

Prognostička vrijednost proteomskoga profila dobro diferenciranih papilarnih karcinoma štitnjače

Matovinović, Filip

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:700992>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Filip Matovinović

**Prognostička vrijednost proteomskoga profila dobro
diferenciranih papilarnih karcinoma štitnjače**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Filip Matovinović

**Prognostička vrijednost proteomskoga profila dobro
diferenciranih papilarnih karcinoma štitnjače**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena na Odjelu za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ KBC „Sestre milosrdnice“.

Voditelji rada: Prof. dr. sc. Vladimir Bedeković

Prof. dr. sc. Lovorka Grgurević

ZAHVALE

Mentoru, prof. Vladimiru Bedekoviću, na vjeri u mene.

Mentorici, prof. Lovorki Grgurević, na potpori tijekom svakog dijela procesa.

Ivani, na strpljenju, smislu i ljubavi.

Mami Stelli i tati Borisu, na svemu.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1. Opći i epidemiološki podatci	1
1.2. Dijagnostika	3
1.3. Stupnjevanje bolesti	4
1.4. Regionalno širenje karcinoma štitnjače	8
1.4.1. Čimbenici rizika za regionalno širenje bolesti.....	9
1.4.2. Dijagnostika regionalne bolesti.....	9
1.4.3. Okultne i “skip” metastaze.....	10
1.5. Liječenje dobro diferenciranih karcinoma štitnjače.....	11
1.5.1. Liječenje primarnog tumora.....	11
1.5.2. Liječenje primarne regionalne bolesti.....	11
1.5.3. Postoperativno liječenje	14
1.6. Prognoza i preživljenje	17
1.7. Recivirajuća bolest i liječenje	17
1.8. Profilaktička disekcija.....	19
1.9. Papilarni mikrokarcinomi	22
1.10. Genomika, proteomika i biljezi.....	24
1.10.1. Genomika.....	24
1.10.2. Proteomika	25
1.10.3. Biljezi	27
1.10.3.1. Biljezi kod karcinoma štitnjače.....	28
1.10.3.2. Dosadašnja proteomska istraživanja tumora štitnjače.....	28
2. HIPOTEZA.....	32
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	33
3.1. Opći cilj.....	33
3.2. Specifični ciljevi	33

4. ISPITANICI I METODE	34
4.1. Ispitanici	34
4.2. Opis istraživanja	36
4.3. Proteomska analiza uzoraka	40
4.3.1. Priprema uzoraka	40
4.3.2. Deparafinizacija i izolacija proteina	40
4.3.2.1. Ekstrakcija proteina i određivanje njihove koncentracije	41
4.3.2.1.1. Određivanje koncentracije proteina	42
4.3.2.2. Digestija proteina tripsinom	45
4.3.2.3. Pročišćavanje i koncentriranje proteina	46
4.3.3. Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa	46
4.3.4. Bioinformatička analiza	47
5. REZULTATI	48
6. RASPRAVA	55
7. ZAKLJUČCI	63
8. SAŽETAK	64
9. SUMMARY	65
10. POPIS LITERATURE	66
11. ŽIVOTOPIS	98

POPIS OZNAKA I KRATICA

AASDH – beta-alanin aktivirajući enzim

AGES - klasifikacija tumora prema dobi, stupnju, proširenosti i veličini, od engl. Age, Grade, Extent, Size

AJCC - Američka združena komisija za rak, od engl. American Joint Committee on Cancer

AMES - klasifikacija tumora prema dobi, metastazama, ekstratireoidnom širenju te veličini, od engl. Age, Metastases, Extrahyroidal invasion, Size

ATA - Američko udruženje za štitnjaču, od engl. American Thyroid Association

ATF1 - aktivirajući transkripcijski faktor 1, od engl. Activating Transcription Factor 1

CEA - karcinoembrijski antigen, od engl. Carcinoembryonic antigen

CREB1 - CAMP odgovarajući element vezujući protein 1, od engl. CAMP Responsive Binding Protein 1

DC - kompatibilan s detergentskom, od engl. Detergent Compatible

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

E2F1 - E2F transkripcijski faktor 1

FASP - pripremanje uzoraka s pomoću filtra, od engl. Filter Aided Sample Preparation

FFPE - fiksacija formalinom i uklapanje u parafin, od engl. Formalin Fixed, Paraffin Embedded

FNAB - aspiracijska biopsija tankom iglom, od engl. Fine Needle Aspiration Biopsy

HECA - engl. Headcase Protein Homolog

iBAQ - apsolutna vrijednost intenziteta izražaja proteina, od engl. Intensity Based Absolute Quantification

MACIS - klasifikacija tumora prema metastazama, dobi, kompletnosti resekcije, invaziji i veličini, od engl. Metastases, Age, Completeness of resection, Invasion, Size

MWCO - isključna vrijednost molekularne težine, od engl. Molecular Weight Cut-Off

NCCN - Nacionalna komprehenzivna mreža za rak, od engl. National Comprehensive Cancer Network

NFYA - stanični transkripcijski faktor 1, podjedinica A, od engl. Nuclear transcription factor Y, subunit alpha

PCNXL4 - Pecanex-4

PLAU - aktivator plazminogena, urokinaza, od engl. Plasminogen Activator, Urokinase

POLR3A - RNA polimeraza III, podjedinica A

POU2F1 - POU domena, klasa II, transkripcijski faktor 1, od engl. POU domain, class 2, transcription factor 1

RC - reducirajući agens, od engl. Reducing Agent

RMB18 - RNA vezujući motiv protein 18, od engl. RNA Binding Motif Protein 18

RNA - ribonukleinska kiselina

RPS11 - ribosomski protein S11

RSLC - brzo separirajuća tekućinska kromatografija, engl. Rapid Separation Liquid Chromatography

SDC2 - sindekan-2, od engl. Syndecan-2

SDC4 - sindekan-4, od engl. Syndecan-4

SEER - nadgledavanje, epidemiologija i krajnji rezultat, od engl. Surveillance, Epidemiology & End Results

T3 - trijodtironin

T4 - tetrajodtironin

TG - tireoglobulin

TNM - Tumor, Node, Metastasis

TSH - tiroidni stimulirajući hormon

UICC - Unija za međunarodnu kontrolu raka, od engl. Union for International Cancer Control

UZV - ultrazvuk

WBS - sken cijelog tijela, od engl. Whole Body Scan

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija, od engl. World Health Organization

1. UVOD

1.1. Opći i epidemiološki podatci

Tumori štitnjače najčešći su tumori endokrinih organa kod čovjeka. Godišnje se u svijetu javlja oko pola milijuna novootkrivenih slučajeva. Incidencija tumora štitnjače procjenjuje se na 10,2 do 15,7 na 100.000 sa smrtnošću od 0,5 na 100.000 stanovnika.

U skladu s time, procjenjuje se da oko 900.000 ljudi trenutačno boluje od karcinoma štitnjače u Sjedinjenim Američkim Državama te je 44.280 ljudi novooboljelo od raka štitnjače u SAD-u u 2021. godini, što čini oko 2,3% svih novootkrivenih tumora, uz 2200 smrtnih slučajeva. Prema SEER-u (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) petogodišnje preživljenje iznosi 99,9% za lokaliziranu bolest te 98,3% za regionalnu bolest.

Demografski, žene obolijevaju tri puta češće nego muškarci, javlja se gotovo istovjetno u svim dobnim skupinama iznad 20. godine života, a medijan obolijevanja je 51 godina (1, 2).

Prema godišnjem Biltenu Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2018. godinu, novootkrivena su 782 tumora štitnjače u 2018. godini, što čini 2,8% udjela u svim tumorima, s incidencijom od 19,1 na 100.000. Od tih pacijenata, njih 39% imalo je lokalnu bolest, 16% regionalno proširenu bolest, 0% udaljene metastaze, a za 44,8% pacijenata nije bilo podataka o proširenosti bolesti (3).

U posljednjih dvadesetak godina stopa incidencije tumora štitnjače raste, u SAD-u 3% godišnje, te čini podskupinu tumora s najvećim porastom incidencije. Također se povećava incidencija i smrtnost kod papilarnih karcinoma uznapredovalog stadija. Takav se trend djelomično objašnjava poboljšanom dijagnostikom, posebice tumora veličine manje od jednog centimetra (tzv. mikrokarcinoma), no neki radovi to demantiraju i tvrde da dolazi do stvarnog porasta broja novih slučajeva. Primjerice, prati se porast incidencije novootkrivenih tumora prema veličini, uključujući i tumore većih i manjih dimenzija (4, 5, 6).

Faktori rizika za razvoj papilarnog karcinoma su prijašnja tumorska bolest štitnjače u obitelji, ekspozicija ionizirajućem zračenju, povećana tjelesna težina, prehrambene navike i određeni reproduktivni čimbenici (7, 8, 9, 10, 11, 12).

Postoje četiri osnovne vrste karcinoma štitnjače: papilarni, folikularni, medularni i anaplastični. Papilarni, folikularni i anaplastični karcinomi nastaju iz folikularnih stanica štitne žlijezde, a medularni nastaju iz parafolikularnih C stanica. Papilarni i folikularni karcinomi smatraju se dobro diferenciranim tumorima s dobrom prognozom bolesti. Papilarni karcinom štitnjače najčešća je maligna bolest štitnjače, čini otprilike 80% svih karcinoma štitnjače.

