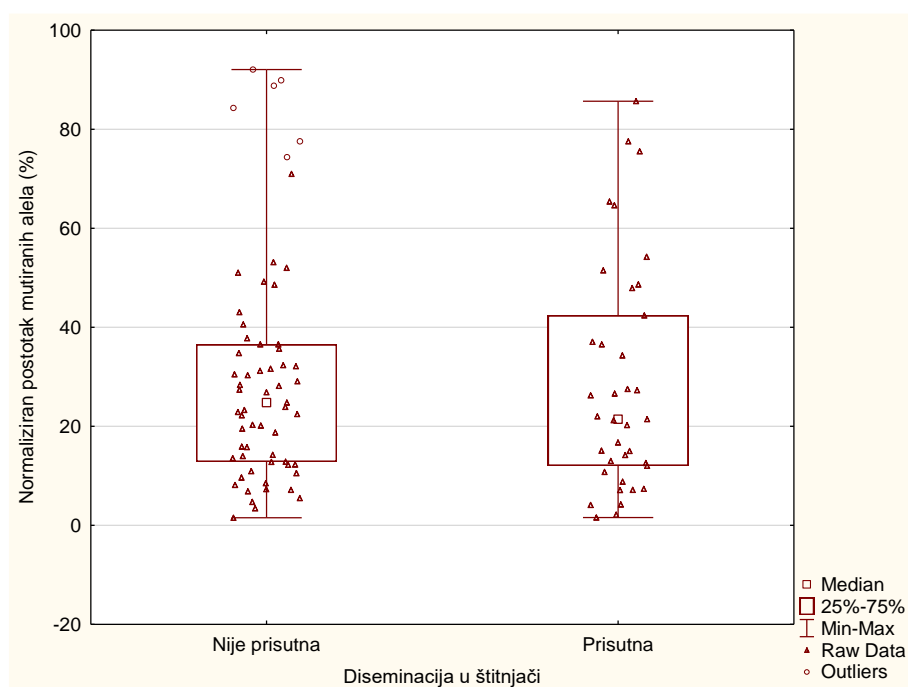
Nije pokazana statistički značajna povezanost postojanja diseminacije unutar štitnjače s *BRAF* V600E mutacijom (χ^2 (1,N=169) = 0.61423; p = 0,433; tablica 16) kao niti sa stupnjem proširenosti bolesti (χ^2 (2,N=169)=3,953; p = 0,139). Također nije pokazana povezanost učestalosti mutiranih alela gena *BRAF* s diseminacijom u štitnjači (Mann-Whitney U test; $U=1052$, $Z=0,557$, $p=0,576$; tablica 17., slika 13.)

Tablica 16. Prikaz raspodjele bolesnika s obzirom na stupanj proširenosti bolesti, postojanje mutacije *BRAF* V600E i diseminaciju unutar štitnjače

PROŠIRENOST BOLESTI		Diseminacija unutar štitnjače /n (%)/		
		Nema	Ima	Ukupno
BEZ DISEMINACIJE	<i>BRAF</i> +	33 (61,1)	17 (63)	50 (61,7)
	<i>BRAF</i> -	21 (38,9)	10 (37)	31 (38,3)
	UKUPNO	54 (66,7)	27 (33,3)	81 (100)
	χ^2 (1,N=81)=0,026; p = 0,872			
LOKALNE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	26 (72,2)	14 (56)	40 (65,6)
	<i>BRAF</i> -	10 (27,8)	11 (44)	21 (34,4)
	UKUPNO	36 (59)	25 (41)	61 (100)
	χ^2 (1,N=61)= 1.720; p = 0,190			
UDALJENE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	5 (41,7)	7 (46,7)	12 (44,4)
	<i>BRAF</i> -	7 (58,3)	8 (53,3)	15 (55,6)
	UKUPNO	12 (44,4)	15 (55,6)	27 (100)
	χ^2 (1,N=27)=0,068; p = 0,795			
SVI	<i>BRAF</i> +	64 (62,7)	38 (56,7)	102 (60,4)
	<i>BRAF</i> -	38 (37,3)	29 (43,3)	67 (39,6)
	UKUPNO	102(60,4)	67(39,6)	169(100)
	χ^2 (1,N=169)=0,614; p = 0,433			
χ^2 (2,N=169)=3,953; p = 0,139*				
*povezanost diseminacije unutar štitnjače i proširenosti bolesti bez obzira na prisutnost mutacije				

Tablica 17. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s diseminacijom u štitnjači

Postotak mutacija		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	Min.	Maks.	Q1	Q3
<i>Diseminacija u štitnjači</i>	<i>DA</i>	37	28,81	23,12	21,42	1,59	85,65	12,05	42,39
	<i>NE</i>	61	30,35	23,08	24,81	1,55	92,06	12,84	36,53
<i>Mann-Whitney U test; U=1052, Z=0,557, p=0,576</i>									



Slika 13. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s diseminacijom u štitnjači

5.3.5. Povezanost mutacije *BRAF* i učestalosti mutiranih alela *BRAF* sa širenjem primarnog tumora izvan štitnjače

Iako je pokazana statistički značajna povezanost širenja izvan štitnjače i stupnja proširenosti PKŠ, nije pokazana statistički značajna povezanost s postojanjem same mutacije *BRAF* V600E ($\chi^2 (1, N=164) = 0,028$; $p=0,866$, tablica 18.). kao ni s učestalosti mutiranih alela gena *BRAF* V600E (Mann-Whitney U test, $U=776$, $Z=0,54$, $p=0,589$; tablica 19., slika 14.).

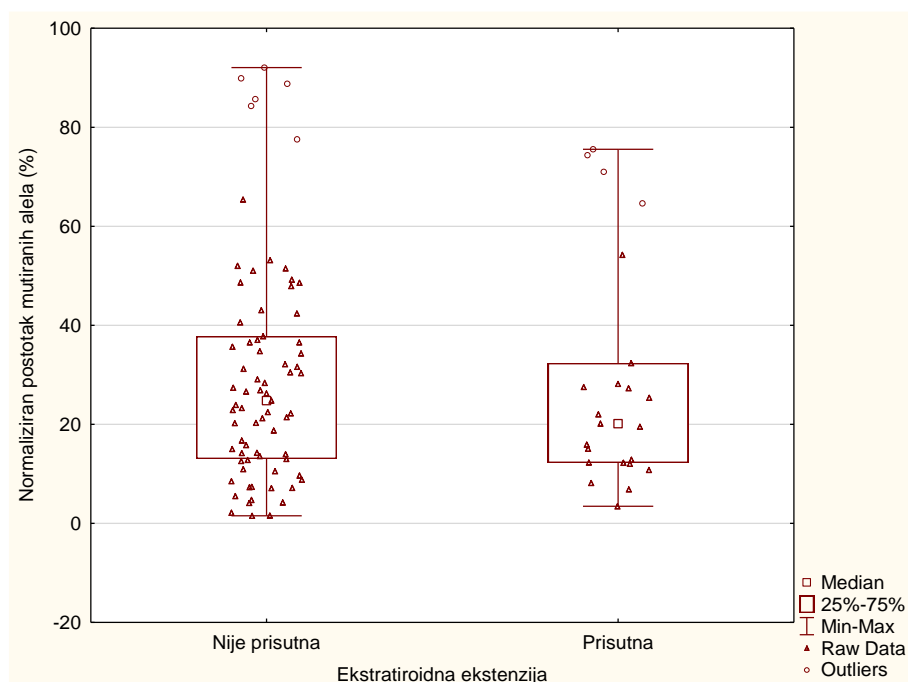
Tablica 18. Prikaz raspodjele bolesnika s obzirom na stupanj proširenosti bolesti, postojanje mutacije *BRAF* V600E i prisutnosti širenja primarnog tumora izvan štitnjače

PROŠIRENOST BOLESTI		Širenje primarnog tumora u tkiva izvan štitnjače /n (%)/		
		Nema	Ima	Ukupno
BEZ DISEMINACIJE	<i>BRAF</i> +	44 (61,1)	6(75)	43 (53,8)
	<i>BRAF</i> -	28 (38,9)	2 (25)	25 (46,2)
	UKUPNO	72 (90)	8 (10)	80 (100)
	$\chi^2 (1, N=80)=0,593$; $p = 0,441$			
LOKALNE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	25 (64,1)	12 (66,7)	37 (64,9)
	<i>BRAF</i> -	14 (35,9)	6 (33,3)	20 (35,1)
	UKUPNO	39 (68,4)	18 (31,6)	57 (100)
	$\chi^2 (1, N=57)=0,036$; $p = 0,850$			
UDALJENE METASTAZE	<i>BRAF</i> +	8 (50)	5 (45,5)	13 (48,1)
	<i>BRAF</i> -	8 (50)	6 (54,5)	14 (51,9)
	UKUPNO	16 (59,3)	11 (40,7)	27 (100)
	$\chi^2 (1, N=27)=0,054$; $p = 0,816$			
SVI	<i>BRAF</i> +	77 (60,6)	23(62,2)	100 (61)
	<i>BRAF</i> -	50 (39,4)	14(37,8)	64 (39)
	UKUPNO	127 (77,4)	37(22,6)	164 (100)
	$\chi^2 (1, N=164)=0,028$; $p = 0,866$			
$\chi^2 (2, N=164)=14,986$; $<0,001$ *				

*povezanost širenja primarnog tumora izvan štitnjače i proširenosti bolesti bez obzira na prisutnost mutacije

Tablica 19. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* sa širenjem primarnog tumora izvan štitnjače

Postotak mutacija		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	Min.	Maks.	Q1	Q3
Širenje tumora izvan štitnjače	DA	23	28,34	22,87	20,12	3,45	75,56	12,22	32,38
	NE	73	29,72	22,63	24,81	1,55	92,06	13,03	37,80
Mann-Whitney U test, U=776, Z=0,54, p=0,589									



Slika 14. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* sa širenjem primarnog tumora izvan štitnjače

5.3.6. Povezanost mutacije *BRAF* i učestalosti mutiranih alela *BRAF* s probojem kapsule limfnog čvora

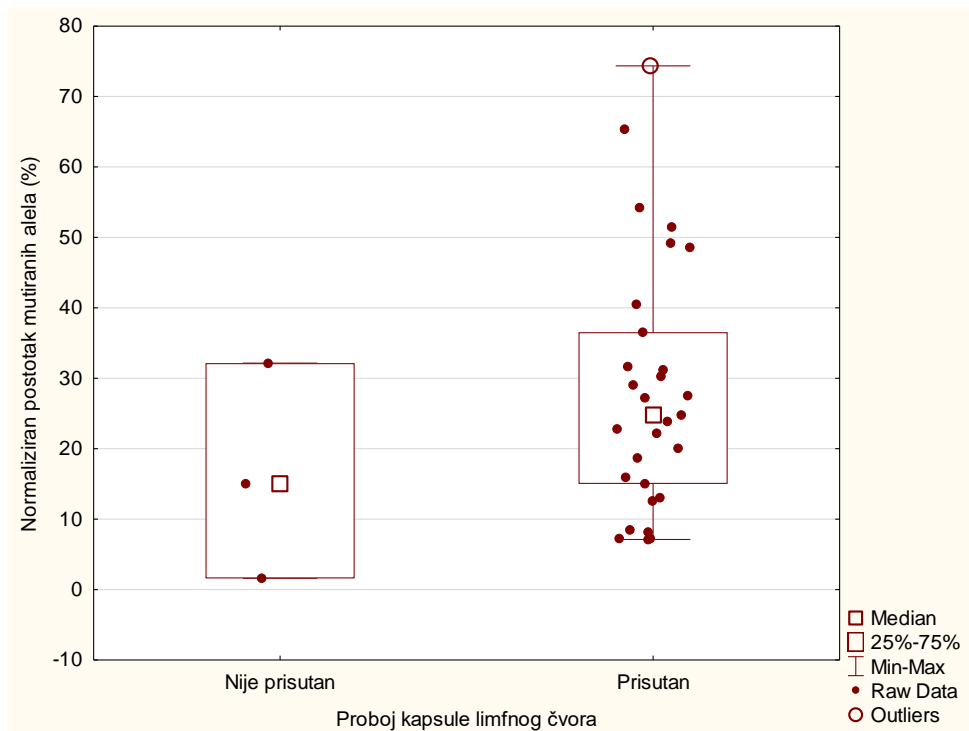
Ukoliko su bile prisutne limfne metastaze analizirana je povezanost proboja čahure limfnog čvora s postojanjem mutacije *BRAF* V600E te učestalosti mutiranih alela gena *BRAF*. Nije pokazana statistički značajna povezanost ni s postojanjem mutacije ($\chi^2(1, N=47) = 1.03529; p=0,309$; tablica 20.) ni njenom učestalošću (Mann Whitney U test; $U=29, Z=-0,905, p=0,365$; tablica 21., slika 15.).