Papilarni karcinomi mogu se javiti u bilo kojem dijelu štitne žlijezde. Makroskopski, oni su bjelkaste, tvrde tvorbe varijabilne veličine. Patohistološki, sastoje se od neoplastičnih papila sa središnjom fibrovaskularnom jezgrom koja je obavijena jednim ili više redova stanica s ovalnim jezgrama. Većina karcinoma sastoji se od većinski ili fokalnih papilarnih područja, a često se nalaze i folikularna područja. Tumorske stanice najčešće su kubične ili cilindrične. Često se u tumorima nalaze i psamomska tjelešca, koja predstavljaju fokalna područja ishemije papila koja akumuliraju ili ispuštaju kalcij. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (World Health Organization, WHO), za dijagnozu papilarnog karcinoma potrebni su i nuklearni kriteriji, odnosno specifičan izgled jezgara karcinomskih stanica. Jezgre mogu biti prozirne, prazne, pokazivati fenomen brušenog stakla ili biti poput „očiju *Orphan Annie*“ (13). Često se javlja i intranuklearna citoplazmatska inkluzija, preklapanje jezgara te tzv. nuklearne brazde (14, 15). U patologiji se za dijagnostiku upotrebljavaju imunohistokemijski markeri: TTF-1, tireoglobulin, tiroidna peroksidaza, CD56, PAX8, HBME-1, CITED1, citokeratin 19, galektin 3 i molekularni markeri: BRAF i RAS mutacije, RET/PTC i TRK preslagivanja, beta-katenin, prekomjerna ekspresija HMGA2 te IMP3. Ovi markeri služe za patohistološku verifikaciju karcinoma u odnosu na benigne tvorbe ili druge podtipove (16).

Postoji otprilike 15 podtipova papilarnih karcinoma, od kojih neki, poput varijante tall-cell ili kolumnarne, imaju lošije prognoze (16). Takvi su podtipovi, srećom, izrazito rijetki, ali pokazuju tipične karakteristike jezgre (15).

Papilarni karcinomi najčešće se klinički prezentiraju kao sporo rastuće, bezbolne tvorbe u štitnjači. U novije vrijeme, zbog bolje dijagnostike, koja uključuje ultrazvučne preglede vrata, bolest se često otkrije slučajno, u pacijenata koji nemaju nikakvih simptoma. Kao što je već navedeno, takvi su karcinomi često manji od 1 cm u najvećem promjeru te se nazivaju mikrokarcinomima.

1.2. Dijagnostika

Zlatni standard u dijagnostici papilarnih karcinoma je već spomenuta ultrazvučna dijagnostika vrata, uz aspiracijsku biopsiju iglom (engl. FNAB, Fine-needle aspiration biopsy) (17). Citološka analiza aspirata tkiva štitnjače najčešće se određuje prema Bethesda stupnjevanju. Bethesda stupnjevanje sastoji se od šest stupnjeva. Stupanj 1: neadekvatan uzorak, stupanj 2: benigna tvorba, stupanj 3: atipija neodređenog značenja ili folikularna lezija neodređenog značenja, stupanj 4: folikularna neoplazma, stupanj 5: suspektan malignom, stupanj 6: potvrda malignoma (18).

Tablica 1. Bethesda stupnjevanje citološke analize tvorbi štitnjače (19).

Stupanj	Opis	Rizik od maligniteta
I	Uzorak nije moguće procijeniti	5-10%
II	Benigna tvorba	0-3%
III	Atipija neodređenog značenja/Folikularna lezija neodređenog značenja	10-30%
IV	Folikularna neoplazma ili suspektan za folikularnu neoplazmu	25-40%
V	Suspektan za malignitet	50-75%
VI	Malignitet	97-99%

Ova metoda dijagnostike karcinoma štitnjače zlatni je standard u dijagnostici zbog svoje relativno lagane izvedbe, niskog rizika od komplikacija, ali i, najvažnije, velike točnosti u dijagnozi.

Prema velikoj studiji s Klinike Mayo, citopunkcija ima 97% pozitivnu prediktivnu vrijednost, a 92% negativnu prediktivnu vrijednost za sve malignome štitnjače (20).

Iako je sistem klasifikacije Bethesda detaljno razrađen, dijagnostičke sumnje, prije svega preoperativne, javljaju se kod stupnjeva III i IV jer postoji mogućnost od 10 do 40% da je tvorba maligna, što se zasad može razlučiti jedino patohistološkom analizom, odnosno prethodno učinjenim kirurškim zahvatom (21). Ova je problematika jedan od glavnih razloga

potrage za adekvatnim biljegom koji bi preoperativno, uz visoku osjetljivost i specifičnost, razlikovao benignu od maligne tvorbe u štitnjači.

1.3. Stupnjevanje bolesti

Iako su papilarni karcinomi štitnjače sporo rastući tumori s veoma dobrom prognozom bolesti, i dalje se prezentiraju sa širokim opsegom bolesti koji uključuje i lokoregionalno i udaljeno metastaziranje bolesti, što je značajan problem u određivanju optimalnog modaliteta kirurškog liječenja. Stoga je od velike važnosti preoperativno stupnjevanje bolesti.

Prilikom procjene stadija bolesti najčešće se upotrebljava stupnjevanje TNM kolaboracija AJCC (engl. American Joint Commission on Cancer) i UICC (engl. Union For International Cancer Control). U toj klasifikaciji procjenjuju se veličina tumora (T), prisutnost i broj metastatskih čvorova na vratu (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M). Prema toj klasifikaciji, u koju ulazi još i dob bolesnika (dob veća od 45 godina dodatni je rizični čimbenik), papilarni karcinomi štitnjače mogu se svrstati u četiri stadija (I – IV). (Tablice 2, 3, 4)

Tablica 2. „Tumor“ klasifikacija papilarnog karcinoma štitnjače

TX	Primarni tumor ne može se procijeniti
T0	Nema dokaza o primarnom tumoru
T1	Tumor ≤ 2 cm u najvećoj dimenziji, ograničen na štitnjaču
T1a	Tumor ≤ 1 cm u najvećoj dimenziji, ograničen na štitnjaču
T1b	Tumor > 1 cm, ali ≤ 2 cm u najvećoj dimenziji, ograničen na štitnjaču
T2	Tumor > 2 cm, ali ≤ 4 cm u najvećoj dimenziji, ograničen na štitnjaču
T3	Tumor > 4 cm ograničen na štitnjaču ili značajna ekstratireoidna ekstenzija koja invadira samo infrahiodne mišiće
T3a	Tumor > 4 cm ograničen na štitnjaču
T3b	Značajna ekstratireoidna ekstenzija koja invadira samo infrahiodne mišiće (sternohiodni, sternotireoidni, tirohiodni ili omohiodni mišić), neovisno o veličini tumora
T4	Značajna ekstratireoidna ekstenzija izvan infrahiodne muskulature
T4a	Značajna ekstratireoidna ekstenzija koja zahvaća supkutana meka tkiva, grkljan, dušnik, jednjak ili povratne živce, neovisno o veličini tumora
T4b	Značajna ekstratireoidna ekstenzija koja zahvaća prevertebralnu fasciju, okružuje karotidnu arteriju ili medijastinalne krvne žile, neovisno o veličini tumora

Tablica 3. „Node“ i „Metastasis“ klasifikacija metastatskih limfnih čvorova i udaljene bolesti kod papilarnog karcinoma štitnjače

Regionalni limfni čvorovi	
NX	Regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
N0	Bez lokoregionalnih metastaza
N0a	Jedan ili više citološki ili histološki dokazanih benignih limfnih čvorova
N0b	Bez radioloških ili kliničkih dokaza o postojanju lokoregionalnih metastaza
N1	Metastaze u regionalnim čvorovima
N1a	Metastaze u regijama VI i VII (pretrahealnim, paratrahealnim, prelaringealnim/delfijskim) ili u limfnim čvorovima gornjeg medijastinuma; mogu biti unilateralni ili bilateralni
N1b	Metastaze u unilateralnim, bilateralnim ili kontralateralnim lateralnim limfnim čvorovima (regije I, II, III, IV ili V) ili u retrofaringealnim limfnim čvorovima
Udaljene metastaze	
MX	Udaljene metastaze ne mogu se procijeniti
M0	Bez udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze

Tablica 4. Stadij bolesti prema klasifikaciji TNM

Stadij	Dob < 55	Dob > 55
I	Bilo koji T, N; M0	T1N0M0 T2N0M0
II	Bilo koji T, N; M1	T1N1M0 T2N1M0 T3a/T3b, bilo koji N, M0
III		T4a, bilo koji N, M0
IVA		T4b, bilo koji N, M0
IVB		Bilo koji T, N; M1

Od ostalih klasifikacijskih sustava, često se upotrebljavaju i sustavi AMES i AGES/MACIS.

Sustav AMES koristi dob, prisutnost distalnih metastaza, opseg tumorske invazije i veličinu tumora u razvrstavanju bolesnika u visokorizične i niskorizične. Prema tom sustavu niskorizični bolesnici su muškarci mlađi od 41 godine ili žene mlađe od 51 godine bez udaljenih metastaza te svi stariji pacijenti bez ekstratireoidnog širenja papilarnog karcinoma ili tumora manjeg od 5 cm u promjeru. Niskorizični pacijenti imaju smrtnost od 1,8%, s mogućnošću recidiva od 5%, a visokorizični imaju smrtnost od 46%, s mogućnošću recidiva od 55% (22).