Tablica 20. Povezanost prisutnosti mutacije s probojem kapsule limfnog čvora

<i>Proboj kapsule limfnog čvora</i>	<i>Broj bolesnika</i>		
	S mutacijom	Bez mutacije	Ukupno
Prisutan	3	3	6
Nije prisutan	29	12	41
	32	15	47
$(\chi^2(1, N=47) = 1.03529; p=0,309)$			

Tablica 21. Analiza povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s probojem kapsule limfnog čvora

Postotak mutacija		N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	Min.	Maks.	Q1	Q3
<i>Proboj čahure limfnog čvora</i>	<i>DA</i>	3	16,28	15,32	15,09	1,59	32,15	1,59	32,15
	<i>NE</i>	29	28,45	17,93	24,81	7,11	74,35	14,99	36,54
$Mann\ Whitney\ U\ test; U=29, Z=-0,905, p=0,365$									



Slika 15. Grafički prikaz povezanosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* s probojem kapsule limfnog čvora

5.4. Povezanost mutacije *BRAF* i učestalosti mutiranih alela

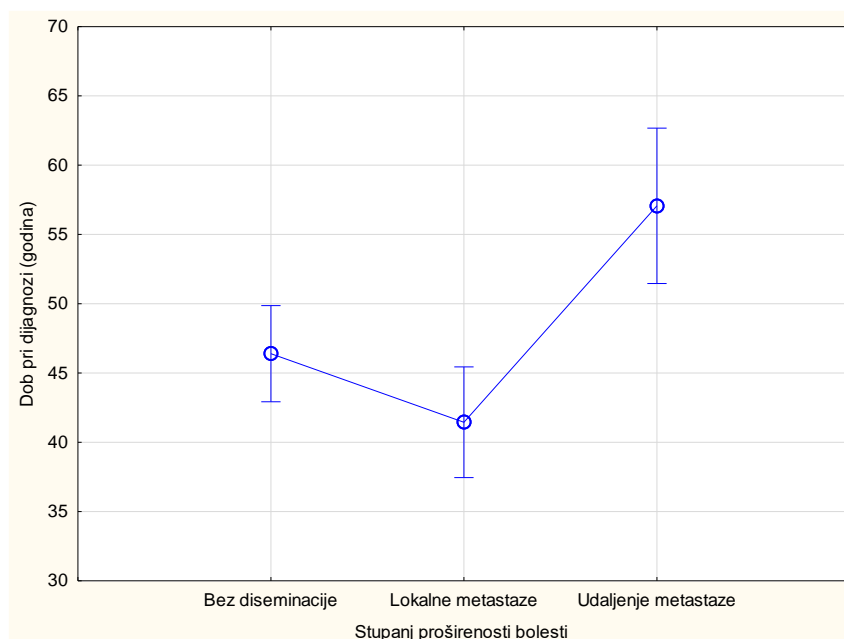
BRAF s dobi i spolom ispitanika

Primijećeno je da se bolesnici s udaljenim metastazama prezentiraju u starijoj životnoj dobi (ANOVA, $F(2,170)=10,046$, $p < 0,001$; tablica 22, slika 16), no, nije pokazana statistički značajna korelacija između postotka mutiranih alela i dobi postavljanja dijagnoze (Spearmanov test, $N=100$; $t=0,311$; $p=0,756$, slika 17.)

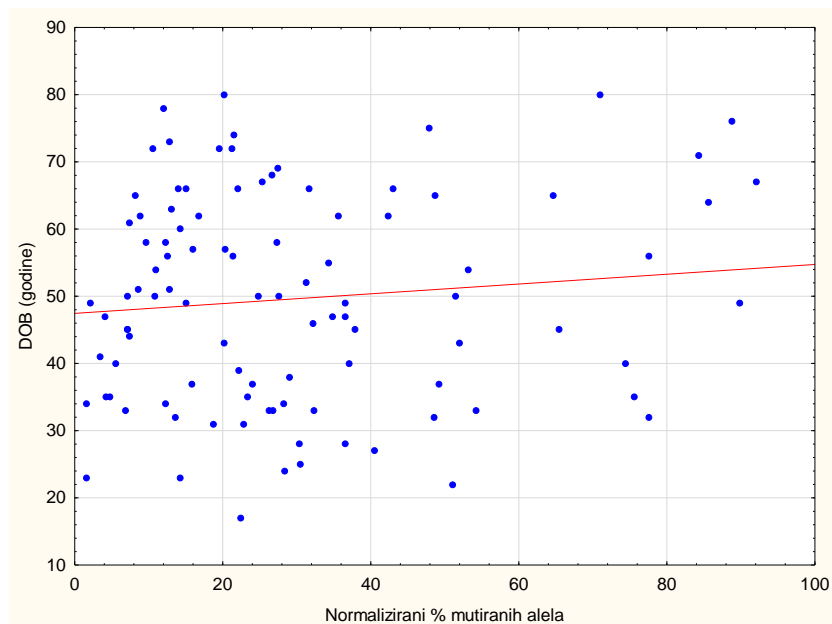
Tablica 22. Dob prilikom dijagnoze PKŠ u odnosu na stupanj proširenosti bolesti

Dob pri dijagnozi				
Proširenost bolesti	Aritmetička sredina	CI -95,00%	CI +95,00%	N
Bez diseminacije	46,39	42,93	49,86	81
Lokalne metastaze	41,44	37,45	45,44	61
Udaljene metastaze	57,06	51,46	62,67	31

ANOVA, $F(2,170)=10,046$, $p < 0,001$

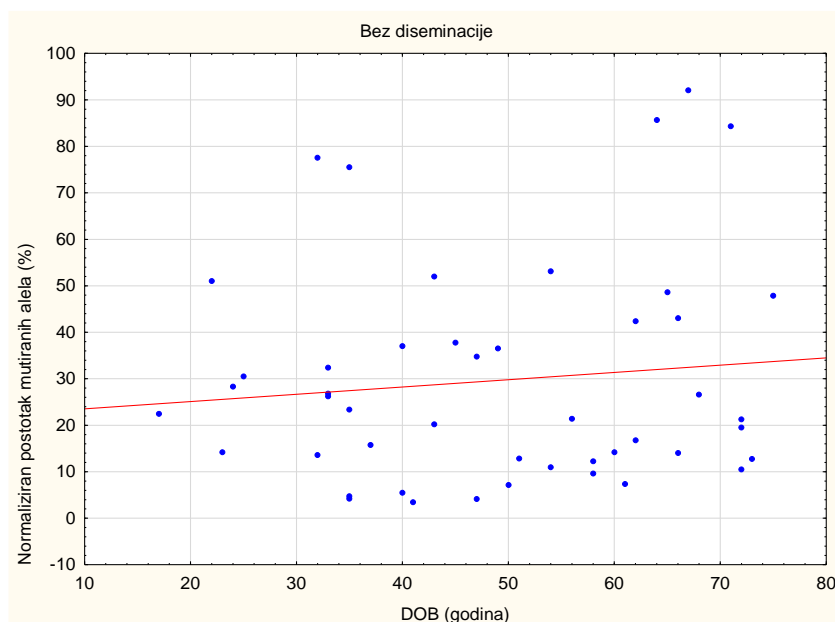


Slika 16. Grafički prikaz raspodjele dobi bolesnika prilikom dijagnoze PKŠ u odnosu na tri stupnja proširenosti PKŠ

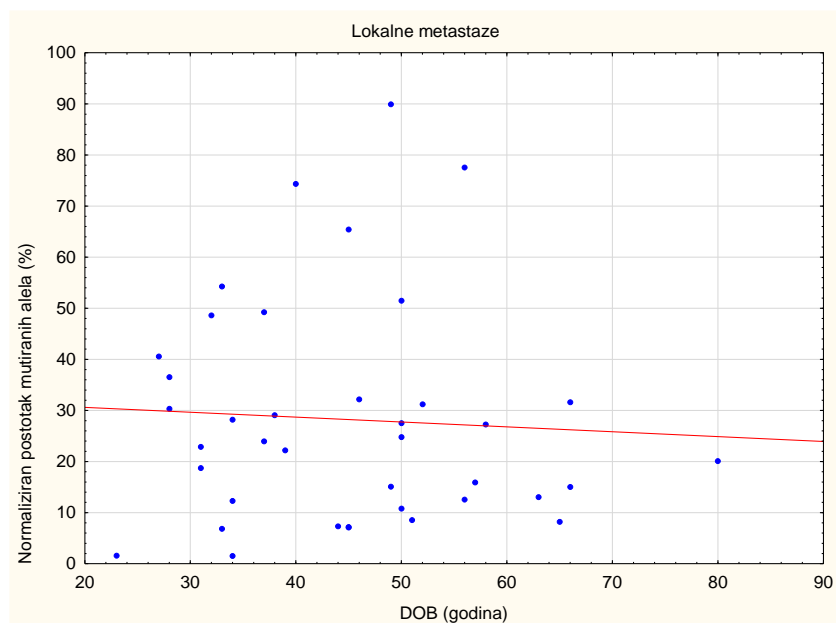


Slika 17. Korelacija između postotka mutiranih alela i dobi bolesnika pri postavljanju dijagnoze (Spearmanov test, $N=100$, $R=0,0314$; $t=0,311$; $p=0,756$)

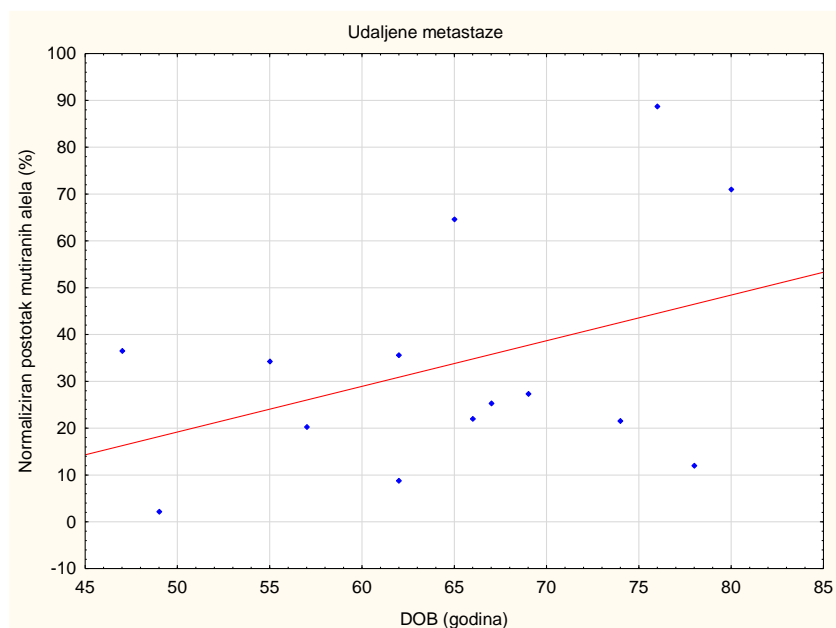
Takva korelacija nije pokazana statistički značajnom niti analizom pojedinih skupina bolesnika podijeljenih po stupnju diseminacije bolesti (slike 18,19, 20)



Slika 18. Prikaz odnosa normaliziranog udjela mutiranih alela *BRAF* i dobi pri dijagnozi, u bolesnika bez proširene bolesti (Spearmanov test, $R=0,029509$; $N=47$; $t=-0,198$; $p=0,844$)



Slika 19. Prikaz odnosa normaliziranog udjela mutiranih alela *BRAF* i dobi pri dijagnozi, u bolesnika s lokalno proširenom bolesti (Spearmanov test, N=39; R=-0,06283; t=-0,383; p=0,704)



Slika 20. Prikaz odnosa normaliziranog udjela mutiranih alela *BRAF* i dobi pri dijagnozi, u bolesnika s udaljenim metastazama (Spearmanov test, N=14;R=0,2354; t=-0,839; p=0,418)

Analizom podjele bolesnika prema stupnju proširenosti bolesti i prema postojanju mutacije *BRAF* V600E nije ustanovljena značajna razlika u raspodjeli ovisno o spolu ($\chi^2=1.2859$; $p=0,257$; tablica 23.) no pokazana je statistički značajna povezanost muškog spola s postojanjem udaljenih metastaza ($\chi^2=11.9937$. $p=0,002$; tablica 24.)

Tablica 23. Podjela bolesnika prema postojanju mutacije *BRAF* V600E i spolu

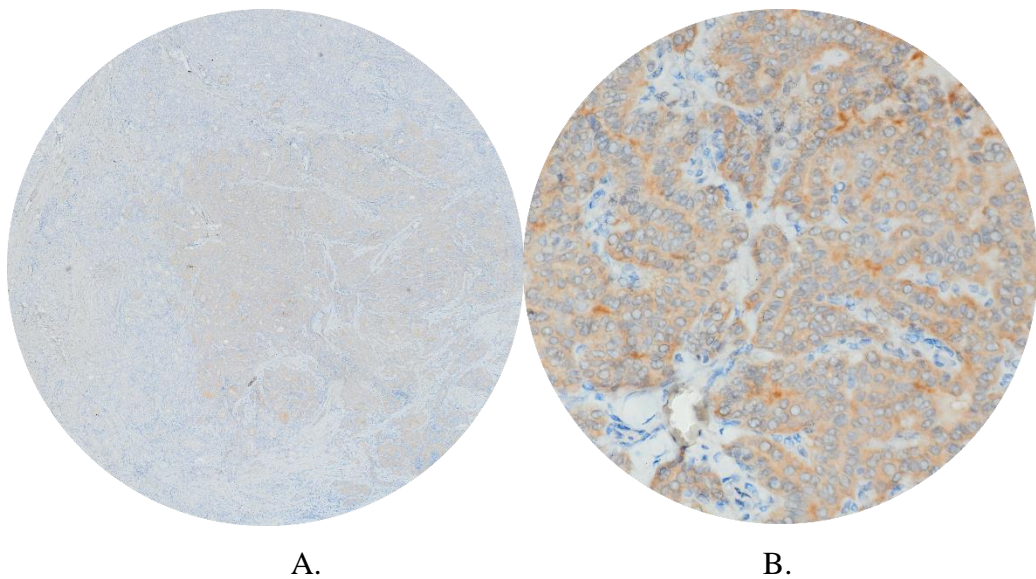
<i>Spol</i>	<i>Broj bolesnika</i>		
	S mutacijom	Bez mutacije	Ukupno
muški	42	22	64
ženski	62	47	109
	104	69	173
$\chi^2 (1, N=173) = 1.2859; p = 0,257$			

Tablica 24. Podjela bolesnika prema proširenosti bolesti i spolu

Proširenost bolesti	Spol /n (%)/		
	Žena	Muškarac	Ukupno
Bez diseminacije	61 (75,3)	20 (24,7)	81
Lokalne metastaze	35 (57,4)	26 (42,6)	61
Udaljene metastaze	13 (41,9)	18 (58,1)	31
UKUPNO	109 (63,0)	64 (37,0)	173
$\chi^2 (1, N=173) = 11.9937. p = 0,002$			

5.5. Usporedba vrijednosti mutiranih alela *BRAF* V600E dobivenih metodom qPCR i metodom imunohistokemije

Bojanje BRAF V600E mutiranog proteina metodom imunohistokemije (slika 21.) napravljeno je na 45 uzoraka, od kojih je 43 bilo uključeno u daljnju analizu. Dva preostala uzorka nisu uključena u analizu, pri čemu su isključni kriteriji za daljnju analizu nejasno citoplazmatsko bojanje tumorskih stanica te bojanje stromalnih stanica. Od navedenih, 13 je bilo negativno na postojanje BRAF mutiranog proteina, isti uzorci su bili negativni u qPCR analizi *BRAF* V600E mutacije. Ukupno 30 uzoraka je imunohistokemijskom analizom bilo pozitivno, od kojih je 29 bilo pozitivno analizom qPCR. Jedini uzorak koji je qPCR pokazan kao negativan, a imunohistokemijskim bojanjem pozitivan imao je 5% udjela BRAF mutiranog proteina.



Slika 21. Mutirani protein BRAF dokazan metodom imunohistokemije.

Povećanja: A. 40x; B. 400x.

Test Cohen's kappa pokazao je vrlo dobru podudarnost između rezultata analize BRAF mutacije dobivene dvjema metodama (tablica 25, Cohen's Kappa = 0,9460; % podudarnosti: 97,67).

Tablica 25. Podudarnost rezultata *BRAF* V600E mutacije i imunohistokemijske analize promjenjenog proteina *BRAF* V600E

Cohen's Kappa	<i>BRAF</i> V600E mutirani protein pozitivan	<i>BRAF</i> V600E mutirani protein negativan
<i>BRAF</i> V600E pozitivan	29	0
<i>BRAF</i> V600E negativan	1	13
<i>Cohen's Kappa = 0,9460; % podudarnosti: 97,67</i>		

U slučaju pozitivnog nalaza na imunohistokemijskoj analizi, određen je i postotak stanica u tumoru koji izražava *BRAF* mutirani protein, a raspon je iznosio od 5% do 100% udjela tumora s medijanom od 95%, rezultati prikazani u tablici 26.

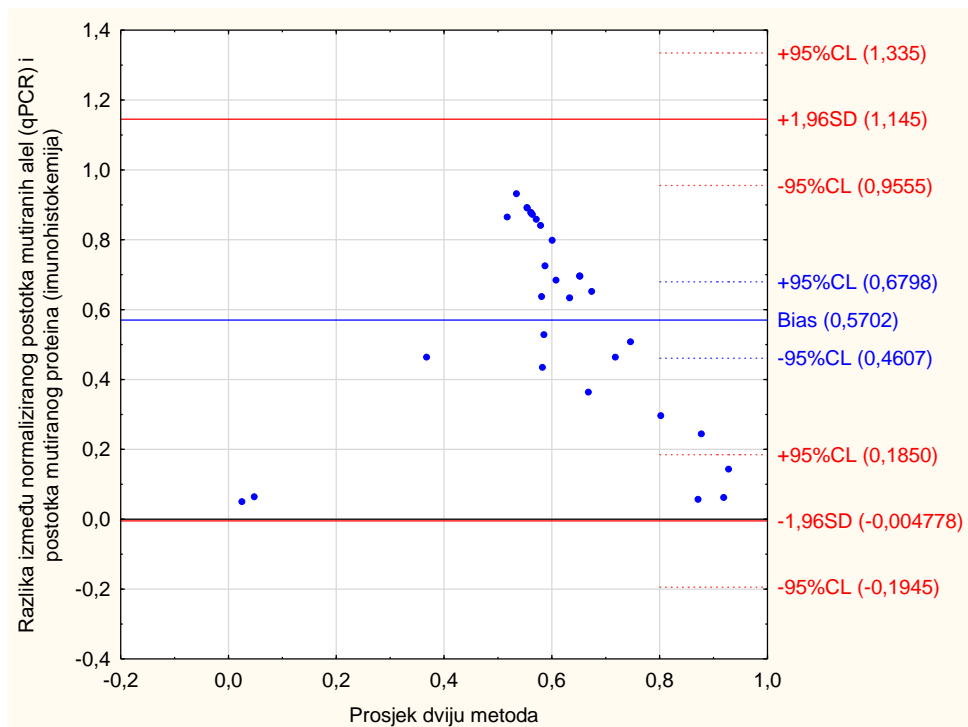
Tablica 26 - Prikaz rezultata dobivenih metodom qPCR i metodom imunohistokemije po pojedinom uzroku.

REDNI broj	postotak mutacije <i>BRAF</i> V600E (qPCR)	Procijenjeni postotak stanica tumora u rezu tkiva	Normalizirani postotak mutacije <i>BRAF</i> V600E	Postotni udio mutiranog proteina <i>BRAF</i> V600E u rezu tkiva
1.	41,6%	55%	75,56%	100
2.	27,8%	80%	34,80%	100
3.	25,7%	30%	85,65%	100
4.	15,1%	75%	20,12%	100
5.	14,8%	30%	49,22%	100
6.	8,2%	75%	10,93%	100
7.	6,4%	40%	15,92%	100
8.	6,2%	50%	12,32%	100
9.	6,1%	20%	30,48%	100
10.	4,5%	65%	6,88%	100
11.	4,3%	30%	14,18%	100
12.	3,1%	25%	12,22%	100
13.	3,0%	10%	30,35%	100
14.	2,7%	25%	10,80%	100
15.	1,9%	15%	12,79%	100
16.	23,7%	75%	31,61%	95
17.	19,6%	30%	65,42%	95
18.	16,9%	20%	84,30%	95

19.	9,7%	20%	48,64%	95
20.	6,6%	25%	26,59%	95
21.	5,6%	25%	22,48%	95
22.	4,3%	50%	8,52%	95
23.	23,0%	25%	92,06%	90
24.	11,8%	45%	26,24%	90
25.	14,6%	30%	48,61%	85
26.	14,5%	45%	32,15%	85
27.	11,0%	30%	36,54%	80
28.	0,7%	5%	13,59%	60
29.	1,0%	60%	1,59%	8
30.	0,0%			5
31.	0,0%			0
32.	0,0%			0
33.	0,0%			0
34.	0,0%			0
35.	0,0%			0
36.	0,0%			0
37.	0,0%			0
38.	0,0%			0
39.	0,0%			0
40.	0,0%			0
41.	0,0%			0
42.	0,0%			0
43.	0,0%			0

Kod 43 uzorka analiziranih metodom imunohistokemije prikazana je usporedba postotnog udjela mutiranih alela *BRAF* V600E prije i nakon normalizacije s udjelom tumorskog tkiva u uzorku. Rezultati dobiveni metodom qPCR uspoređeni su s postotnim udjelom stanica s mutiranim *BRAF* V600E proteinom određenim metodom imunohistokemije. Uzorci su prikazani od najveće prema najmanjoj vrijednosti izražaja signala imunohistokemije.

Metodom Bland-Altman pokazana je podudarnost udjela mutiranih alela *BRAF* V600E (qPCR) i udjela mutiranog proteina *BRAF* (imunohistokemija) (bias = 57,02 %, bias je prosječna razlika između vrijednosti rezultata dviju metoda za svaki pojedini uzorak, slika 22). Grafička usporedba udjela *BRAF* mutacija u tkivu tumora učinjena dvjema metodama prikazana je na slici 22. za sve *BRAF* V600E pozitivne bolesnike.



Slika 22. Statističkom metodom Bland-Altman grafički je prikazan odnos udjela mutiranog alela *BRAF* V600E i *BRAF* mutiranog proteina. Plavom linijom je označena vrijednosti za bias (prosječna razlika između vrijednosti rezultata za svaki pojedini uzorak), a dvjema crvenim linijama označene su granice slaganja metoda.

6. RASPRAVA

Karcinom štitnjače je čest tumor sa značajnim porastom incidencije pri čemu Hrvatska zauzima 4. mjesto prema dobno standardiziranoj stopi incidencije u Europi [7,8]. Učestalost benignih čvorova u štitnjači je značajno češća u odnosu na zloćudne tvorbe, a njihovo razlikovanje zahtjeva daljnje dijagnostičke postupke kako bi se otklonila sumnja na zloćudnu bolest. Posljednjih godina, pojačanim probirom u općoj populaciji, prvenstveno u razvijenim zemljama svijeta, ustanovilo se jasno povišenje incidencije PKŠ, no bez pratećeg povećanja mortaliteta [10,109]. Navedeni podatak podržava spoznaju da je PKŠ zapravo indolentan tumor vrlo dobre prognoze. Otkrivanje novih subkliničkih slučajeva te liječenje i dugogodišnje praćenje bolesnika sa slabo agresivnom bolesti predstavlja značajno opterećenje za bolesnika, ali i zdravstveni sustav.

U dijagnostici bolesti štitnjače je stoga neophodna učinkovita selekcija bolesnika. Selekcija se može učiniti u početnoj fazi obrade bolesnika, kada se prema UZV obilježjima nastoji procijeniti za koje čvorove je nužna daljnja obrada u obliku citološke punkcije. Mnogo istraživanja je usmjereno na citološku punkciju suspektog čvora u štitnjači tijekom koje se može uzeti dodatni uzorak za molekularnu analizu potencijalnih tumorskih biljega. Cilj analize tumorskih biljega je doprinijeti točnijoj procjeni malignosti te procjeni potrebe za operativnim zahvatom [32]. Genski biljezi poput prisustva *BRAF* mutacije u citološkom uzorku pokazali su visoku specifičnost, no nisku osjetljivost [51]. Postupkom citološke punkcije moguće je procijeniti samo postojanje ili odsustvo mutacije *BRAF*, dok je njenu heterogenost u tkivu tumora moguće utvrditi jedino po postoperativnoj analizi.

Ukoliko se pacijentu postoperativno patohistološki potvrdi PKŠ detaljnijom procjenom genskih promjena na patohistološkom preparatu možemo pokušati procijeniti potencijalnu agresivnost bolesti. Iako je PKŠ indolentan tumor koji najčešće dolazi kao lokalizirana bolest ili uz limfogene metastaze, rijetko može davati i hematogene metastaze koje nose povećan rizik recidiva i povećanu stopu smrtnosti [32,60]. Znajući da je već samo postojanje mutacije *BRAF* kriterij za razvrstavanje PKŠ u stadij većeg rizika [32], cilj je ovog istraživanja bio razjasniti da li je udio stanica tumora s *BRAF* V600E mutiranim alelom u papilarnom karcinomu štitnjače povezan sa stupnjem proširenosti bolesti.

6.1 Heterogenost tumora s obzirom na udio mutiranih alela

Prilikom razmatranja važnosti udjela stanica tumora koje nose mutaciju gena *BRAF* pretpostavljamo postojanje heterogenosti mutacija u tkivu tumora. PKŠ je dosada bio opisivan kao pretežito genetski homogeni tumor, s pokretačkim mutacijama u genima kao što su *BRAF* i *RAS* koje su uglavnom međusobno isključujuće. Stoga je predložena podjela PKŠ na *BRAF*-slične i *RAS*-slične tumore [6]. Usto, Ghossein i suradnici su rezultatima dobivenim metodom imunohistokemije *BRAF* mutiranih proteina podržavali stav o homogenoj tj. klonalnoj prirodi mutacije *BRAF* u PKŠ [110]. Bitno je naglasiti da su u navedenom istraživanju podaci o udjelu ekspresije *BRAF* mutiranog proteina u tumoru korelirani jedino s postojanjem mutacije gena *BRAF*, a ne i udjelom mutiranih alela [110].