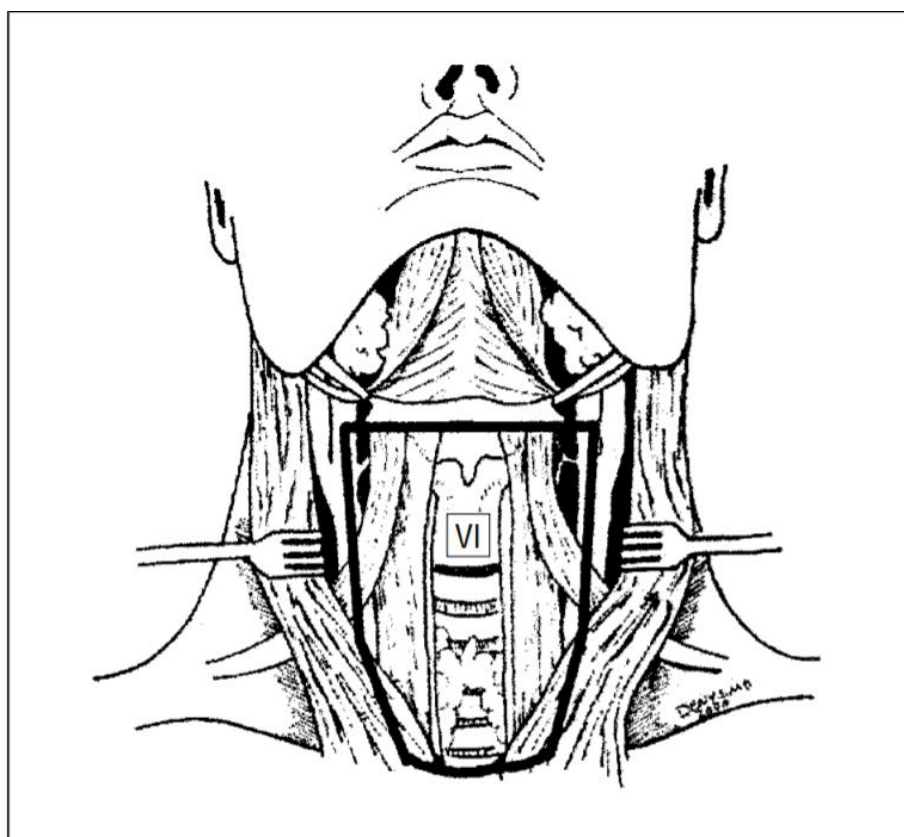
Sustav klasifikacije AGES upotrebljava dob, histološki stadij tumora, opseg bolesti i veličinu tumora. Taj je sustav zamijenio sličan sustav klasificiranja, MACIS. MACIS umjesto histološkog stadija tumora u obzir uzima postojanje udaljenih metastaza, opseg tumorske resekcije i ekstratireoidnu invaziju (23, 24).

Prema MACIS-u, ovisno o skor, pacijenti mogu biti stratificirani u četiri skupine sa značajnim razlikama u dvadesetogodišnjem preživljenju.

1.4. Regionalno širenje karcinoma štitnjače

Primarna regija limfne opskrbe štitnjače je centralni odjeljak vrata, odnosno vratna regija VI. Anatomske granice regije VI su latero-lateralno zajedničke karotidne arterije, gornja granica je tijelo jezične kosti, a donja je granica suprasternalna incizura (Slika 1.).

Procjenjuje se da oko 3% pacijenata prilikom dijagnoze maligne bolesti štitnjače ima udaljene metastaze, a oko 37% pacijenata ima metastatske limfne čvorove na vratu (25). Ipsilateralna lateralna regija vrata ima istu stopu metastaziranja kao i centralna regija vrata (26).



Slika 1. Regija VI; Preuzeto iz: Robbins KT, Clayman G, Levine PA, i sur. Neck Dissection Classification Update. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* 2002;128(7):751. doi:10.1001/archotol.128.7.751 (27).

1.4.1. Čimbenici rizika za regionalno širenje bolesti

Trenutačno ne postoje dijagnostičke metode koje mogu diferencirati papilarne karcinome koji su posebno biološki agresivni od onih indolentnih koji se neće prezentirati lokoregionalnom metastatskom bolešću ili recidivima te je stoga potrebno bolje razumijevanje molekularne patologije radi određivanja prognostičke značajnosti metastaza (28). U skladu s time, brojne studije pokušale su identificirati prediktore metastaziranja papilarnog karcinoma u centralne i lateralne odjeljke vrata. Prema Kim SK i sur. čimbenici rizika za metastaze papilarnog mikrokarcinoma u lateralnim regijama vrata su muški spol, ekstratireoidno širenje tumora, veličina veća od 0,5 cm i postojanje metastaza u centralnom odjeljku, a za centralne odjeljke još su identificirali multicentričnost i bilateralnost (29). Lai XJ i sur. kao čimbenike rizika za lateralne metastaze navode dob veću od 45 godina, veličinu tumora veću od 2 cm, kalcifikacije, centralne metastaze i lateralno smješten tumor (30). Tumori veći od 1 cm i metastaze u centralnom odjeljku također su bili identificirani kao faktori rizika za razvoj lateralnih metastaza prema nedavnom istraživanju Feng JW i sur. (31). Slični su čimbenici ustanovljeni i u drugim istraživanjima (32). Song M i sur. su, osim već navedenih čimbenika rizika, identificirali i negativnu mutaciju BRAF V600E kao čimbenik rizika za metastaziranje u lateralne odsječke vrata (33).

1.4.2. Dijagnostika regionalne bolesti

Za preoperativnu dijagnostiku metastaza papilarnog karcinoma preporučuje se ultrazvuk (UZV), prema smjernicama NCCN i ATA (17). Prema radu Moreno MA i sur. UZV vrata otkriva postojanje metastaza u centralnom odjeljku vrata u 23,9% slučajeva kod potvrđenih papilarnih karcinoma. Zanimljivo, u istom radu navedeno je da je 71,4% pacijenata u kojih je provedena profilaktička disekcija regije VI (bez UZV-om verificiranih metastaza) imalo pozitivne limfne čvorove u regiji VI na patohistološkoj analizi (34).

1.4.3. Okultne i „skip“ metastaze

Istraživanja su pokazala da značajan postotak pacijenata u trenutku liječenja ima okultne metastaze u centralnim i lateralnim regijama vrata, uz relativno čestu pojavnost kod mlađih pacijenata (35). Postotak okultnih metastaza se prema istraživanjima kreće od 31,7 do 66% (36, 37, 38, 39). Prema Hartl DM i sur. oko 23% pacijenata s papilarnim karcinomom ima okultne metastaze u lateralnim regijama vrata (39).

Premda se procjenjuje da 80% pacijenata koji imaju lateralne metastaze ima i metastaze u centralnom odjeljku (40), poseban problem je „skip“ metastaziranje u lateralne regije vrata. Iako je primarna limfna drenažna regija štitnjače regija VI, nekada metastaze mogu „preskočiti“ (engl. „skip“) tu regiju i metastazirati u lateralne regije vrata, što povećava mogućnost lokoregionalnog recidiva bolesti (41).

Prema studijama pojavnost „skip“ metastaza u lateralne regije vrata iznosi oko 7%. U dvije studije identificirani su čimbenici koji dovode do pojave „skip“ metastaza: dob (kod mikrokarcinoma mlađa dob, kod ostalih dob starija od 45 godina), veličina tumora, multicentričnost, bilateralnost, enkapsulacija, ekstratireoidno širenje i limfatička invazija, no osim mikrokarcinoma nisu pronađeni drugi čimbenici povezani s nastankom „skip“ metastaza (39, 42, 43). U studiji Lim YC i Koo BS „skip“ metastaze javile su se u 19% ispitanika. Ti istraživači naveli su izostanak limfovaskularne invazije i ekstrakapsularno širenje primarnog tumora kao moguće čimbenike „skip“ metastaziranja (44). U studiji Park JH i sur. „skip“ metastaze javile su se kod 21,8% pacijenata, češće u onih s tumorom manjim od 1 cm te onima smještenim u gornjim polovima (45), što je u skladu s drugim istraživanjima (46, 47, 48, 49).

1.5. Liječenje dobro diferenciranih karcinoma štitnjače

1.5.1. Liječenje primarnog tumora

Prema smjernicama Američkog udruženja za štitnjaču (ATA, American Thyroid Association), zlatni standard liječenja dobro diferenciranih karcinoma štitnjače je kirurgija (slika 3.). Preporučuje se totalna tireoidektomija za tumore veće od 4 cm, one s metastazama (regionalnim ili udaljenim) te one sa značajnom ekstratireoidnom invazijom. Za tumore veličine između 1 i 4 cm, liječenje se može sastojati od totalne tireoidektomije ili lobektomije, koja je rezervirana za papilarne i folikularne karcinome niskog rizika. Za tumore manje od 1 cm dovoljna je i lobektomija, ako nema jasnih indikacija za odstranjenjem i drugog režnja (npr. izostanak prijašnjeg zračenja u području glave i vrata, nasljednog karcinoma štitnjače ili metastaza). Ostale, znatno manje upotrebljavane metode liječenja papilarnih karcinoma, koje se prije svega upotrebljavaju kod manjih i manje rizičnih karcinoma, jesu perkutana injekcija etanolom i radiofrekventna ablacija (17).

1.5.2. Liječenje primarne regionalne bolesti

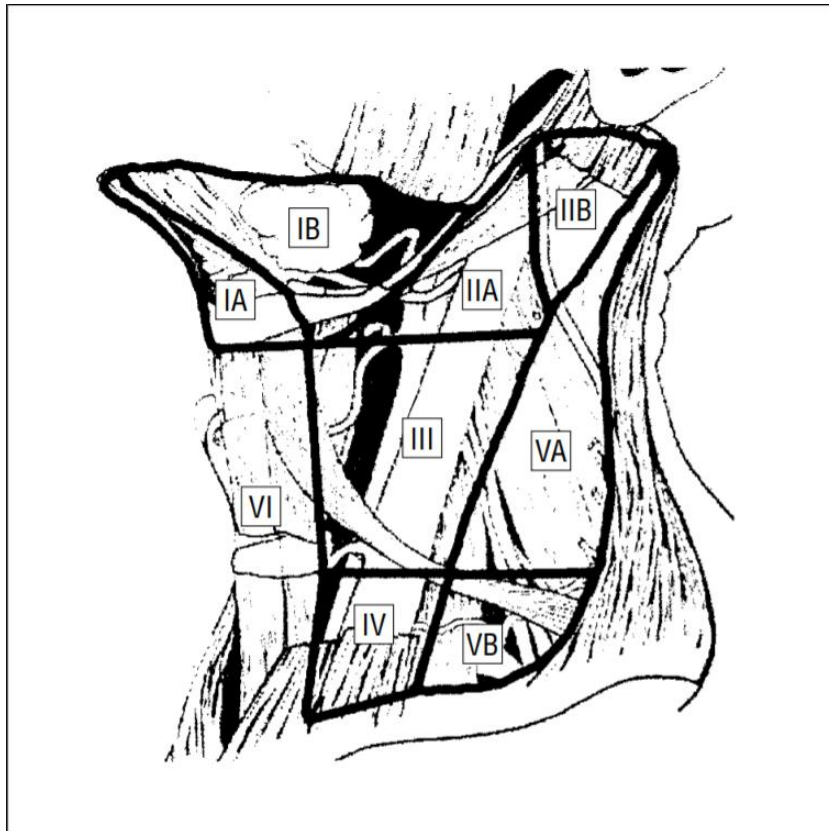
Prema smjernicama ATA-e preporučuje se disekcija vrata regije VI ako se metastaze verificiraju ultrazvučno preoperativno ili u trenutku operacije štitnjače. Elektivna disekcija regije VI preporučuje se u pacijenata s višim stadijima bolesti (III. i IV. stadij) ili ako imaju metastaze u lateralnim regijama vrata. Elektivne operacije lateralnih regija vrata se ne preporučuju. Ako pacijenti imaju metastaze u lateralnim regijama vrata, preporučuje se radikalna disekcija regija od II do V, među ostalim i radi izbjegavanja morbiditeta povezanog s reoperacijom i bolje prognoze (17, 50, 51, 52).

Disekciju vrata je kao terapijsku opciju za regionalno liječenje tumorskih bolesti glave i vrata prvi put opisao poljski kirurg Franciszek Jawdyski (1851. – 1896.) krajem 19. stoljeća, a koncept disekcije vrata u zapadnom svijetu razradio je i popularizirao američki kirurg George Washington Crile (1864. – 1943.), koji je i definirao ono što danas nazivamo radikalnom disekcijom vrata. Radikalna disekcija vrata podrazumijeva odstranjivanje sveg limfatičnog tkiva kroz regije vrata od I do V uz odstranjenje sternokleidomastoidnog mišića, unutarnje

jugularne vene i n. accesoriusa. Radikalna disekcija vrata smatra se temeljnom disekcijom po kojoj se uspoređuju i razvijaju i ostale disekcije vrata, među kojima se ističu modificirana radikalna i selektivna. Modificirana radikalna disekcija uključuje, kao i radikalna, odstranjenje limfatičnog tkiva regija od I do V, ali uz očuvanje barem jedne od tri opisivane nelimfatične strukture u radikalnoj disekciji vrata: unutarnje jugularne vene, n. accesoriusa ili sternokleidomastoidnog mišića. U početku, dominantno izvođena disekcija bila je radikalna, no vrijeme je pokazalo da modificirana radikalna disekcija u određenim slučajevima ne kompromitira onkološko liječenje, a značajno smanjuje morbiditet prouzročen odstranjenjem nelimfatičnih struktura, prije svega n. accesoriusa. Prvi kirurzi koji su zagovarali modificiranu radikalnu disekciju su Oswaldo Suarez, Ettore Bocca i Oreste Pignataro.

S obzirom na kompleksnost anatomije glave i vrata te postojanje velikog broja neurovaskularnog tkiva, prilikom izvođenja disekcije postoji velika opasnost od jatrogenih lezija i komplikacija.

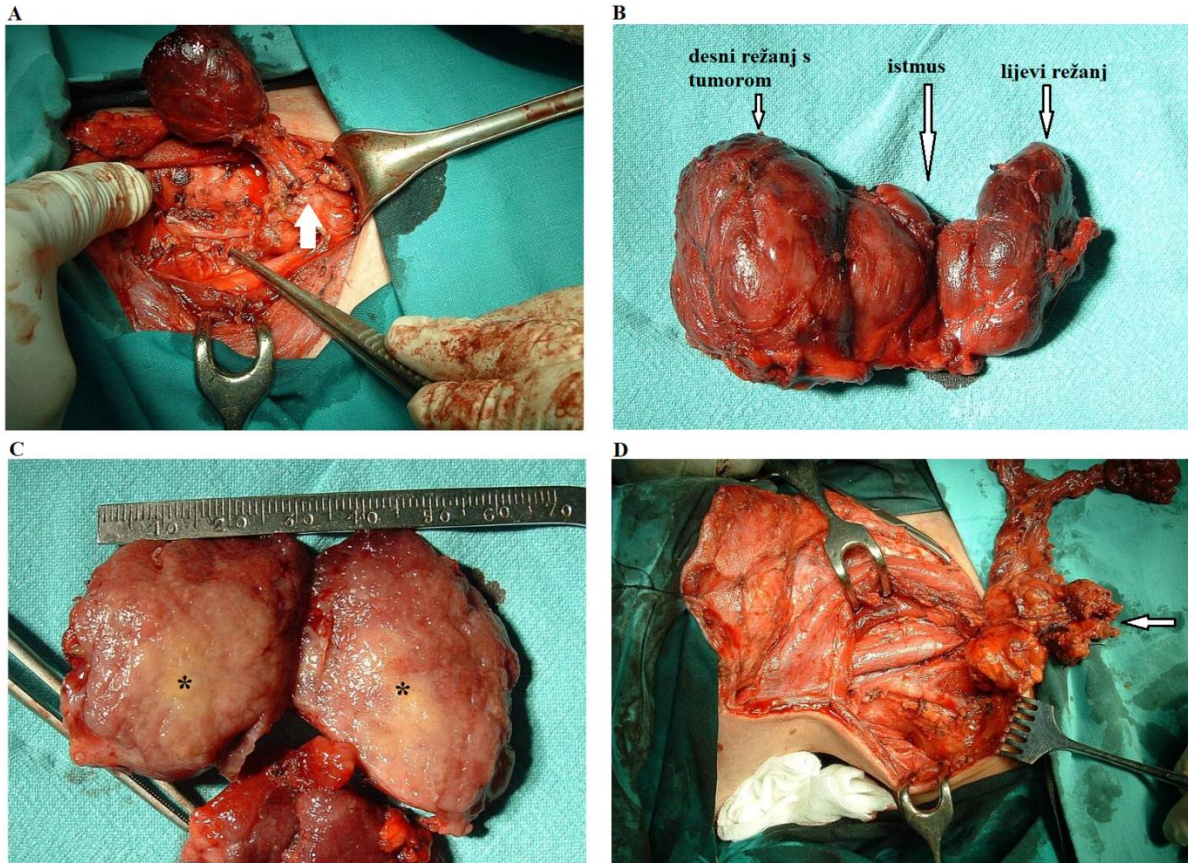
Komplikacije disekcija vrata kod tumora štitnjače ugrubo se mogu podijeliti na one koje nastaju disekcijom centralnog odjeljka (regija VI) i one koje nastaju disekcijom lateralnih odjeljaka (regije od I do V) (Slika 2.).



Slika 2. Regije vrata od I do VI. Preuzeto iz: Robbins KT, Clayman G, Levine PA, i sur. Neck Dissection Classification Update. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* 2002;128(7):751. doi:10.1001/archotol.128.7.751 (27).

Komplikacije disekcije centralnog odjeljka su hipoparatiroidizam, koji može biti primarni i trajni, te ozljeda povratnog ili gornjeg laringealnog živca.

Komplikacije prilikom operacije lateralnih regija vrata su trajni ili prolazni hipoparatiroidizam, ozljeda glavnog limfatičnog voda (ductus thoracicus) ili desnostranog limfatičnog voda (ductus lymphaticus dexter), krvarenje, serom, infekcije rane te ozljede živaca – XI. kranijalnog živca (nervus accesorius), mandibularne grane ličnog živca, simpatičkog pleksusa, n. phrenicusa, brahijalnog pleksusa i kožnoga cervikalnog pleksusa (53).



Slika 3. Intra- i perioperativne slike štitnjače s papilarnim karcinomom i disekcije vrata. A – štitnjača s tumorom u desnom režnju (bijeli asterisk) i disektat regije VI (strelica); B – štitnjača; C – razrezani desni režanj štitnjače i prikaz papilarnog karcinoma (crni asterisk); D – modificirani radikalni disektat (strelica) (Izvor: ljubaznošću djelatnika Klinike za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“)

1.5.3. Postoperativno liječenje

Postoperativno liječenje radioaktivnim jodom je prema ATA-inim smjernicama i ATA-inoj stratifikaciji pacijenata (Tablica 5.) indicirano u pacijenata koji imaju makroskopsko ekstratiroidno širenje primarnog tumora ili udaljenu metastatsku bolest, a može se razmotriti u pacijenata koji imaju regionalnu metastatsku bolest, tumor veći od 4 cm ili mikroskopsko ekstratiroidno širenje. Kod razmatranja primjene radionuklidnog liječenja u srednje i visokorizičnih bolesnika u obzir treba uzeti faktore rizika koji upućuju na težu bolest, kao što su određene podvrste papilarnog karcinoma, prisutnost intratiroidne vaskularne invazije ili

multifokalnost bolesti. Multifokalna bolest manja od 1 cm i bez faktora rizika ne zahtijeva radionuklidno liječenje.

Tablica 5. ATA-smjernice za postoperativno provođenje radionuklidnog liječenja

ATA-klasifikacija rizičnosti i adjuvantnog radionuklidnog liječenja		
ATA-klasifikacija	Opis	Indicirano adjuvantno radionuklidno liječenje
Niski rizik – T1a, N0, Nx, M0, Mx	Tumor manji od 1 cm	Ne
Niski rizik – T1b, T2, N0, Nx, M0, Mx	Tumor između 1 i 4 cm	Nije rutinski
Niski do umjereni rizik – T3, N0, Nx, M0, Mx	Tumor veći od 4 cm	Razmotriti – ovisno o prisutnosti negativnih čimbenika
Niski do umjereni rizik – T3, N0, Nx, M0, Mx	Mikroskopska ekstratireoidna ekstenzija, bilo koja veličina tumora	Razmotriti – preporučljivo
Niski do umjereni rizik – T1-T3, N1a, M0, Mx	Metastaze u centralnom odjeljku vrata	Razmotriti – preporučljivo
Niski do umjereni rizik – T1-T3, N1b, M0, Mx	Metastaze u lateralnom odjeljku vrata ili medijastinumu	Razmotriti – preporučljivo
Visoki rizik – T4, bilo koji N, bilo koji M	Bilo koja veličina tumora, makroskopska ekstratireoidna ekstenzija	Da
Visoki rizik – M1, bilo koji T, bilo koji N	Udaljene metastaze	Da

Radionuklidno liječenje ima za cilj uništiti bolest koja nije u potpunosti kirurški uklonjena, uništiti moguću, ali nedokazanu rezidualnu bolest ili uništiti perzistentnu ili proširenu bolest.