Prema našim rezultatima postoji jasna heterogenost *BRAF* mutiranih alela u tkivu PKŠ, pokazana metodom qPCR. Normalizirane vrijednosti učestalosti mutiranih alela *BRAF* su se kretale u rasponu od 1,55% do 92,06%, s medijanom od 23,33% (slika 6.) što upućuje na oligoklonalni razvoj većine tumora obrađenih u istraživanju. U odnosu na navedeno, metodom imunohistokemije dobiveni su rezultati koji ne govore u prilog heterogenosti i sugeriraju homogenu distribuciju mutacije, što je u skladu s ranije navedenim rezultatima Ghoseina i suradnika [110]. Noviji znanstveni radovi u kojima je istraživana patogeneza karcinoma štitnjače većinom podržavaju koncept intratumoralne heterogenosti PKŠ. Heterogenost *BRAF* mutacije je u navedenim studijama analizirana prvenstveno metodom qPCR i određivanjem udjela *BRAF* mutiranih alela poput istraživanja Guerre i suradnika koji su na većini analiziranih uzoraka opisao oligoklonalno postojanje mutacije [101]. Slične rezultate su opisali Kim i suradnici koji su otkrili da je medijan učestalosti *BRAF* V600E mutiranih alela 20% te Finkel i suradnici koji su otkrili raspon *BRAF* mutiranih alela od 12% do 39% [111,112]. Istraživanja Gandolfija i suradnika kao i De Biase i suradnika su također pokazala heterogenost *BRAF* mutacije te su usto i potvrdili rezultate imunohistokemijskom analizom mutiranog *BRAF* proteina [102,103]. S druge strane, istraživanja Colombo i suradnika kao i Masoodi i suradnika su pokazala postojanje heterogenosti *BRAF* mutacije tek u manjem broju slučajeva, dok je većina analiziranih slučajeva pokazivala klonalni razvoj bolesti [96,113]. U slučaju postojanje prave heterogenosti PKŠ dovodi se u pitanje tradicionalni model patogeneze PKŠ prema kojem postoje mutacije pokretači karcinogeneze [63].

Prema tradicionalnom modelu, nastanak tumora je proces koji se događa u više koraka te podrazumijeva pokretačku mutaciju koja stvara homogenu klonalnu populaciju stanica koja se kasnije, tijekom progresije tumora, može mijenjati stjecanjem drugih mutacija. Najbolji primjer je PKŠ s pokretačkom *BRAF* mutacijom te naknadno stečenom *TERT* ili *TP53* mutacijom, koji vode u pojačanu agresivnost bolesti i dediferencijaciju tumora [114]. Ako je heterogenost pravilo, a ne slučajnost, tada bi, osim ranije opisanih mutacija u genima *BRAF*, *KRAS* i *RET/PTC*, morali postojati i drugi mehanizmi koji bi bili inicijatori nastanka tumora. Naime, to bi značilo da navedene mutacije mogu nastati i kasnije i to samo u subpopulaciji stanica tumora. S druge strane, model tumorskih matičnih stanica PKŠ ističe ulogu nediferenciranih fetalnih stanica štitnjače u razvoju karcinoma. Prema ovom modelu se iz nediferenciranih fetalnih stanica štitnjače u različitim stupnjevima razvoja može pokrenuti karcinogeneza. U takvom tumoru, koji nije nastao iz diferenciranih tireocita što predlaže standardni model, mogu naknadno nastati genske promjene u manjim subpopulacijama stanica i stoga s različitim stupnjevima agresivnosti [115].

Heterogenost mutacija i subpopulacije stanica predstavljaju prostornu heterogenost unutar iste tumorske lezije. Kako pojedine subpopulacije stanica primarnog tumora, zbog stečenih mutacija, poprimaju agresivnije karakteristike, povećava se i mogućnost diseminacije bolesti. Nastale mestastatske lezije, bilo lokalne ili udaljene, nositi će drugačija genetska obilježja ovisno o tome od koje subpopulacije stanica primarnog tumora su potekle, što predstavlja vremensku heterogenost [116]. Razlika u mutacijama, a time i u karakteristikama stanica tumora primarne lezije i njenih metastaza, može značajno utjecati na planiranje liječenja jer se mijenja priroda bolesti [117]. Prema dostupnim podacima, iako je heterogenost mutacija češća u drugim tipovima karcinoma poput melanoma, koji prosječno nosi 8-10 klonova stanica u tumoru, ona postoji i u PKŠ, iako se PKŠ smatra jednim od najmanje heterogenih tumora [118]. Neovisno o prihvaćenom modelu patogeneze, heterogenost mutacija ili poliklonalnost primarnog tumora PKŠ zasada predstavljaju još uvijek nerazjašnjen utjecaj na kliničko-patološku prezentaciju bolesti.

6.2 Povezanost mutacije *BRAF* V600E i heterogenosti mutiranih alela s proširenosti papilarnog karcinoma štitnjače

PKŠ je tumor dobre prognoze, a kao jedna od bitnih značajki je niska tendencija metastaziranja. Učestalost lokalnih limfogenih metastaza iznosi oko 25-30% [119]. Udaljene metastaze su vrlo rijetke, pojavljuju se u manje od 4% slučajeva pri inicijalnoj prezentaciji bolesti [120], a pretežito zahvaćaju pluća i kosti [121]. Iako je bio upitan utjecaj lokalnih metastaza na preživljenje [32], utvrđena je statistički značajna razlika u preživljenju *BRAF* V600E pozitivnih bolesnika i *BRAF* negativnih bolesnika u slučaju postojanja lokalnih metastaza [122]. Statistički značajno povećanje smrtnosti je ujedno prisutno kod bolesnika s lokalnim metastazama u dobi iznad 45 godina [123]. Udaljene metastaze, iako vrlo rijetko prisutne utječu i na pojavu recidiva kao i na smrtnost. Stoga postojanje udaljenih metastaza bolesnike odmah klasificira u stupanj visokog rizika, neovisno o drugim karakteristikama bolesti [32,60]. Prisutnost *BRAF* V600E mutacije je također prepoznata kao čimbenik rizika te je uvrštena u ATA sustav klasificiranja gdje samostalno svrstava bolesnike u skupinu srednjeg rizika, a ako je uz *BRAF* mutaciju prisutna i *TERT* mutacija u skupinu visokog rizika [32]. U našem istraživanju udio *BRAF* V600E pozitivnih bolesnika je 60% (tablica 6.), što je unutar očekivane pojavnosti *BRAF* mutacije, koja prosječno iznosi oko 45% [72,124], no opisane su razlike među istraživanjima s rasponom učestalosti *BRAF* mutacija od 27,3% do 87,1% slučajeva [71,125].

Ovim istraživanjem nismo pokazali statistički značajnu povezanost između postojanja *BRAF* V600E mutacije sa stupnjem proširenosti bolesti ($p=0,154$; Tablica 6). Ranija istraživanja su pokazala međusobno kontradiktorne rezultate s obzirom na povezanost postojanja *BRAF* V600E mutacije i proširenosti bolesti u bolesnika s PKŠ. U većini dosadašnjih istraživanja opisana je statistički značajna povezanost prisustva *BRAF* V600E mutacije i udaljenih metastaza PKŠ, korištenjem univarijatne analize [66,126]. Utjecaj *BRAF* V600 mutacije na limfogene lokalne metastaze je istraživao u više studija uz kontradiktorne rezultate. Većinom se opisuje povezanost *BRAF* mutacije i postojanja lokalnih metastaza [126–129], no studija Sapio i suradnika navodi statistički jasnu povezanost *BRAF* mutacije s odsustvom lokalnih metastaza [130]. S druge strane, studija Gandolfija i suradnika nije pronašla povezanost *BRAF* mutacije niti s lokalnim, niti s udaljenim metastazama [103].

Većina ranijih istraživanja koja su u obzir uzimala i udio *BRAF* mutiranih alela nisu pronašla statistički značajnu povezanost s postojanjem lokalnih metastaza [96,100,102–104]. U suprotnosti s tim su studije Kim i suradnika te Finkel i suradnika, koji su pokazali povezanost lokalnih metastaza s udjelom *BRAF* mutiranih alela u smislu većeg postotka mutiranih alela u bolesnika s lokalnim metastazama [111,112]. Daljnjom analizom podataka našeg istraživanja nije pokazana razlika u vrijednosti normaliziranog udjela mutiranih alela između skupina bolesnika s obzirom na stupanj proširivosti bolesti ($p=0,754$, tablica 8., slika 7.). Ipak, primijećena je veća učestalost mutiranih alela *BRAF* u bolesnika s udaljenim metastazama, u usporedbi s bolesnicima bez metastaza kao i s bolesnicima s lokalnim metastazama (21.4% bolesnika s udaljenim metastazama je imalo više od 60% mutiranih alela, za razliku od 10,6% odnosno 10,3% u ostale dvije skupine; Tablica 9.), no bez statističke značajnosti ($p=0,515$).

U slučaju da učestalost mutiranih alela zaista utječe na razvoj lokalnih metastaza zanimljivo je istražiti i heterogenost *BRAF* mutacije u metastatskom limfnom čvoru. Pokazano je kako postoji nepodudarnost u *BRAF* statusu između primarnog tumora i lokalnih metastaza u čak do 50 % slučajeva [117,131]. No i u slučaju prisutnost *BRAF* mutacije u primarnom tumoru i lokalnim metastazama, neke studije pokazuju klonalnu distribuciju *BRAF* mutacije u obje lezije [5], dok druge prezentiraju heterogenu distribuciju *BRAF* mutiranih alela u lokalnim metastazama [103]. Ukoliko je u lokalnoj metastazi prisutna heterogenost *BRAF* mutacije, pokazan je statistički značajan pad udjela mutiranih alela u odnosu na primarni tumor, ali i značajna povezanost s udjelom mutiranih alela u primarnom tumoru [103]. Navedeni podatak ide u prilog teoriji da su lokalne metastaze sličnih bioloških karakteristika kao primarni tumor, stoga ne utječu na prognozu bolesti istim intenzitetom kao udaljene metastaze s novonastalim mutacijama [103].

Povezanost učestalosti *BRAF* mutiranih alela u primarnom tumoru s udaljenim metastazama je značajno manje istraživana, vjerojatno kao posljedica niske tendencije PKŠ za stvaranje udaljenih metastaza te teško dostupnih bolesnika. Ipak, studija Masoodija i suradnika pokazuje statistički značajnu povezanost udaljene diseminacije s visokim udjelom mutiranih alela primarnog tumora [113], dok Gandolfi i suradnici ne nalaze statističku povezanost [103]. Za razliku od lokalnih metastaza, udaljene metastaze se češće razlikuju od primarnog tumora s obzirom na postojanje *BRAF* mutacije [132],

no u slučaju prisustva mutacije u obje lezije, udio mutacija je veći u metastaza nego li u primarnom tumoru uz češće prisutne novonastale *TERT* mutacije [105]. Naše istraživanje nije pokazalo statistički značajnu povezanost učestalosti *BRAF* mutiranih alela u primarnom tumoru s postojanjem udaljenih metastaza, no nismo analizirali uzorke tkiva metastaza.

6.3 Povezanost mutacije *BRAF* V600E i heterogenosti mutiranih alela gena *BRAF* s kliničkim i patohistološkim karakteristikama bolesti

Znajući da je *BRAF* mutacija najzastupljenija mutacija u PKŠ, ne iznenađuje da postoje brojna istraživanja utjecaja *BRAF* mutacije na negativne patohistološke prognostičke čimbenike bolesti. Istraživanja su pokazala nepodudarne rezultate, što je i rezultiralo daljnjom analizom u obliku istraživanja povezanosti učestalosti mutiranih alela s karakteristikama tumora. Ako je postojanje *BRAF* mutacije heterogeno i pojavljuje se samo u manjem dijelu stanica tumora slijedi da je *BRAF* mutacija kasniji događaj u nastanku tumora i moguće bez utjecaja na agresivnost tumora. Istraživanja su opisala povezanost prisutnosti *BRAF* V600E mutacije s multifokalnošću tumora, bilateralnom prezentacijom tumora (65), infiltracijom kapsule štitnjače [133], veličinom tumora te širenjem primarnog tumora izvan štitnjače [96,98,124]. S druge strane, postoje istraživanja koja negiraju povezanost *BRAF* V600E mutacije s veličinom [97,111], multifokalnosti tumora [111] i širenjem primarnog tumora izvan štitnjače [66]. Istraživanja učestalosti mutiranih alela također nisu pokazala jasnu podudarnost rezultata, pri čemu pojedine studije opisuju povezanost oligoklonalne *BRAF* mutacije s manjom veličinom tumora [102,111,112] i manjom učestalošću širenja primarnog tumora izvan štitnjače [111], dok druge odbacuju takvu povezanost [96,100].

U našem istraživanju analizirali smo povezanost postojanja *BRAF* V600E mutacije kao i normalizirane vrijednosti mutiranih alela *BRAF* V600E sa svim dostupnim patohistološkim karakteristikama bolesti. Naši podaci pokazuju da nema statistički značajne povezanosti postojanja *BRAF* mutacije s patohistološkim osobinama primarnog tumora, osim statistički značajne povezanosti s angioinvazijom tumora ($p = 0,043$), što je rijetko opisana karakteristika tumora. Nadalje, nismo pokazali povezanost učestalosti *BRAF* mutiranih alela s patohistološkim značajkama bolesti. Također nije pokazana statistički značajna povezanost učestalosti mutiranih alela gena *BRAF* s angioinvazijom tumora, iako je pokazana već spomenuta statistički značajna povezanost postojanja *BRAF* mutacije s angioinvazijom.