U liječenju pacijenata s niskom i umjerenom rizičnom bolešću, preporučuje se liječenje radiojodom niske aktivnosti od 30 mCi, a veće doze preporučuju se u pacijenata kod kojih je učinjena suptotalna ili totalna tireoidektomija s očitom rezidualnom bolešću. Za liječenje suspektne mikroskopske rezidualne bolesti, bez udaljene metastatske bolesti, preporučuje se aktivnost do 150 mCi (17).

Poslije kirurškog i adjuvantnog radionuklidnog liječenja, u pacijenata je potrebno suprimirati tireoidni stimulirajući hormon (TSH). Receptori za TSH nalaze se na tumorskim stanicama te njihova aktivacija dovodi do proliferacije i ekspresije pojedinih proteina, npr. tireoglobulina. Supresija TSH provodi se adekvatnim uzimanjem hormonske nadomjesne terapije tetrajodtiroksinom (T4) i trijodtironinom (T3) jer negativnom povratnom spregom inhibiraju izlučivanje TSH iz hipofize (17).

U visokorizičnih pacijenata preporuka je suprimirati TSH na manje od 0,1 mU/L, a u umjereno rizičnih preporuka supresija je između 0,1 i 0,5 mU/L. Za niskorizične pacijente s neznatnim vrijednostima tireoglobulina preporuka je supresija između 0,5 i 2 mU/L, a za one s niskim razinama tireoglobulina preporučena je supresija od 0,1 do 0,5 mU/L (17).

U praćenju pacijenata s karcinomom štitnjače koji su operirani i u kojih je provedeno radionuklidno liječenje, serumski tireoglobulin je biljeg kojim se prati rezidualna ili recidivna bolest. U niskorizičnih i umjereno rizičnih pacijenata, serumski tireoglobulin analizira se svakih 6 – 18 mjeseci. Koncentracija tireoglobulina bi u pacijenata s izvrsnim učinkom kombiniranog kirurškog i radionuklidnog liječenja trebala biti manja od 0,2 ng/mL, a u pacijenata u kojih je provedeno samo kirurško liječenje praćenje se zasniva na rastu koncentracije tireoglobulina, bez točno definiranih vrijednosti koncentracija (17).

Postoperativno se preporučuje UZV vrata svakih 6 – 12 mjeseci uz biopsiju suspektnih limfnih čvorova većih od 8 mm. Niskorizični pacijenti, nakon operacije i radionuklidnog liječenja te bez suspektnih metastaza na vratu uz niske vrijednosti tireoglobulina mogu se samo pratiti uz redovita mjerenja njegove vrijednosti (17).

Ako je prvi sken čitavog tijela (engl. whole body scan, *WBS*) nakon radionuklidnog liječenja u niskorizičnih i umjereno rizičnih pacijenata uredan, uz niske vrijednosti tireoglobulina i bez metastaza na vratu, nije potrebno provoditi novi *WBS* poslije. Dijagnostički *WBS* provodi se u sljedećim situacijama: kada prvi postterapijski *WBS* pokaže abnormalno nakupljanje radionuklida izvan ležišta operirane štitnjače; ako je postterapijski *WBS* pokazao značajno nakupljanje radionuklida u rezidui štitnjače, što onemogućava vizualizaciju slabije nakupljajućih lezija, kao što su metastaze; te u pacijenata s tireoglobulinskim antitijelima s rizikom za lažno negativnu vrijednost tireoglobulina neovisno o urednom ultrazvuku vrata. Ostale metode koje su osjetljivije i rezervirane za diferentne pacijente su *SPECT-CT* i *18FDG-PET/CT*, koje se temelje na povišenoj metaboličkoj apsorpciji radiofarmaka (glukoze) u tumorskom tkivu i emisiji protona ili pozitrona iz radiofarmaka (17).

1.6. Prognoza i preživljenje

Tumor-specifično preživljenje za bolesnike I. stadija prema klasifikaciji TNM je 99,8%, II. stadija je 88,3%, III. 72,4% te za bolesnike IV. stadija 71,9%.

Lošiji prognostički čimbenici su starija životna dob, veći T stadij te prisutnost udaljenih metastaza, a u nekim radovima i prisutnost regionalnih lateralnih i medijastinalnih metastaza. (54, 55, 56, 57, 58)

U radu Ito M i sur. identificiran je klinički, ali ne i patološki N1b stadij kao čimbenik lošije prognoze, kako kod tumor-specifičnog preživljenja tako i kod preživljenja bez bolesti (59). Isti autori su dvije godine poslije pokazali lošije preživljenje u N1b pacijenata s metastazom većom od 3 cm, prisutnošću više od pet pozitivnih čvorova te ektranodalnom ekstenzijom, dok je u N1b pacijenata bez ovih značajki preživljenje bilo isto kao i kod pacijenata s N1a bolešću, no i dalje lošije nego u N0 pacijenata (60).

Specifično preživljenje i ukupno preživljenje također je bilo smanjeno u pacijenata s metastazama u lateralnim regijama u studiji Beasley NJP i sur., uz šesterostruko veću mogućnost lokoregionalnog recidiva (61). Slični su rezultati dobiveni i usporedbom omjera metastatskih čvorova u odnosu na ukupni broj limfnih čvorova u disektatima u studiji Schneider DF i sur (62).

Prema nekim istraživanjima metastaze ne utječu na ukupno preživljenje u pacijenata s niskom i srednjorizičnom bolešću, iako povećavaju rizik od lokoregionalnog recidiva bolesti i podrazumijevaju reoperacije (32, 56, 63). Nasuprot tome su istraživanja koja pokazuju da metastaze sa sobom ipak nose povećan mortalitet i morbiditet (35, 64, 65, 66, 67).

1.7. Recidivirajuća bolest i liječenje

Poslije završenog kirurškog liječenja oko 7% pacijenata razvije regionalnu metastatsku bolest, 6% lokalni povratak bolesti te 5% udaljene metastaze (25).

Rad Davidsona HC i sur. pokazao je da pacijenti s regionalnim metastazama imaju veće izgleda za ponovno pojavljivanje lokoregionalnih recidiva, što nužno vodi u više reoperacija, a najveći rizici za recidiv su neadekvatan opseg operacije i težina bolesti (28).

Prognostički faktori koji utječu na postoperativnu pojavu lokoregionalnih ili udaljenih metastaza su dob iznad 45 godina, neučinjene disekcije vrata pri primarnoj operaciji, T4 ili IV. stadij bolesti (68).

Liječenje lokoregionalnih recidiva papilarnog karcinoma je primarno kirurško (69), što sa sobom nosi ponovnu hospitalizaciju te rizike komplikacije, morbiditeta i moguće mortaliteta.

Prema ATA-smjernicama centralna ili lateralna disekcija u prije operiranoj regiji treba se napraviti u slučajevima biopsijom potvrđenih limfnih čvorova većih od 8 mm u centralnoj regiji i većih od 10 mm u lateralnim regijama. Liječenje udaljenih metastaza provodi se radionuklidnim liječenjem. Postoje tri oblika radionuklidnog liječenja recidiva ili udaljenih metastaza koja se trenutačno upotrebljavaju – empirijska fiksna doza, terapija determinirana gornjom granicom krvne i tjelesne dozimetrije te kvantitativna tumorska ili lezijska dozimetrija. Dozimetrijsko liječenje češće se upotrebljava u pacijenata s udaljenim metastazama ili komorbiditetima koji onemogućavaju empirijsku dozu i u djece. Radiosenzitivnost tumora, čimbenik o kojem ponajviše ovisi učinak liječenja, veća je u mlađih pacijenata s manjim metastazama dobro diferenciranih karcinoma štitnjače (17).

Prema studiji francuskih autora Chéreau N i sur., komplikacije su se javile u 8% bolesnika s reoperacijom recidiva metastaza papilarnih karcinoma, od toga u 1% bolesnika trajno (70). U studiji Javida M i sur. privremeno oštećenje živaca (simpatičkog lanca i n. vagusa) javilo se u 10,3% bolesnika koji su bili podvrgnuti revizijskoj disekciji vrata nakon recidiva, doduše bez trajnih posljedica (51). Slični podatci o komplikacijama reoperacija dobiveni su i u nedavnoj studiji autora Rivera-Robledo CG i sur., od 6,9% (71). U studiji Onkendi EO i sur. koja se bavila reoperacijama relapsirajućeg papilarnog karcinoma 6% pacijenata razvilo je neku od komplikacija; hipoparatiroidizam 3%, paralizu povratnog živca 3%, 0,5% ozljedu n. phrenicusa ili n. accesoriusa te 1,6% serom. Također, poslije prve operacije, dodatnih 40% pacijenata doživjelo je novi relaps bolesti. U toj studiji 11% reoperiranih pacijenata umrlo je od bolesti. Autori smatraju da poboljšana kirurška tehnika ili bolja lokalizacija može pozitivno utjecati na 20%, a dodatnih 20% ovisi o biološkoj agresivnosti tumora (72).

Prema studiji talijanskih autora Giordana D i sur. u postoperativnom praćenju 610 pacijenata s papilarnim karcinomom, 3,4% razvilo je recidiv u lateralnim regijama vrata. Također, pacijenti s recidivima imali su smanjeno specifično preživljenje (engl. disease specific

survival). Autori su naglasili da je iznimno važno identificirati lateralne metastaze zbog prevencije neadekvatnog liječenja tijekom primarne operacije (73).

Bardet S i sur. navode desetogodišnju kumulativnu vjerojatnost recidiva čvorova na vratu nakon kombiniranog liječenja od 7% (74). U tom radu je također kao protektivni čimbenik navedena bilateralna i centralna disekcija vrata.

Simon D i sur. navode da je u prosječnom praćenju od 6,9 godina 26% pacijenata kojima je učinjena totalna tireoidektomija s disekcijom vrata ili bez nje razvilo lokoregionalni recidiv bolesti te je podvrgnuto ponovnom kirurškom zahvatu. Također, što se tiče recidiva bolesti, dobivena je značajna razlika između pacijenata kojima je učinjena samo totalna tireoidektomija i onih kod kojih je učinjena totalna tireoidektomija i disekcija vrata (75).

Visok stupanj lokoregionalne recidivirajuće bolesti, komplikacije koje se javljaju tijekom primarnih operacija, a pogotovo tijekom i nakon operacija recidivirajuće bolesti opterećujući su čimbenici u liječenju karcinoma štitnjače. S obzirom na to da trenutačno ne postoji mogućnost preoperativne diferencijacije između pacijenata koji imaju indolentniji i onih koji imaju agresivniji karcinom, ovo je važno kliničko pitanje, kako u pogledu izbora optimalnog modaliteta kirurškog liječenja tako i postoperativnog praćenja.

1.8. Profilaktička disekcija

Profilaktička disekcija klinički negativnog vrata pitanje je koje ima posebno kliničko značenje, s obzirom na visoku pojavnost metastaza u centralnim i lateralnim odjeljcima vrata, često postojanje okultnih i „skip“ metastaza te visok postotak recidiva.

Argumenti za profilaktičku disekciju centralnih i lateralnih regija vrata su visok postotak okultnih metastaza, bolje stupnjevanje bolesti o kojem onda ovisi adjuvantno radionuklidno liječenje, činjenica da 30% tumora nije osjetljivo na radionuklidno liječenje te da disekcije kod kliničkih metastaza smanjuju regionalne recidive, a reoperacije povećavaju rizik od komplikacija. Protuargumenti su da trenutačno nije dokazano da profilaktičke disekcije kod cN0 vrata smanjuju lokoregionalnu kontrolu bolesti ili preživljenje bez bolesti, da produljuju vrijeme operacije i povećavaju rizik od komplikacija te da u rukama iskusnog kirurga reoperacije nemaju znatno povećani rizik od komplikacija (39).

Prema meta-analizi iz 2017. godine profilaktička disekcija centralnog odjeljka s totalnom tireoidektomijom smanjuje incidenciju lokoregionalnih recidiva za 1%, iako povećava rizik privremene hipokalcemije za 12,1%, trajne za 1,7% te privremene ozljede povratnog živca za 1,3% (76), što su rezultati dobiveni i u studiji Chen L i sur (77).

Prema studiji Fujishima M i sur. profilaktička disekcija lateralnog odjeljka vrata imala je učinak na preživljenje bez recidiva od 20,7%, ali samo u pacijenata s karcinomima većima od 3 cm s pozitivnom ekstratireoidnom ekstenzijom (78).

Postoje oprečna istraživanja što se tiče preživljenja nakon modificirane radikalne disekcije vrata u pacijenata s papilarnim karcinomom. Neka istraživanja nisu uspjela dokazati korisnost (25, 63), druga jesu, prije svega kod evidentne nodalne metastaze pre- ili intraoperativno, kod žena starijih od 60 godina te kod ekstrakapsularnog širenja primarnog tumora (79).

Prema studiji Liu C i sur. provedenoj na 966 pacijenata, profilaktička lateralna disekcija vrata trebala bi se raditi u pacijenata koji u centralnom odjeljku imaju više od tri metastatska čvora. U istoj studiji autori su identificirali čimbenike kao što su muški spol, dob manja od 45, mikrokalifikacije na ultrazvuku i ekstratireoidno širenje tumora kao prediktore metastaziranja u centralni odjeljak (80).

U studiji Ita Y i sur., profilaktička modificirana radikalna disekcija vrata nije utjecala na preživljenje bez bolesti u pacijenata s tumorima manjima od 3 cm, no jest kod onih čiji je primarni tumor između 3,1 i 4 cm (81).

Disekcija centralnog vratnog odjeljka može prouzročiti hipoparatiroidizam i nenamjernu ozljedu povratnog živca, a taj se rizik povećava u reoperaciji centralnog odjeljka kod recidiva, što bi govorilo u prilog agresivnijem inicijalnom zahvatu (82).

Modificirana radikalna disekcija vrata ima veći postotak komplikacija, kao što su hipoparatiroidizam, ozljeda povratnog živca ako se operacija radi u isto vrijeme kada i operacija štitnjače ili regije VI te ozljeda akcesornog živca (83).

Prema studiji Ducoudray R i sur. profilaktička disekcija lateralnih regija vrata mogla bi imati korist kod visokorizičnih pacijenata s papilarnim karcinomom. U njihovoj studiji 8% pacijenata imalo je lateralne metastaze, autori su identificirali ekstratireoidno širenje i hipertireozu kao čimbenike metastaziranja neovisno o regiji, a smještaj tumora u gornjim trećinama i metastazu u centralnom odjeljku kao nezavisne čimbenike metastaziranja u lateralne regije (84).

Dodatni problem je odlična prognoza bolesti, usprkos relativno značajnom postotku okultnih metastaza, ako se postoperativno provede terapija radiojodom (85). U studiji Podnosa YD i sur. jedan od negativnih čimbenika preživljenja bilo je upravo neprovođenje adjuvantnog radionuklidnog liječenja (57). Također, dobri rezultati u preživljenju bez bolesti (engl. disease free survival) nakon kombinirane terapije dobiveni su u studiji O'Neill CJ i sur. u pacijenata s papilarnim karcinomom i sinkronim lateralnim metastazama; u toj studiji nakon prosječnog praćenja pacijenata od 2,6 godina, 13% pacijenata imalo je recidiv metastatskih čvorova. Autori su kao prognostičke čimbenike recidiva naveli povećanu koncentraciju tireoglobulina postoperativno i povećan omjer metastatskih/urednih limfnih čvorova (86).

Zbog brojnih kontradiktornih istraživanja koja su se bavila disekcijama vrata kod papilarnog karcinoma te prognoze bolesti (lokoregionalnim recidivima, morbiditetu, mortalitetu), ovo pitanje ostaje otvoreno (74). Neki autori, poput Gambardella C i sur., upravo zbog brojnih kontradiktornih radova, smatraju da je glavno pitanje oko profilaktičkih disekcija identificiranje visokorizičnih pacijenata (87).

Zato smatramo da je važno kliničko pitanje pravilna stratifikacija papilarnih karcinoma štitnjače prema njihovoj biološkoj agresivnosti. Pravodobno prepoznavanje tih karcinoma te posljedično prošireno primarno kirurško liječenje, koje bi stoga uključivalo i elektivnu disekciju lateralnih i centralnih regija vrata, značajno bi smanjilo morbiditet, a moguće i mortalitet bolesti. Stoga se ovo istraživanje bazira na potencijalnom identificiranju biljega koji bi mogli upozoriti na biološki agresivniji tip karcinoma.

1.9. Papilarni mikrokarcinomi

Papilarni mikrokarcinomi definirani su kao papilarni karcinomi koji imaju 1 cm ili manje u najvećem promjeru. Predstavljaju značajan terapijski problem zbog svoje dvojake naravi. Već je spomenuta relativno indolentna priroda papilarnih karcinoma, što također vrijedi za mikrokarcinome, te je spomenuto i sve češće otkrivanje takvih mikrokarcinoma kao sporednih nalaza u obradi štitnjače zbog neke druge patologije ili na sistematskim pregledima. Kao što je već rečeno, incidencija otkrivanja papilarnog karcinoma raste, a otprilike 49% svih novootkrivenih karcinoma čine mikrokarcinomi. S druge strane, mikropapilarni karcinomi mogu metastazirati u centralne i lateralne odjeljke vrata, što uzrokuje značajan morbiditet kod većinski mlađe populacije. Stoga, postoje različita mišljenja o optimalnom liječenju papilarnog mikrokarcinoma. Prema smjernicama Američke udruge za štitnjaču (ATA), papilarni mikrokarcinomi smatraju se tumorima niskog rizika te se kao modalitet liječenja preporučuje lobektomija štitne žlijezde ili čak aktivno praćenje (17). Aktivno praćenje je relativno novi koncept koji su prvi put predložili 1993. japanski liječnici u bolnici Kuma u Kobeu a koji se bazira na većinski indolentnoj naravi papilarnog mikrokarcinoma, pri čemu se karcinom ne operira, nego se pacijent sustavno prati, klinički i ultrazvučno, i operira u slučaju progresije bolesti. Rezultati istraživanja pokazuju da je aktivno praćenje validan terapijski modalitet kod niskorizičnih papilarnih mikrokarcinoma te da u pacijenata ne uzrokuje anksioznost i ne utječe na kvalitetu života, iako i o tome postoje oprečna istraživanja (88, 89, 90, 91). Prema konsenzusu Japanskog udruženja endokrinih kirurga u vezi s aktivnim praćenjem, papilarni mikrokarcinomi koji zahtijevaju kirurško liječenje su oni s prisutnošću regionalnih ili udaljenih metastaza, oni koji se nalaze uz ili invadiraju povratni živac, koji naliježu na ili invadiraju dušnik, agresivni podtipovi, koji su povezani s drugim bolestima štitnjače ili doštitnih tjelešaca koje zahtijevaju kirurško liječenje ili koji se javljaju u pacijenata mlađih od 20 godina. Također, preporuka je da se kirurško liječenje izvrši nakon razdoblja aktivnog praćenja ako promjer tumora naraste iznad 13 mm, ako se pojave metastaze, ako se pacijent predomisli ili ako se pojave druge bolesti štitnjače ili doštitnih tjelešaca koje zahtijevaju kirurško liječenje (92). U studiji Oda H i sur. koja je analizirala aktivno praćenje pacijenata, u njih 0,5% javila se metastatska bolest koja je zahtijevala kirurško liječenje (93).