Ne iznenađuje da su pojedine patohistološke karakteristike tumora povezane sa stupnjem proširenosti bolesti. Našim istraživanjem smo pokazali da je promjer tumora značajno

veći u skupini s udaljenim metastazama te je prosječna veličina tumora u oboljelih s udaljenim metastazama bila 3,05cm, kod osoba s lokalnim metastazama 2,05cm, dok je kod osoba bez diseminacije iznosila 1,69cm ($p < 0,001$, tablica 10.; slika 8.). S druge strane, nismo pokazali statistički značajnu korelaciju između postojanja mutacije BRAF ($p = 0,09$, tablica 11; slika 9) i postotka mutiranih alela i veličine tumora ($p = 0,847$; slika 10.) što je u skladu s rezultatima koje su prikazali Colombo i suradnici [96], no suprotno od onih prikazanih od strane de Biase i suradnika [102] kao i Kim i suradnika [111]. Isto tako, pokazana je statistički značajna povezanost proboja kapsule štitnjače i proširenosti PKŠ ($p = 0,038$; tablica 12.), no nije pokazana povezanost s postojanjem ($p = 0,541$; tablica 12.) kao ni učestalosti same mutacije ($p = 1,000$; tablica 13.; slika 11.). Isti slučaj je bio i sa širenjem primarnog tumora izvan štitnjače koje je statistički značajno povezano sa stupnjem proširenosti PKŠ ($p < 0,001$; tablica 18.), no nije pokazana statistički značajna povezanost s postojanjem same mutacije BRAF ($p = 0,866$; tablica 18.) kao ni s učestalosti mutiranih alela ($p = 0,589$; tablica 19.; slika 14.). Zanimljivo, diseminacija unutar štitnjače nije pokazana povezanom ni sa stupnjem proširenosti bolesti ($p = 0,139$; tablica 16.) kao ni s postojanjem mutacije ($p = 0,433$; tablica 16.) ni učestalosti mutiranih alela gena BRAF ($p = 0,576$; tablica 17.; slika 13.). Najzanimljiviji podatak jest vezan za angioinvaziju za koju smo pokazali statistički značajnu povezanost s postojanjem mutacije *BRAF* V600E ($p = 0,043$; tablica 14.). No, nismo pokazali statistički značajnu povezanost učestalosti mutiranih alela gena *BRAF* s angioinvazijom tumora ($p = 0,096$; tablica 15, slika 12.). U našem istraživanju angioinvazija je bila prisutna gotovo samo u bolesnika s udaljenim metastazama, što je usporedivo sa studijom Mete i suradnika [134]. Prema navedenoj studiji, korištenjem strogih kriterija angioinvazije, što podrazumijeva proboj stijenke krvne žile tumorskim stanicama uz prateći tromb uz tumorske stanice, ustanovljena je prisutnost angioinvazije u samo 3% analiziranih slučajeva PKŠ. No, 35% bolesnika s prisutnom angioinvazijom je razvilo udaljene metastaze što upućuje na potrebu za oprezom u onkološkoj obradi bolesnika s prisutnom angioinvazijom tumora.

Provedena je i daljnja analiza povezanosti postojanja BRAF mutacije s probojem kapsule limfnog čvora u slučaju postojanja lokalne metastaze u limfnom čvoru, koja se nije pokazala statistički značajnom ($p = 0,309$; tablica 20.), a nije pokazana statistički značajna povezanost postojanja lokalne metastaze u limfnom čvoru ni s učestalošću mutiranih alela ($p = 0,365$; tablica 21.; slika 15.).

Dosadašnjim studijama nije utvrđena statistički značajna povezanost *BRAF* mutacije s dobi i spolom bolesnika [135,136], uključivši i rezultate multivarijatne analize [137]. Prema našoj analizi povezanosti *BRAF* mutacije i učestalosti *BRAF* mutiranih alela s dobi i spolom bolesnika pokazano je da su bolesnici s udaljenim metastazama bili starije životne dobi ($p < 0,001$; tablica 22.; slika 16.), ali nije ustanovljena statistički značajna korelacija između postotka mutiranih alela i dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze ($p = 0,756$, slika 17.). Takva korelacija nije pokazana statistički značajnom niti analizom pojedinih skupina bolesnika podijeljenih po stupnju diseminacije bolesti (slike 18.;19.;20.). Nadalje, pokazana je statistički značajna povezanost muškog spola s postojanjem udaljenih metastaza ($p = 0,002$; tablica 24.), no analizom podjele bolesnika prema postojanju mutacije *BRAF* V600E nije ustanovljena značajna razlika u raspodjeli ovisno o spolu ($p = 0,257$; tablica 23.). Prema prikazanim podacima jasno je kako je *BRAF* V600E mutacija vrlo česta u PKŠ, no njena kvalitativna i kvantitativna prisutnost ne pokazuju jasan utjecaj niti na stupanj proširenosti bolesti, niti na većinu negativnih patohistoloških karakteristika tumora. Usto, udio PKŠ s udaljenim metastazama i agresivnijim oblikom bolesti je znatno niži od same prevalencije *BRAF* mutacije. Stoga je moguće da iako *BRAF* mutacija preko MAPK kinaznog puta ima utjecaj na nastanak tumora, kao samostalan faktor nije dovoljna u procjeni agresivnosti bolesti.

6.4 Potvrda mutacije *BRAF* V600E na proteinskoj razini

Jedan od ciljeva provedenog istraživanja bio je i potvrditi mutacijski status gena *BRAF* na razini proteina imunohistokemijskom analizom dijela *BRAF* V600E pozitivnih i negativnih uzoraka. Učinjenom usporedbom utvrđena je potpuna podudarnost pozitivnih nalaza dobivenih PCR analizom i imunohistokemijom te gotovo potpuna podudarnost *BRAF* negativnih uzoraka (13/14) pri čemu je jedan uzorak imunohistokemijom pokazan kao pozitivan usprkos *BRAF* negativnom rezultatu PCR testiranja (tablica 25.; % podudarnosti: 97,67). U ovom slučaju *BRAF* mutacija je imunohistokemijskom metodom detektirana u tek 5% tumorskog tkiva. Moguće objašnjenje diskrepancije može biti u maloj zastupljenosti stanica s *BRAF* mutacijom u navedenom tumoru što je uz moguću malu razliku između rezova koji su analizirani imunohistokemijski i onih iz kojih je izolirana DNA za qPCR i nisku celularnost tumora moglo rezultirati time da je udio *BRAF* mutiranih alela bio ispod razine detekcije qPCR metode.

Učinjena je i kvantifikacija imunohistokemijskom analizom vidljive *BRAF* V600E mutacije proteina u rezu tumora. U slučaju pozitivnog nalaza imunohistokemijske analize gotovo svi tumori (27 od 30) su pokazali gotovo homogenu prisutnost *BRAF* V600E mutiranog proteina u rasponu od 80% do 100% (tablica 26.). Tri uzorka, uključujući i ranije opisani nepodudaran slučaj, prikazali su heterogenu prisutnost *BRAF* mutiranog proteina u razini od 5%, 8% te 60%. Iako su razlike vrijednosti vrlo heterogeno raspostranjene učinjenom Bland-Altman analizom nalaze se unutar granica podudarnosti (slika 22.).

Izazov je objasniti zašto kvantifikacija imunohistokemijskom analizom pokazuje homogeniju prisutnost *BRAF* V600E mutiranih proteina u odnosu na qPCR vrijednosti mutacije *BRAF* V600E. Korišteno monoklonsko protutijelo je specifično za *BRAF* V600E mutirani oblik proteina te se očekuje difuzno jako do umjereno bojanje citoplazme pojedine stanice u slučaju postojanja *BRAF* V600E mutacije proteina [138]. Prema literaturi, ne očekuje se križno vezanje za druge oblike *BRAF* mutiranih proteina koje bi moglo objasniti značajnu razliku između imunohistokemijom i PCR-om dobivenog udjela *BRAF* V600E mutiranih stanica u tumoru. U literaturi je opisan tek jedan slučaj križne reaktivnosti u slučaju V600K mutacije i to u slučaju mutacije u melanomu [139].

Opisana je neosjetljivost protutijela na BRAF V600E protein u određenim tipovima karcinoma, prvenstveno kolorektalnog karcinoma gdje je primijećena niska razina osjetljivosti i specifičnosti (71% i 74%) u odnosu na gensku analizu *BRAF* mutacije [140]. S druge strane, učestalost lažno pozitivnih nalaza imunohistokemijom na BRAF V600E je vrlo niska, no opisani su slučajevi pozitivnog citoplazmatskog bojanja glioma [141], kao i adenoma hipofize, gdje je čak dodatno isključeno postojanje drugih vrsta *BRAF* V600 mutacija, uključujući V600M i V600K [142].

Istraživanja provedena u svrhu validacije monoklonskog protutijela za BRAF mutaciju PKŠ prikazuju rezultate imunohistokemije gotovo identične opisanima u ovom istraživanju, tj. izraženu homogenost BRAF mutacije [108,138]. Također, analiza heterogenosti PKŠ metodom imunohistokemije BRAF mutiranih proteina prikazala je slične rezultate [110]. Druga istraživanja usmjerena na potvrdu heterogenosti *BRAF* V600E mutacije u papilarnom karcinomu štitnjače temeljem metode imunohistokemije nisu prikazivala toliku homogenost u prisutnosti BRAF V600E mutiranog proteina [102,103,143], iako je udio BRAF pozitivnih stanica tumora u svim slučajevima bio veći koristeći imunohistokemijsku analizu u usporedbi s rezultatima qPCR metode. Bitno je napomenuti da iako je u navedenim studijama nađen izraženije heterogen postotak stanica s BRAF mutiranim proteinom (< 80% tumora) i nadalje je tek manji udio uzoraka (4/18) izražavao jasnu heterogenost. Ostali uzorci su bili ili homogeni s obzirom na imunohistokemijsku detekciju BRAF mutiranog proteina ili nije bilo povezanosti s postotkom *BRAF* mutiranih alela određenih metodom PCR u istom uzorku tkiva [102].

6.5 Pristup kvantifikaciji mutiranih alela i mogući nedostaci

metode

Jedan od temeljnih ciljeva istraživanja bio je odrediti učestalosti *BRAF* V600E mutiranih alela u uzorku tumora, kako bi se učestalost mogla usporediti s patohistološkim i kliničkim karakteristikama bolesti. U istraživanju učestalost mutiranih alela je određena putem metode qPCR uz normalizaciju u odnosu na procijenjen udio tumora u rezu tkiva iz kojeg je izdvojena DNA za qPCR. Bitno je istaknuti da u odnosu na kvalitativno određivanje postojanja mutacije gena *BRAF*, određivanje učestalosti mutiranih alela nije rutinski korišten postupak. Stoga je nužno istaknuti i moguće nedostatke korištene metode u ovom istraživanju kao i spoznaje stečene tijekom obrade uzoraka.

U istraživanju su korišteni uzastopni rezovi parafinskog bloka tumora, učinjeni kroz najveći promjer primarnog tumora. Prvi rez je bojan H&E radi procjene postotka stanica tumora u preparatu, a sljedeći je korišten za izolaciju DNA. Iako je debljina prereza samo 5 μm , i nadalje postoji mogućnost da se prerez korišten za izolaciju DNA razlikuje u udjelu stanica tumora od prvog reza na temelju kojeg je vizualno procijenjen udio stanica tumora. U literaturi je poznat podatak o prosječnom rasponu promjera jezgre papilarnog karcinoma štitnjače, koji je dobiven iz parafinskih blokova, a iznosi 4,7- 9,6 μm [144]. Uspoređujući vrijednosti debljine prereza, kao i promjera stanica, ne bismo ipak očekivali značajna odstupanja između dva uzastopna reza na parafinskim blokovima.

Sljedeći mogući nedostatak je odluka o optimalnom prerezu tumora gdje će se vršiti i H&E bojanje, kao i izolacija DNA. Pretpostavka je da je mjesto najvećeg promjera primarnog tumora najbolje za analizu. Tu očekujemo najviše stanica tumora te reprezentativan uzorak eventualnog postojanja mutacija. No u slučaju kada očekujemo značajnu heterogenost u klonalnosti tumora, kasnije nastala mutacija može nastati u bilo kojem dijelu tumora, uključujući i njegovu periferiju. Iako heterogenost karcinoma štitnjače nije toliko izražena kao kod drugih vrsta karcinoma, višestruko uzorkovanje unutar tumora bi pružilo točniju predodžbu svih zastupljenih mutacija [113,145]. Navedeno je vjerojatno najveći nedostatak trenutnog pristupa kvantifikaciji mutiranih alela u tumoru koji je korišten u ovom i drugim istraživanjima.

Posljednji problem koji je bitno istaknuti odnosi se na normalizaciju postotka mutiranih alela u tkivu tumora, učinjenu prema procijenjenom postotku stanica tumora u rezu tkiva uzetom za DNA izolaciju. Dosadašnje studije heterogenosti su analizirale heterogenost

BRAF mutacije analizom mutacije gena ili u manjem broju slučajeva imunohistokemijskom analizom, ali samo je manji dio istraživanja, neovisno o načinu kvantifikacije, uključio normalizaciju postotka mutacije u odnosu na postotak stanica tumora u preparatu [6,96,102,103,112]. Činjenica je da se karcinomi štitnjače mogu sastojati i od dijela stanica normalnog tkiva, bilo vezivnog ili vaskularnog podrijetla, kao i upalnih stanica i strome, a njihov udio može biti izrazito varijabilan unutar pojedinog tumora [146]. Zato je kvantifikacija mutiranih alela podložna pogrešci koju, koristeći normalizaciju, nastojimo u najvećoj mogućoj mjeri svesti na minimum.