Jedan od glavnih razloga aktivnog praćenja je smanjenje operativnih komplikacija uz istovjetnu prognozu bolesti (93).

Ipak, prema radu Al-Qurayshi Z i sur., negativni prognostički čimbenici se kod papilarnog mikrokarcinoma javljaju u 19% slučajeva. Povezani su s lošijim preživljenjem te je potreban oprez pri evaluaciji optimalnog terapijskog modaliteta u doba konzervativnijeg liječenja ove bolesti (94).

Metastaziranje se kod papilarnog mikrokarcinoma, prema Mehanni H i sur., javlja u do 30% slučajeva. Prema istoj studiji, u oko 6% pacijenata se postoperativno javlja recidivirajuća bolest u obliku metastaza (95). Lateralna metastatska bolest prisutna je u trenutku liječenja kod 4,4% pacijenata (94, 96). Čimbenici rizika za razvoj lateralnih metastaza su ekstratireoidno širenje tumora, metastaze u centralnom odjeljku vrata, multifokalna bolest i smještaj tumora u gornjim polovima štitnjače, muški spol, mlađa životna dob, kalcifikacija tumora, tumorski kontakt >25% s kapsulom štitnjače i veličina veća od 0,5 cm (96, 97, 98, 99). Iako je metastaza u centralnom odjeljku vrata pouzdan čimbenik rizika za razvoj i prisutnost metastaza u lateralnim dijelovima vrata gledajući sve papilarne karcinome općenito, kod 7,4% pacijenata javljaju se „skip“ metastaze te je kao jedan od čimbenika rizika za razvoj „skip“ metastaza upravo mikrokarcinom (43).

Kao što je već navedeno, zlatni standard u liječenju lateralnih metastaza je disekcija vrata koja uključuje regije II, III, IV i V. U prilog takvoj disekciji i kod papilarnog mikrokarcinoma govori činjenica da se metastaze u 50,7% slučajeva javljaju simultano u više regija vrata i da sa sobom nosi manju vjerojatnost recidiva u odnosu na selektivnu disekciju (100).

1.10. Genomika, proteomika i biljezi

1.10.1. Genomika

Genomika je grana biologije koja istražuje strukturu i funkciju genoma, cjelokupnog genetskog sadržaja organizma. Ljudski genom je prvi put sekvencioniran i mapiran 2000., istovremeno su to napravili američki National Institutes of Health (Human Genome Project) i Celera Corporation na čelu s Craigmom Venterom. Genomika se od tada, kao i druge srodne „omike“ (proteomika, epigenomika, transkriptomika, metabolomika), gotovo eksponencijalno razvija.

Iako sekvencioniranje i mapiranje ljudskog genoma predstavlja značajan uspjeh u razumijevanju strukture ljudskog organizma, ono ima relativno mali utjecaj na razumijevanje funkcije produkata toga genoma. Limitiranost se najbolje očituje u činjenici da ljudski genom sadržava oko 25.000 gena, a ti geni kodiraju više od pola milijuna proteina, koji poslije podliježu posttranslacijskim modifikacijama, utjecaju intrastaničnog i izvanstaničnog miljea, utjecaju patoloških procesa i drugih čimbenika, čime broj mogućih varijanti proteina gotovo eksponencijalno raste uz, također, promjene proteina u vremenu (101, 102, 103).

Temeljni rad o genomu papilarnih karcinoma štitnjače projekta *The Cancer Genome Atlas* objavljen je 2014. godine. U njemu je istraživano 496 papilarnih karcinoma. Istraživači su ustanovili relativno nisku sveukupnu gustoću somatskih mutacija koja iznosi 0,41 ne-sinonimnih mutacija po Megabazi, što može objasniti relativno indolentni tijek većine karcinoma štitnjače. Pokazano je da veći broj mutacija korelira s recidivnošću bolesti, stupnjevanjem MACIS i starošću. Smatra se da su trenutačno poznate mutacije koje uzrokuju malignu transformaciju, tzv. driver mutacije, uzrok bolesti kod 98,8% svih papilarnih karcinoma, a za 1,2% još nisu poznati genetski uzroci. U tom istraživanju identificirano je sedam bitno mutiranih gena, od kojih četiri (BRAF, KRAS, NRAS, HRAS) sudjeluju u mitogen-aktiviranom protein kinaza signalnom putu (MAPK). U 61,7% slučajeva ustanovljena je BRAF mutacija, a kod 12,9% slučajeva javila se RAS (KRAS, NRAS, HRAS) mutacija. BRAF mutacija češće se javlja kod klasične i tall-cell varijante, a RAS se javlja češće kod folikularne varijante karcinoma. Također, ove se mutacije javljaju gotovo isključivo zasebno jedna od druge. U istom radu, kod 1,5% pacijenata ustanovljena je mutacija eukariotskog translacijskog inicijacijskog faktora 1A, X povezanog (EIF1AX), koji

se javlja gotovo isključivo zasebno od MAPK mutacija. Preostala dva značajno mutirana gena su PPM1D i CHEK2, koji se javljaju zajedno s MAPK mutacijama. U 74 slučaja otkrivene su fuzije gena koje su se javile zasebno od BRAF i RAS mutacija. Najčešće se javljaju RET fuzije, u 6,8% slučajeva. BRAF fuzije javile su se u 2,7% slučajeva, PAX8/PPARG u 0,8%, ETV6/NTRK3 i RBPMS/NTRK3 u 1,2%, THADA fuzije u 1,2% te ALK fuzije u 0,8% slučajeva. Somatske alteracije broja kopija pronađene su u 135 tumora. One su bile bitno povišene u slučajevima gdje nije bilo mutacija gena ili fuzija. Najčešće se javlja izolirani gubitak 22q regije koja kodira gene NF2 i CHEK2, a nešto rjeđe javlja se amplifikacija 1q (104).

1.10.2. Proteomika

Proteini se smatraju glavnim pokretačima procesa u organizmu, kako fizioloških tako i patoloških, te je u skladu s tim saznanjem genomska era u samo nekoliko godina evoluirala u postgenomsku eru. Skup svih proteina naziva se proteomom, a grana znanosti koja se bavi proteomom naziva se proteomikom.

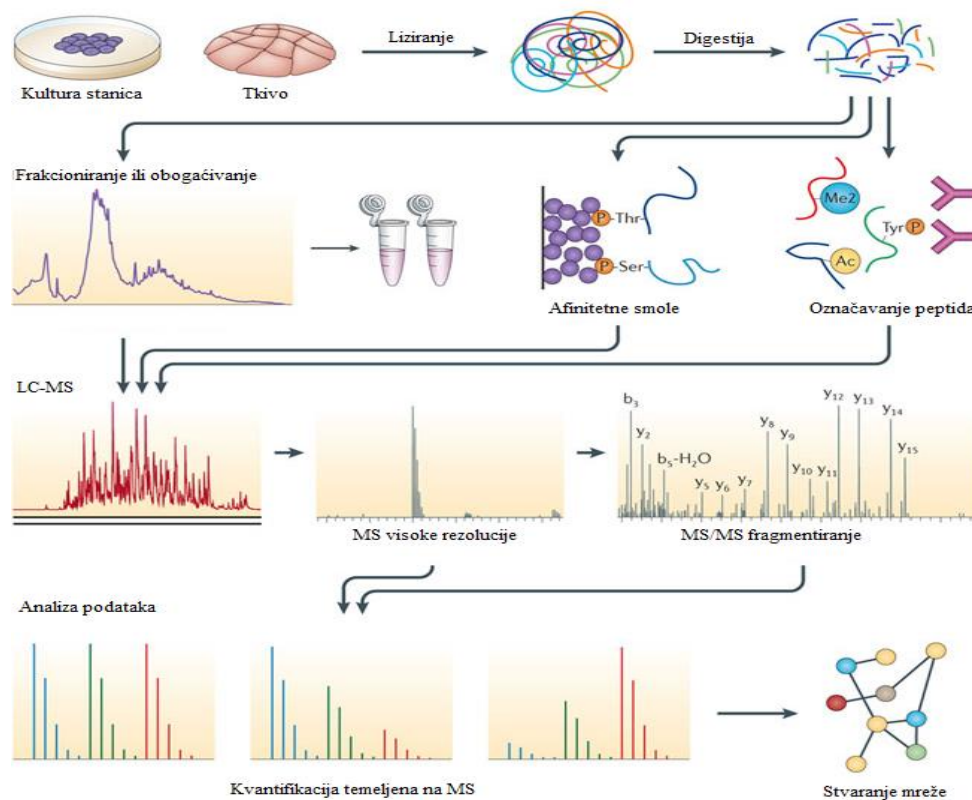
Proteomska istraživanja specifična su po tome jer omogućuju identifikaciju čitavog spektra proteina u uzorku, bez prethodnog poznavanja sastava uzorka, odnosno prethodnog definiranja cilja analize. Time se omogućuje probir određenih proteina u uzorku koji su od možebitnog posebnog značenja i njihova daljnja analiza.

Iako su prva proteomska istraživanja počela sredinom 70-ih godina 20. stoljeća, prva istraživanja na tkivu fiksiranom u formalin uklopljenom u parafin (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) obavljena su 2005. godine na tkivu karcinoma prostate (105). Razlog je biotehnološke prirode – do tada nije bilo moguće adekvatno ekstrahirati proteine jer se fiksacijom u formalinu stvaraju snažne kovalentne križne veze između proteina u tkivu. Razvojem biotehnologije koja omogućuje adekvatno razdvajanje proteina, odnosno peptida i kasniju identifikaciju, stvorili su se preduvjeti za masovnu primjenu proteomike. Analiza FFPE tkiva je, u komparaciji sa svježim zamrznutim tkivom, adekvatna za proteomsku analizu, ali je glavna prednost u odnosu na svježe zamrznuto tkivo dostupnost i mogućnost arhiviranja (106). Naime, najčešća metoda kojom se pohranjuje i analizira tkivo za patohistološku analizu je upravo FFPE. Stoga je mogućnost upotrebe FFPE tkiva značajno unaprijedila i

proširila proteomska istraživanja i zaslužna je za gotovo eksponencijalni porast takvih istraživanja.