7. ZAKLJUČCI

S obzirom na rezultate dobivene ovim istraživanjem može se zaključiti:

- 1) PKŠ pokazuje heterogenu distribuciju mutiranih alela *BRAF* V600E u primarnom tumoru što sugerira oligoklonalni razvoj tumora
- 2) Postojanje mutacije *BRAF* V600E u primarnom PKŠ nije povezano sa stupnjem proširenosti bolesti
- 3) Udio mutiranih alela *BRAF* V600E u stanicama primarnog tumora PKŠ nije povezan sa stupnjem proširenosti bolesti
- 4) Postojanje mutacije *BRAF* V600E u primarnom PKŠ je statistički značajno povezano s angioinvazijom
- 5) Nije nađena statistički značajna povezanost udjela mutiranih alela *BRAF* V600E s kliničkim i patohistološkim karakteristikama tumora

8. SAŽETAK

Jedan od primarnih izazova u liječenju učestalog, no najčešće indolentnog papilarnog karcinoma štitnjače (PKŠ), je mogućnost ranijeg identificiranja agresivnijih oblika bolesti. Proširenost bolesti u obliku udaljenih metastaza je glavni čimbenik koji utječe na preživljenje bolesnika. Upotreba molekularnih biljega poput *BRAF* V600E mutacije korisna je kao pokazatelj stupnja rizika za recidiv bolesti. Postojanje heterogenosti *BRAF* V600E mutacije u primarnom tumoru, kao i njen utjecaj na stupanj proširenosti PKŠ, nisu razjašnjene.

Cilj ovoga istraživanja je utvrditi povezanost učestalosti *BRAF* V600E mutiranih alela u stanicama PKŠ sa stupnjem proširenosti bolesti.

Navedeni cilj je postignut određivanjem postojanja mutacije V600E gena *BRAF* u primarnom tumoru metodom qPCR te kvantifikacijom mutiranih alela i njihovom normalizacijom u odnosu na procijenjeni udio stanica tumora u tkivu. Potvrđni eksperiment metode qPCR na proteinskoj razini je proveden u obliku semikvantitativne imunohistokemijske analize *BRAF* V600E mutiranog proteina.

Analizom 173 uzroka PKŠ utvrđena je prisutnost *BRAF* V600E mutacije u 60% bolesnika. Ustanovljeno je i postojanje heterogene distribucije mutacije s normaliziranim udjelom mutiranih alela *BRAF* u rasponu od 1,55% do 92,06%. Statističkom analizom nije utvrđena značajna povezanost postojanja mutacije *BRAF* V600E, kao niti udjela mutiranih alela, sa stupnjem proširenosti bolesti. Ukoliko su u statističku analizu uključene i ostale patohistološke karakteristike tumora, postojanje *BRAF* mutacije nije statistički značajno povezano s analiziranim karakteristikama primarnog tumora osim s angioinvazijom, dok udio mutiranih alela gena *BRAF* nije pokazao statistički značajnu povezanost. Dob i spol bolesnika također nisu značajno povezani niti s postojanjem, niti s udjelom mutiranih alela *BRAF*. Pokazana je podudarnost detekcije mutacije *BRAF* metodom qPCR i imunohistokemijskom analizom *BRAF* V600E mutiranog proteina. Rezultati istraživanja upućuju na heterogenost *BRAF* mutacije i postojanje oligoklonalnih oblika PKŠ. S obzirom na učestalost *BRAF* mutacije i njenu nepovezanost sa stupnjem proširenosti bolesti, kao i većinom nepovoljnih patohistoloških karakteristika bolesti, moguće je da *BRAF* mutacija samostalno nije dovoljna za procjenu agresivnosti PKŠ.

9. SUMMARY

Association of *BRAF* V600E mutant allele proportion with the dissemination stage of papillary thyroid cancer

Ivan Blažeković

Zagreb, 2023

One of the primary challenges in the treatment of papillary thyroid cancer (PTC) is early identification of more aggressive forms. Disease dissemination, especially in the form of distant metastases is a major factor influencing patient survival. The use of molecular markers such as *BRAF* V600E mutation is useful as an indicator in risk stratification for disease recurrence. However, the heterogeneity of the *BRAF* V600E mutation in the primary tumor and its influence on PTC dissemination have not been deciphered. The aim of this study was to determine the association of the frequency of mutated *BRAF* V600E alleles in PTC with disease dissemination.

The *BRAF* V600E gene mutation in the primary tumor was quantified by qPCR and normalized using the estimated proportion of tumor cells. Semiquantitative immunohistochemical analysis of the *BRAF* V600E mutant protein was also performed.

Analysis of 173 PTCs revealed the presence of the *BRAF* V600E mutation in 60% of patients. Normalized frequency of mutated *BRAF* alleles was from 1.55% to 92,06%. There was no significant association between the presence nor proportion of the *BRAF* V600E mutation with the degree of disease dissemination. The presence of the *BRAF* mutation was not significantly associated with studied pathohistological tumor characteristics except angioinvasion. Age and sex also did not present significant association with *BRAF* mutation or proportion of *BRAF* mutated alleles. Detection of the *BRAF* mutation by qPCR and immunohistochemical analysis were in agreement.

The results of the study suggest the heterogeneity of the *BRAF* mutation and the existence of oligoclonal forms of PTC. However, given the frequency of *BRAF* mutation in PTC and the lack of association with both the disease dissemination and majority of unfavorable pathohistological characteristics of the disease, it is possible that the *BRAF* mutation alone is not sufficient to assess the aggressiveness of PTC.

10. LITERATURA

- [1] Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. *J Cancer Epidemiol.* 2013;2013:1–10. doi: 10.1155/2013/965212.
- [2] Hegedüs L. The Thyroid Nodule. *N Engl J Med.* 2004;351:1764–71. doi: 10.1056/NEJMcp031436.
- [3] Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA.* 2017;317:1338. doi: 10.1001/jama.2017.2719.
- [4] Toraih EA, Hussein MH, Zerfaoui M, Attia AS, Marzouk Ellythy A, Mostafa A, i sur. Site-Specific Metastasis and Survival in Papillary Thyroid Cancer: The Importance of Brain and Multi-Organ Disease. *Cancers.* 2021;13:1625. doi: 10.3390/cancers13071625.
- [5] Masoodi T, Siraj AK, Siraj S, Azam S, Qadri Z, Albalawy WN, i sur. Whole-Exome Sequencing of Matched Primary and Metastatic Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2020;30:42–56. doi: 10.1089/thy.2019.0052.
- [6] Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, i sur. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell.* 2014;159:676–90. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050.
- [7] Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; c2020 [pristupljeno 15.05.2022.]. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/today/>
- [8] Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten br. 44 [Internet]. Šekerija M, ur. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2021 [pristupljeno 16.05.2022.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/12/Bilten44_2019.pdf
- [9] Li M, Maso LD, Vaccarella S. Global trends in thyroid cancer incidence and the impact of overdiagnosis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8:468–70. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30115-7.
- [10] Dal Maso L, Tavilla A, Pacini F, Serraino D, van Dijk BAC, Chirilaque MD, i sur. Survival of 86,690 patients with thyroid cancer: A population-based study in 29

- European countries from EUROCare-5. *Eur J Cancer*. 2017;77:140–52. doi: 10.1016/j.ejca.2017.02.023.
- [11] Zaridze D, Maximovitch D, Smans M, Stilidi I. Thyroid cancer overdiagnosis revisited. *Cancer Epidemiol*. 2021;74:102014. doi: 10.1016/j.canep.2021.102014.
- [12] Ahn HS, Kim HJ, Welch HG. Korea’s Thyroid-Cancer “Epidemic” — Screening and Overdiagnosis. *N Engl J Med*. 2014;371:1765–7. doi: 10.1056/NEJMp1409841.
- [13] Harach HR, Franssila KO, Wasenius V-M. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A “normal” finding in Finland. A systematic autopsy study. *Cancer*. 1985;56:531–8. doi: 10.1002/1097-0142(19850801)56:3<531::AID-CNCR2820560321>3.0.CO;2-3.
- [14] Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, et al. Thyroid Cancer after Exposure to External Radiation: A Pooled Analysis of Seven Studies. *Radiat Res*. 1995;141:259. doi: 10.2307/3579003.
- [15] Mettler FA, Bhargavan M, Thomadsen BR, Gilley DB, Lipoti JA, Mahesh M, et al. Nuclear Medicine Exposure in the United States, 2005-2007: Preliminary Results. *Semin Nucl Med*. 2008;38:384–91. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2008.05.004.
- [16] Kitahara CM, Sosa JA. Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16:617–8. doi: 10.1038/s41574-020-00414-9.
- [17] Cao L-Z, Peng X-D, Xie J-P, Yang F-H, Wen H-L, Li S. The relationship between iodine intake and the risk of thyroid cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96:e6734. doi: 10.1097/MD.0000000000006734.
- [18] Zhang X, Zhang F, Li Q, Feng C, Teng W. Iodine nutrition and papillary thyroid cancer. *Front Nutr*. 2022;9:1022650. doi: 10.3389/fnut.2022.1022650.
- [19] Noureldine SI, Tufano RP. Association of Hashimoto’s thyroiditis and thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2015;27:21–5. doi: 10.1097/CCO.000000000000150.
- [20] Liu Y, Li C, Zhao W, Wang Y. Hashimoto’s Thyroiditis is an Important Risk Factor of Papillary Thyroid Microcarcinoma in Younger Adults. *Horm Metab Res*. 2017;49:732–8. doi: 10.1055/s-0043-117892.

- [21] Feldt-Rasmussen U. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor for thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2020;27:364–71. doi: 10.1097/MED.0000000000000570.
- [22] Hu X, Wang X, Liang Y, Chen X, Zhou S, Fei W, i sur. Cancer Risk in Hashimoto's Thyroiditis: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol.* 2022;13:937871. doi: 10.3389/fendo.2022.937871.
- [23] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860–7. doi: 10.1038/nature01322.
- [24] Yildirim Simsir I, Cetinkalp S, Kabalak T. Review of Factors Contributing to Nodular Goiter and Thyroid Carcinoma. *Med Princ Pract.* 2020;29:1–5. doi: 10.1159/000503575.
- [25] Kitahara CM, Linet MS, Beane Freeman LE, Check DP, Church TR, Park Y, i sur. Cigarette smoking, alcohol intake, and thyroid cancer risk: a pooled analysis of five prospective studies in the United States. *Cancer Causes Control.* 2012;23:1615–24. doi: 10.1007/s10552-012-0039-2.
- [26] Myung S-K, Lee CW, Lee J, Kim J, Kim HS. Risk Factors for Thyroid Cancer: A Hospital-Based Case-Control Study in Korean Adults. *Cancer Res Treat.* 2017;49:70–8. doi: 10.4143/crt.2015.310.
- [27] Cho A, Chang Y, Ahn J, Shin H, Ryu S. Cigarette smoking and thyroid cancer risk: a cohort study. *Br J Cancer.* 2018;119:638–45. doi: 10.1038/s41416-018-0224-5.
- [28] Smith TJ. Insulin-Like Growth Factor Pathway and the Thyroid. *Front Endocrinol.* 2021;12:653627. doi: 10.3389/fendo.2021.653627.
- [29] Jung CK, Little MP, Lubin JH, Brenner AV, Wells SA, Sigurdson AJ, i sur. The Increase in Thyroid Cancer Incidence During the Last Four Decades Is Accompanied by a High Frequency of *BRAF* Mutations and a Sharp Increase in *RAS* Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E276–85. doi: 10.1210/jc.2013-2503.
- [30] Kowalska A, Walczyk A, Kowalik A, Pałyga I, Trybek T, Kopczyński J, i sur. Increase in Papillary Thyroid Cancer Incidence Is Accompanied by Changes in the Frequency of the *BRAF*^{V600E} Mutation: A Single-Institution Study. *Thyroid.* 2016;26:543–51. doi: 10.1089/thy.2015.0352.

- [31] Burgess JR, Dwyer T, McArdle K, Tucker P, Shugg D. The Changing Incidence and Spectrum of Thyroid Carcinoma in Tasmania (1978–1998) during a Transition from Iodine Sufficiency to Iodine Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:1513–7. doi: 10.1210/jcem.85.4.6554.
- [32] Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26:1–133. doi: 10.1089/thy.2015.0020.
- [33] Bai Y, Kakudo K, Jung CK. Updates in the Pathologic Classification of Thyroid Neoplasms: A Review of the World Health Organization Classification. *Endocrinol Metab.* 2020;35:696–715. doi: 10.3803/EnM.2020.807.
- [34] Xu B. Papillary thyroid carcinoma overview. U: Pathology Outlines [Internet]. Bingham Farms (MI): PathologyOutlines.com; 2022 [ažurirano 27.12.2021.; pristupljeno 17.05.2022.]. Dostupno na: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillary.html>
- [35] Furuya-Kanamori L, Bell KJL, Clark J, Glasziou P, Doi SAR. Prevalence of Differentiated Thyroid Cancer in Autopsy Studies Over Six Decades: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2016;34:3672–9. doi: 10.1200/JCO.2016.67.7419.
- [36] Saravana-Bawan B, Bajwa A, Paterson J, McMullen T. Active surveillance of low-risk papillary thyroid cancer: A meta-analysis. *Surgery.* 2020;167:46–55. doi: 10.1016/j.surg.2019.03.040.
- [37] Li C, Aragon Han P, Lee KC, Lee LC, Fox AC, Beninato T, et al. Does *BRAF* V600E Mutation Predict Aggressive Features in Papillary Thyroid Cancer? Results From Four Endocrine Surgery Centers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:3702–12. doi: 10.1210/jc.2013-1584.
- [38] Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LDR, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol.* 2016;2:1023. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0386.

- [39] Kakudo K. Papillary carcinoma of the thyroid in Japan: subclassification of common type and identification of low risk group. *J Clin Pathol*. 2004;57:1041–6. doi: 10.1136/jcp.2004.017889.
- [40] Donaldson LB, Yan F, Morgan PF, Kaczmar JM, Fernandes JK, Nguyen SA, i sur. Hobnail variant of papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine*. 2021;72:27–39. doi: 10.1007/s12020-020-02505-z.
- [41] Kazaure HS, Roman SA, Sosa JA. Aggressive Variants of Papillary Thyroid Cancer: Incidence, Characteristics and Predictors of Survival among 43,738 Patients. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:1874–80. doi: 10.1245/s10434-011-2129-x.
- [42] S Dettmer M, Schmitt A, Steinert H, Capper D, Moch H, Komminoth P, i sur. Tall cell papillary thyroid carcinoma: new diagnostic criteria and mutations in BRAF and TERT. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22:419–29. doi: 10.1530/ERC-15-0057.
- [43] Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, Caudill CM, Lloyd RV. Solid Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Incidence, Clinical–Pathologic Characteristics, Molecular Analysis, and Biologic Behavior. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:1478–84. doi: 10.1097/00000478-200112000-00002.
- [44] Torregrossa L, Viola D, Sensi E, Giordano M, Piaggi P, Romei C, i sur. Papillary Thyroid Carcinoma With Rare Exon 15 BRAF Mutation Has Indolent Behavior: A Single-Institution Experience. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:4413–20. doi: 10.1210/jc.2016-1775.
- [45] Pillai S, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma—an update of its clinicopathological features and molecular biology. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;94:64–73. doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.12.001.
- [46] Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J*. 2017;6:225–37. doi: 10.1159/000478927.
- [47] Spencer CA. Clinical Utility of Thyroglobulin Antibody (TgAb) Measurements for Patients with Differentiated Thyroid Cancers (DTC). *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:3615–27. doi: 10.1210/jc.2011-1740.

- [48] Eustatia-Rutten CFA, Smit JWA, Romijn JA, van der Kleij-Corssmit EPM, 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;61:61–74. doi: 10.1111/j.1365-2265.2004.02060.x.
- [49] Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid*. 2017;27:1341–6. doi: 10.1089/thy.2017.0500.
- [50] Asa SL. The Current Histologic Classification of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48:1–22. doi: 10.1016/j.ecl.2018.10.001.
- [51] Nikiforov YE, Carty SE, Chiose SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, i sur. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid*. 2015;25:1217–23. doi: 10.1089/thy.2015.0305.
- [52] Popoveniuc G, Jonklaas J. Thyroid Nodules. *Med Clin North Am*. 2012;96:329–49. doi: 10.1016/j.mcna.2012.02.002.
- [53] Nordén MM, Larsson F, Tedelind S, Carlsson T, Lundh C, Forssell-Aronsson E, i sur. Down-regulation of the Sodium/Iodide Symporter Explains ¹³¹I-Induced Thyroid Stunning. *Cancer Res*. 2007;67:7512–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0823.
- [54] 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:e1308. doi: 10.1097/MD.0000000000001308.
- [55] Lundh C, Lindencrona U, Postgård P, Carlsson T, Nilsson M, Forssell-Aronsson E. Radiation-Induced Thyroid Stunning: Differential Effects of ¹²³I, ¹³¹I, ^{99m}Tc, and ²¹¹At on Iodide Transport and NIS mRNA Expression in Cultured Thyroid Cells. *J Nucl Med*. 2009;50:1161–7. doi: 10.2967/jnumed.108.061150.
- [56] Ponto J. Mechanisms of radiopharmaceutical localization [Internet]. Norenberg J, ur. Albuquerque (NM): University of New Mexico Health Sciences Center, College of Pharmacy – Pharmacy Continuing Education; c2012 [pristupljeno 17.05.2022.]. Dostupno na: https://pharmacyce.unm.edu/nuclear_program/freelessonfiles/vol16lesson4.pdf

- [57] Soelberg KK, Bonnema SJ, Brix TH, Hegedüs L. Risk of Malignancy in Thyroid Incidentalomas Detected by ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography: A Systematic Review. *Thyroid*. 2012;22:918–25. doi: 10.1089/thy.2012.0005.
- [58] Filetti S, Durante C, Hartl D, Leboulleux S, Locati LD, Newbold K, i sur. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30:1856–83. doi: 10.1093/annonc/mdz400.
- [59] Tuttle RM, Ahuja S, Avram AM, Bernet VJ, Bourguet P, Daniels GH, i sur. Controversies, Consensus, and Collaboration in the Use of ¹³¹I Therapy in Differentiated Thyroid Cancer: A Joint Statement from the American Thyroid Association, the European Association of Nuclear Medicine, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the European Thyroid Association. *Thyroid*. 2019;29:461–70. doi: 10.1089/thy.2018.0597.
- [60] Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid*. 2017;27:751–6. doi: 10.1089/thy.2017.0102.
- [61] Chow S-M, Law SCK, Chan JKC, Au S-K, Yau S, Lau W-H. Papillary microcarcinoma of the thyroid? Prognostic significance of lymph node metastasis and multifocality. *Cancer*. 2003;98:31–40. doi: 10.1002/cncr.11442.
- [62] Elisei R, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Masserini L, Ceccarelli C, i sur. Are the Clinical and Pathological Features of Differentiated Thyroid Carcinoma Really Changed over the Last 35 Years? Study on 4187 Patients from a Single Italian Institution to Answer this Question. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:1516–27. doi: 10.1210/jc.2009-1536.
- [63] Nowell PC. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations: Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science*. 1976;194:23–8. doi: 10.1126/science.959840.
- [64] Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol*. 2020;11:102. doi: 10.3389/fendo.2020.00102.

- [65] Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*. 2008;21:S37–43. doi: 10.1038/modpathol.2008.10.
- [66] Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh Q-Y, i sur. The Prevalence and Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *Ann Surg*. 2007;246:466–71. doi: 10.1097/SLA.0b013e318148563d.
- [67] Abuali I, Lee C-S, Seetharamu N. A narrative review of the management of BRAF non-V600E mutated metastatic non-small cell lung cancer. *Precis Cancer Med*. 2022;5:13–13. doi: 10.21037/pcm-21-49.
- [68] McKelvey BA, Umbricht CB, Zeiger MA. Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Regulation in Thyroid Cancer: A Review. *Front Endocrinol*. 2020;11:485. doi: 10.3389/fendo.2020.00485.
- [69] Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, Williams ED, Nerovnya A, Cherstvoy ED, i sur. High Prevalence of RET/PTC Rearrangements in Ukrainian and Belarussian Post-Chernobyl Thyroid Papillary Carcinomas: A Strong Correlation between RET/PTC3 and the Solid-Follicular Variant. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:4232–8. doi: 10.1210/jcem.84.11.6129.
- [70] Romei C, Elisei R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol*. 2012;3. doi: 10.3389/fendo.2012.00054.
- [71] Argyropoulou M, Veskokoukis AS, Karanatsiou P-M, Manolakelli A, Kostoglou-Athanassiou I, Vilaras G, i sur. Low Prevalence of TERT Promoter, BRAF and RAS Mutations in Papillary Thyroid Cancer in the Greek Population. *Pathol Oncol Res*. 2020;26:347–54. doi: 10.1007/s12253-018-0497-2.
- [72] Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7:569–80. doi: 10.1038/nrendo.2011.142.
- [73] Zaman, Wu, Bivona. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. *Cancers*. 2019;11:1197. doi: 10.3390/cancers11081197.
- [74] Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, i sur. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116:855–67. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00215-6.

- [75] Kakarmath S, Heller HT, Alexander CA, Cibas ES, Krane JF, Barletta JA, i sur. Clinical, Sonographic, and Pathological Characteristics of RAS-Positive Versus BRAF-Positive Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101:4938–44. doi: 10.1210/jc.2016-2620.
- [76] Vuong HG, Altibi AMA, Duong UNP, Hassell L. Prognostic implication of BRAF and TERT promoter mutation combination in papillary thyroid carcinoma-A meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2017;87:411–7. doi: 10.1111/cen.13413.
- [77] Domingo E. BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [Internet]. [ažurirano 1.5.2020.; pristupljeno 25.11.2022.] Dostupno na: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/828/braf-\(v-raf-murine-sarcoma-viral-oncogene-homolog-b1\)/](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/828/braf-(v-raf-murine-sarcoma-viral-oncogene-homolog-b1)/)
- [78] Gene BRAF. Alliance of Genome Resources [Internet]. [pristupljeno 25.11.2022.] Dostupno na: <https://www.alliancegenome.org/gene/HGNC:1097>
- [79] Śmiech M, Leszczyński P, Kono H, Wardell C, Taniguchi H. Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. *Genes.* 2020;11:1342. doi: 10.3390/genes11111342.
- [80] Park E, Rawson S, Li K, Kim B-W, Ficarro SB, Pino GG-D, i sur. Architecture of autoinhibited and active BRAF–MEK1–14-3-3 complexes. *Nature.* 2019;575:545–50. doi: 10.1038/s41586-019-1660-y.
- [81] Hussain MRM, Baig M, Mohamoud HSA, Ulhaq Z, Hoessli DC, Khogeer GS, i sur. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22:359–73. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.10.002.
- [82] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, i sur. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949–54. doi: 10.1038/nature00766.
- [83] Cantwell-Dorris ER, O’Leary JJ, Sheils OM. BRAF^{V600E}: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. *Mol Cancer Ther.* 2011;10:385–94. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0799.
- [84] Zhao J, Luo Z. Discovery of Raf Family Is a Milestone in Deciphering the Ras-Mediated Intracellular Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2022;23:5158. doi: 10.3390/ijms23095158.

- [85] El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, Hong D, Naing A, Kim K, i sur. BRAF Mutations in Advanced Cancers: Clinical Characteristics and Outcomes. PLoS ONE. 2011;6:e25806. doi: 10.1371/journal.pone.0025806.
- [86] Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, i sur. BRAF Mutations in Hairy-Cell Leukemia. N Engl J Med. 2011;364:2305–15. doi: 10.1056/NEJMoa1014209.
- [87] Brastianos PK, Taylor-Weiner A, Manley PE, Jones RT, Dias-Santagata D, Thorner AR, i sur. Exome sequencing identifies BRAF mutations in papillary craniopharyngiomas. Nat Genet. 2014;46:161–5. doi: 10.1038/ng.2868.
- [88] Freeman AK, Ritt DA, Morrison DK. Effects of Raf Dimerization and Its Inhibition on Normal and Disease-Associated Raf Signaling. Mol Cell. 2013;49:751–8. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.018.
- [89] Avruch J. Ras Activation of the Raf Kinase: Tyrosine Kinase Recruitment of the MAP Kinase Cascade. Recent Prog Horm Res. 2001;56:127–56. doi: 10.1210/rp.56.1.127.
- [90] Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. Microbiol Mol Biol Rev. 2011;75:50–83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- [91] Gupta R, Janostiak R, Wajapeyee N. Transcriptional regulators and alterations that drive melanoma initiation and progression. Oncogene. 2020;39:7093–105. doi: 10.1038/s41388-020-01490-x.
- [92] Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green MR. The BRAF Oncoprotein Functions through the Transcriptional Repressor MAFK to Mediate the CpG Island Methylator Phenotype. Mol Cell. 2014;55:904–15. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.010.
- [93] Mayank M, Kaur N, Singh N. Structural insights and influence of V599 mutations on the overall dynamics of BRAF protein against its kinase domains. Integr Biol. 2018;10:646–57. doi: 10.1039/C8IB00095F.
- [94] Zhang H, Chen D. Synergistic inhibition of MEK/ERK and BRAF V600E with PD98059 and PLX4032 induces sodium/iodide symporter (NIS) expression and radioiodine uptake in BRAF mutated papillary thyroid cancer cells. Thyroid Res. 2018;11:13. doi: 10.1186/s13044-018-0057-6.

- [95] Gouveia C, Can NT, Bostrom A, Grenert JP, van Zante A, Orloff LA. Lack of Association of *BRAF* Mutation With Negative Prognostic Indicators in Papillary Thyroid Carcinoma: The University of California, San Francisco, Experience. *JAMA Otolaryngol Neck Surg.* 2013;139:1164. doi: 10.1001/jamaoto.2013.4501.
- [96] Colombo C, Muzza M, Proverbio MC, Tosi D, Soranna D, Pesenti C, i sur. Impact of Mutation Density and Heterogeneity on Papillary Thyroid Cancer Clinical Features and Remission Probability. *Thyroid.* 2019;29:237–51. doi: 10.1089/thy.2018.0339.
- [97] Walczyk A, Kowalska A, Kowalik A, Sygut J, Wypiórkiewicz E, Chodurska R, i sur. The *BRAF*^{V600E} mutation in papillary thyroid microcarcinoma: does the mutation have an impact on clinical outcome? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;80:899–904. doi: 10.1111/cen.12386.
- [98] Zheng X, Wei S, Han Y, Li Y, Yu Y, Yun X, i sur. Papillary Microcarcinoma of the Thyroid: Clinical Characteristics and BRAFV600E Mutational Status of 977 Cases. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:2266–73. doi: 10.1245/s10434-012-2851-z.
- [99] Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Lombardi CP, Pontecorvi A, Vellone VG, i sur. *BRAF* (V600E) mutation analysis on liquid-based cytology-processed aspiration biopsies predicts bilaterality and lymph node involvement in papillary thyroid microcarcinoma: *BRAF* Mutation in Micro-PTC on LBC. *Cancer Cytopathol.* 2013;121:291–7. doi: 10.1002/cncy.21258.
- [100] Guerra A, Fugazzola L, Marotta V, Cirillo M, Rossi S, Cirello V, i sur. A High Percentage of BRAFV600E Alleles in Papillary Thyroid Carcinoma Predicts a Poorer Outcome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:2333–40. doi: 10.1210/jc.2011-3106.
- [101] Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, i sur. The Primary Occurrence of *BRAF*^{V600E} Is a Rare Clonal Event in Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:517–24. doi: 10.1210/jc.2011-0618.
- [102] de Biase D, Cesari V, Visani M, Casadei GP, Cremonini N, Gandolfi G, i sur. High-Sensitivity *BRAF* Mutation Analysis: *BRAF* V600E Is Acquired Early During Tumor Development but Is Heterogeneously Distributed in a Subset of Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E1530–8. doi: 10.1210/jc.2013-4389.

- [103] Gandolfi G, Sancisi V, Torricelli F, Ragazzi M, Frasoldati A, Piana S, i sur. Allele Percentage of the *BRAF* V600E Mutation in Papillary Thyroid Carcinomas and Corresponding Lymph Node Metastases: No Evidence for a Role in Tumor Progression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E934–42. doi: 10.1210/jc.2012-3930.
- [104] Cheng SP, Hsu YC, Liu CL, Liu TP, Chien MN, Wang TY, i sur. Significance of Allelic Percentage of *BRAF* c.1799T > A (V600E) Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014;21:619–26. doi: 10.1245/s10434-014-3723-5.
- [105] Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, i sur. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26:672–82. doi: 10.1089/thy.2015.0527.
- [106] Vignot S, Frampton GM, Soria JC, Yelensky R, Commo F, Brambilla C, i sur. Next-Generation Sequencing Reveals High Concordance of Recurrent Somatic Alterations Between Primary Tumor and Metastases From Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31:2167–72. doi: 10.1200/JCO.2012.47.7737.
- [107] Meric-Bernstam F, Frampton GM, Ferrer-Lozano J, Yelensky R, Pérez-Fidalgo JA, Wang Y, i sur. Concordance of Genomic Alterations between Primary and Recurrent Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:1382–9. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0482.
- [108] Bullock M, O’Neill C, Chou A, Clarkson A, Dodds T, Toon C, i sur. Utilization of a MAB for *BRAF*V600E detection in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19:779–84. doi: 10.1530/ERC-12-0239.
- [109] Li M, Brito JP, Vaccarella S. Long-Term Declines of Thyroid Cancer Mortality: An International Age–Period–Cohort Analysis. *Thyroid.* 2020;30:838–46. doi: 10.1089/thy.2019.0684.
- [110] Ghossein RA, Katabi N, Fagin JA. Immunohistochemical Detection of Mutated *BRAF* V600E Supports the Clonal Origin of *BRAF*-Induced Thyroid Cancers Along the Spectrum of Disease Progression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1414–21. doi: 10.1210/jc.2013-1408.

- [111] Kim MH, Bae JS, Lim DJ, Lee H, Jeon SR, Park GS, i sur. Quantification of BRAF V600E alleles predicts papillary thyroid cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21:891–902. doi: 10.1530/ERC-14-0147.
- [112] Finkel A, Liba L, Simon E, Bick T, Prinz E, Sabo E, i sur. Subclonality for *BRAF* Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma Is Associated With Earlier Disease Stage. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:1407–13. doi: 10.1210/jc.2015-4031.
- [113] Masoodi T, Siraj AK, Siraj S, Azam S, Qadri Z, Parvathareddy SK, i sur. Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Papillary Thyroid Cancer. *Am J Hum Genet*. 2019;105:959–73. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.09.026.
- [114] Wen D, Hu JQ, Wei WJ, Ma B, Lu ZW, Wang YL, i sur. Dedifferentiation patterns in DTC: is PDTC an intermediate state between DTC and ATC? *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12:267–74.
- [115] Takano T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: A modified theory based on recent evidence [My Opinion]. *Endocr J*. 2014;61:311–20. doi: 10.1507/endocrj.EJ13-0517.
- [116] Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*. 2013;501:355–64. doi: 10.1038/nature12627.
- [117] Fugazzola L, Muzza M, Pogliaghi G, Vitale M. Intratumoral Genetic Heterogeneity in Papillary Thyroid Cancer: Occurrence and Clinical Significance. *Cancers*. 2020;12:383. doi: 10.3390/cancers12020383.
- [118] Andor N, Graham TA, Jansen M, Xia LC, Aktipis CA, Petritsch C, i sur. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat Med*. 2016;22:105–13. doi: 10.1038/nm.3984.
- [119] Schmidbauer B, Menhart K, Hellwig D, Grosse J. Differentiated Thyroid Cancer—Treatment: State of the Art. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1292. doi: 10.3390/ijms18061292.
- [120] Shaha AR, Ferlito A, Rinaldo A. Distant Metastases from Thyroid and Parathyroid Cancer. *ORL*. 2001;63:243–9. doi: 10.1159/000055749.
- [121] Jukić T, Blažeković I, Franceschi M, Ovčariček PP, Butković MB, Dabelić N, i sur. Long-Term Outcome of Differentiated Thyroid Cancer Patients—Fifty Years of Croatian Thyroid Disease Referral Centre Experience. *Diagnostics*. 2022;12:866. doi: 10.3390/diagnostics12040866.

- [122] Tao Y, Wang F, Shen X, Zhu G, Liu R, Viola D, i sur. *BRAF* V600E Status Sharply Differentiates Lymph Node Metastasis-associated Mortality Risk in Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106:3228–38. doi: 10.1210/clinem/dgab286.
- [123] 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;144:1070–8. doi: 10.1016/j.surg.2008.08.034.
- [124] Xing M. *BRAF* Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications. *Endocr Rev.* 2007;28:742–62. doi: 10.1210/er.2007-0007.
- [125] Song YS, Lim JA, Park YJ. Mutation Profile of Well-Differentiated Thyroid Cancer in Asians. *Endocrinol Metab.* 2015;30:252. doi: 10.3803/EnM.2015.30.3.252.
- [126] 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;88:4393–7. doi: 10.1210/jc.2003-030305.
- [127] Lee X, Gao M, Ji Y, Yu Y, Feng Y, Li Y, i sur. Analysis of Differential *BRAF*V600E Mutational Status in High Aggressive Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:240–5. doi: 10.1245/s10434-008-0233-3.
- [128] Kim J, Giuliano AE, Turner RR, Gaffney RE, Umetani N, Kitago M, i sur. Lymphatic Mapping Establishes the Role of *BRAF* Gene Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: *Ann Surg.* 2006;244:799–804. doi: 10.1097/01.sla.0000224751.80858.13.
- [129] Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, i sur. *BRAF*(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15:191–205. doi: 10.1677/ERC-07-0212.
- [130] Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, i sur. Detection of *BRAF* mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol.* 2006;154:341–8. doi: 10.1530/eje.1.02072.

- [131] Cañadas-Garre M, Becerra-Massare P, Moreno Casares A, Calleja-Hernández MÁ, Llamas-Elvira JM. Relevance of *BRAF* and *NRAS* mutations in the primary tumor and metastases of papillary thyroid carcinomas: *BRAF* and *NRAS* in PTC. *Head Neck*. 2016;38:1772–9. doi: 10.1002/hed.24517.
- [132] Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, i sur. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:1898–907. doi: 10.1210/jc.2016-2785.
- [133] Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, i sur. Association of BRAF V600E Mutation with Poor Clinicopathological Outcomes in 500 Consecutive Cases of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4085–90. doi: 10.1210/jc.2007-1179.
- [134] Mete O, Asa SL. Pathological definition and clinical significance of vascular invasion in thyroid carcinomas of follicular epithelial derivation. *Mod Pathol*. 2011;24:1545–52. doi: 10.1038/modpathol.2011.119.
- [135] Barreno LRQ, Mello JBH de, Barros-Filho MC, Francisco AL, Chulam TC, Pinto CAL, i sur. Characterization of BRAF mutation in patients older than 45 years with well-differentiated thyroid carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2022;88:523–8. doi: 10.1016/j.bjorl.2020.07.007.
- [136] Al-Masri M, Al-Shobaki T, Al-Najjar H, Iskanderian R, Younis E, Abdallah N, i sur. BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: it's relation to clinical features and oncologic outcomes in a single cancer centre experience. *Endocr Connect*. 2021;10:1531–7. doi: 10.1530/EC-21-0410.
- [137] Xie H, Wei B, Shen H, Gao Y, Wang L, Liu H. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma (PTC) and its association with clinicopathological features and systemic inflammation response index (SIRI). *Am J Transl Res*. 2018;10:2726–36.
- [138] Koperek O, Kornauth C, Capper D, Berghoff AS, Asari R, Niederle B, i sur. Immunohistochemical Detection of the BRAF V600E-mutated Protein in Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:844–50. doi: 10.1097/PAS.0b013e318246b527.
- [139] Routhier CA, Mochel MC, Lynch K, Dias-Santagata D, Louis DN, Hoang MP. Comparison of 2 monoclonal antibodies for immunohistochemical detection of BRAF V600E mutation in malignant melanoma, pulmonary carcinoma,

- gastrointestinal carcinoma, thyroid carcinoma, and gliomas. *Hum Pathol*. 2013;44:2563–70. doi: 10.1016/j.humpath.2013.06.018.
- [140] Adackapara CA, Sholl LM, Barletta JA, Hornick JL. Immunohistochemistry using the BRAF V600E mutation-specific monoclonal antibody VE1 is not a useful surrogate for genotyping in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology*. 2013;63:187–93. doi: 10.1111/his.12154.
- [141] Ida CM, Vrana JA, Rodriguez FJ, Jentoft ME, Caron AA, Jenkins SM, i sur. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for detection of BRAF V600E mutation in pleomorphic xanthoastrocytoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2013;1:20. doi: 10.1186/2051-5960-1-20.
- [142] Mordes DA, Lynch K, Campbell S, Dias-Santagata D, Nose V, Louis DN, i sur. VE1 Antibody Immunoreactivity in Normal Anterior Pituitary and Adrenal Cortex Without Detectable BRAF V600E Mutations. *Am J Clin Pathol*. 2014;141:811–5. doi: 10.1309/AJCP37TLZLTUAOJL.
- [143] Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, i sur. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011;122:11–9. doi: 10.1007/s00401-011-0841-z.
- [144] Lee T-K, Myers RT, Bond MG, Marshall RB, Kardon B. The significance of nuclear diameter in the biologic behavior of thyroid carcinomas: A retrospective study of 127 cases. *Hum Pathol*. 1987;18:1252–6. doi: 10.1016/S0046-8177(87)80409-4.
- [145] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, i sur. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366:883–92. doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
- [146] Jarzab B, Wiench M, Fajarewicz K, Simek K, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, i sur. Gene Expression Profile of Papillary Thyroid Cancer: Sources of Variability and Diagnostic Implications. *Cancer Res*. 2005;65:1587–97. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3078.

11. ŽIVOTOPIS

Ivan Blažeković rođen je 1990. godine u Zagrebu u Hrvatskoj. Osnovnu školu završio je u Velikoj Gorici 2004. godine, a Opću gimnaziju Velika Gorica 2008. godine. Svoje sveučilišno obrazovanje započeo je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pri kojem je diplomirao 2014. godine među 10% najboljih studenata s prosječkom ocjena 4,86. Tijekom studija nagrađen je Dekanovom nagradom za najboljeg studenta prve godine studija. Nakon pripravničkog staža, stručni ispit za doktore medicine položio je u rujnu 2015. godine. Od prosinca 2016. godine zaposlen je kao specijalizant nuklearne medicine KBC-a Sestre milosrdnice. U svibnju 2021. godine postao je specijalist nuklearne medicine. Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ upisao je 2018. godine. Suradnik je na projektu Hrvatske Zaklade za Znanost „Genetski i epigenetski biljezi kao pokazatelji agresivnosti diferenciranog karcinoma štitnjače“ u sklopu kojeg je i izradio doktorsku disertaciju. Također je suradnik na projektu Hrvatske Zaklade za Znanost „Molekulski biljezi tumora štitnjače i istraživanja unosa joda“. Od travnja 2022. godine hrvatski je koordinator dvaju međunarodnih projekata pod pokroviteljstvom Međunarodne agencije za atomsku energiju pod nazivom: International study on Imaging in Cardio-Oncology Study (iCOS) te IAEA Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy Study (iTAC Study). Autor je poglavlja u stručnim knjigama, prvi autor dva znanstvena rada publicirana u časopisima indeksiranim u Current Contents-u te prvi autor tri rada publicirana u međunarodno indeksiranim časopisima.