S obzirom na to da proteomika daje informacije o proteomu nekog tkiva u vremenu, najperspektivnija uloga proteomike je u identificiranju potencijalnih biljega (107).

Proteomska analiza tkiva počiva na tehnologijama masene spektrometrije i tekućinske kromatografije. Prije analize masenim spektrometrom i tekućinskim kromatografom, iz analiziranog uzorka tkiva najprije se izoliraju proteini te procesima denaturacije i digestije peptidi koji se podvrgavaju analizi. Sljedeći koraci su razdvajanje peptida preparativnom kromatografijom, prevođenje iz tekućeg u plinovito stanje metodom elektrosprej ionizacije, fragmentacija dobivenih iona tandem MS postupkom u masenom spektrometru te naposljetku određivanje mase tzv. roditeljskih peptida i njihovih fragmentiranih dijelova. Dobiveni podatci se potom *in silico* povezuju s dostupnim proteomskim bazama podataka te se tako identificiraju aminokiselinski sljedovi i sukcesivno tome određeni proteini (108).



Slika 4. Grafički prikaz postupaka u proteomskoj analizi tkiva. Preuzeto i prevedeno iz: Altelaar AFM, Munoz J, Heck AJR. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet.* 2013;14(1):35-48. doi:10.1038/nrg3356 (109).

1.10.3. Biljezi

Prema definiciji National Institutes of Health iz 1998. biljezi su karakteristike koje su objektivno mjerene i evaluirane kao indikatori normalnog ili patološkog biološkog procesa, ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju. Slična je i definicija Svjetske zdravstvene organizacije koja biljeg definira kao bilo koju tvar, strukturu ili proces, ili njihove produkte, koji mogu biti mjereni u organizmu i koji utječu na, ili predviđaju, ishod bolesti.

Biljezi se mogu upotrijebiti kao dijagnostički alat za identifikaciju pacijenata s bolešću, za stupnjevanje (engl. staging) ili klasifikaciju bolesti, kao indikator progresije bolesti ili za predviđanje ili nadgledanje kliničkog odgovora na terapijski postupak. Također, biljezi se mogu upotrijebiti i kao surogatni krajnji događaj (engl. surrogate endpoint), kao neposredni pokazatelj kliničkog krajnjeg događaja (engl. clinical endpoint). Biljeg u svojstvu surogatnog krajnjeg događaja može predvidjeti klinički učinak terapije ovisno o epidemiološkim, terapijskim, patofiziološkim ili drugim znanstvenim dokazima (110).

Dakle, biljezi su molekule koje su pokazatelji fiziološkog stanja i promjene tog stanja tijekom patološkog procesa. Njihova vrijednost počiva na sposobnosti da rano identificiraju i dijagnosticiraju bolest, prate progresiju bolesti te da se mogu kvantificirati unutar populacije (111). Ugrubo se mogu stratificirati u biljege rizika, dijagnostičke biljege i prognostičke biljege (112).

Iako biljezi mogu biti i DNA i RNA, proteini ipak imaju neke karakteristike koje ih čine potencijalno istraživački najzanimljivijima – podložni su ekonomski isplativim, standardiziranim procedurama koje daju visoku propusnost i pružaju informacije o biološkoj funkciji (113).

1.10.3.1. Biljezi kod karcinoma štitnjače

Trenutačno u svakodnevnoj kliničkoj upotrebi postoji manji broj biljega u dijagnostici i liječenju karcinoma štitnjače.

Kako je već navedeno, kod papilarnih karcinoma štitnjače tireoglobulin je u postterapijskom razdoblju važan biljeg kontrole bolesti i recidiva. Poslije liječenja karcinoma štitnjače očekuju se niske razine tireoglobulina u serumu zbog ili kirurškog odstranjenja tkiva štitnjače ili radionuklidnog uništavanja tkiva štitnjače i metastaza. Povišene vrijednosti tireoglobulina nakon terapije upućuju na recidivirajuću ili rezidualnu bolest.

U preoperativnoj obradi citološki dokazanih folikularnih neoplazmi, tireoidni stimulirajući hormon (TSH) upotrebljava se kao biljeg o kojem ovisi daljnja obrada i liječenje. U slučaju folikularne neoplazme uz visoke vrijednosti TSH preporučuje se kirurško liječenje, a u slučaju niskih vrijednosti radi se daljnja obrada zbog sumnje da nije riječ o malignitetu nego o hiperfunkcionalnom čvoru.

Kod medularnih karcinoma sličnu ulogu kao tireoglobulin kod papilarnih karcinoma imaju kalcitonin i karcinoembrijski antigen (CEA). Kalcitonin se postterapijski upotrebljava kao biljeg rezidualne ili recidivirajuće bolesti, a CEA kao biljeg koji pokazuje dobru korelaciju s preživljenjem.

1.10.3.2 Dosadašnja proteomska istraživanja tumora štitnjače

Zbog malenog broja do sada klinički upotrebljivih biljega, dijagnostičkih nedoumica te relativno visoke incidencije tumora štitnjače postoje brojna proteomska istraživanja koja su pokušala identificirati potencijalne biljege.

Većina dosadašnjih proteomskih istraživanja papilarnih karcinoma štitnjače i karcinoma štitnjače općenito bavila se razlikovanjem između dobro diferenciranih karcinoma štitnjače i benignog, odnosno zdravog tkiva štitnjače. Prema tim istraživanjima postoji veliki broj proteina čija se koncentracija razlikuje između benignog i malignog tkiva s potencijalom uloge biljega.

S100A6 često se navodi kao potencijalni biljeg razlikovanja papilarnog karcinoma od drugih tvorbi štitnjače ili zdravog tkiva štitnjače. U više radova utvrđena je povećana ekspresija u papilarnim karcinomima u odnosu na zdravo tkivo (114, 115). U studiji Brown LM i sur., po provedenom proteomskom istraživanju, imunohistokemijski je utvrđena 85-postotna osjetljivost i 69-postotna specifičnost koristeći S100A6 u razlikovanju između normalnog tkiva štitnjače i papilarnog karcinoma štitnjače (114). Uspoređujući proteomski profil papilarnih karcinoma, folikularnih karcinoma i adenoma pronađena je pojačana ekspresija proteina S100A6 u papilarnom karcinomu u odnosu na folikularne tumore, što su autori te studije, Sofiadis A i sur., naveli kao mogući marker razlikovanja papilarnih karcinoma od folikularnih tumora (116). I drugi proteini ove skupine, S100A11 i S100A13, spominju se kao mogući biljezi razlikovanja papilarnih karcinoma od benignog tkiva, a S100A4, S100A6 i S100A10 spominju se kao mogući biljezi agresivnijeg ponašanja karcinoma i metastaziranja (117, 118, 119, 120, 121).

Galektin-3 je kao mogući biljeg razlikovanja malignog od benignog tkiva štitnjače identificiran u više radova, sa specifičnošću od 92,3% i osjetljivosti od 81,9% (122, 123, 124, 125, 126). Galektin-3 spada u skupinu vezujućih proteina b-galaktozil koji sudjeluju u regulaciji interakcija između stanice i matriksa, te se sumnja da također sudjeluju u inicijaciji i regulaciji maligne transformacije (127).

Citokeratin-19 je također u više radova identificiran kao mogući biljeg razlikovanja (114, 115).

U istraživanju autora Pagni F i sur., imunohistokemijska analiza je s osjetljivošću od 92,7%, a specifičnošću od 89,2% razlikovala normalno tkivo štitnjače i papilarni karcinom (125).

Aneksin A1 se također spominje u više studija kao potencijalni biljeg (115, 128, 129). Aneksin A1 je prema studiji autora Ciregia F i sur. predložen kao biljeg papilarnog karcinoma s obzirom na 87% osjetljivosti i 94% specifičnosti u razlikovanju papilarnog karcinoma u odnosu na drugo tkivo (129). Također, i drugi proteini iz iste skupine, aneksini, pojavljuju se kao mogući biljezi u raznim studijama, i to aneksin A2 (130), aneksin A3 (131) i aneksin IV(132).

Proteomska analiza seruma pacijenata s papilarnim karcinomom štitnjače i zdravih ispitanika je u radu kineskih autora Fan Y i sur. iz 2009. identificirala tri potencijalna biljega s osjetljivošću od 95,15% i specifičnošću od 93,97% – lanac haptoglobin alfa-1 bio je povećane, a apolipoprotein C-I i apolipoprotein C-III smanjene koncentracije. Također,

analiza je pokazala da koncentracija lanca haptoglobin alfa-1 raste sa stadijem bolesti, a suprotno vrijedi za apolipoproteine C-I i C-III (133).

Proteomska analiza sekretoma kulture stanica papilarnog karcinoma identificirala je šest proteina koje su autori predstavili kao moguće biljege – PTMA, biotinidazu, nukleolin, enolazu-1, CYR61 i klasterin (134). Daljnja istraživanja biotinidaze su imunohistokemijski potvrdila smanjenu ekspresiju tog proteina kod papilarnog karcinoma štitnjače te je identificirala kao mogući biljeg agresivnijeg ponašanja (115, 135)

Postoje brojna istraživanja i još brojniji proteini koji su zahvaljujući povišenoj ekspresiji u papilarnim karcinomima predloženi kao mogući biljezi razlikovanja papilarnih karcinoma u odnosu na druge tvorbe ili zdravo tkivo: prohibitin (136), ATP-sintaza D lanac (136), moezin (114, 129), HSP70 (BiP) (114, 137), peroxiredoxin 2 (114), protein fosfataza 2 (114), selen vezujući protein 1 (114), vitamin D vezujući protein (114), c-erbB-2 (132), Stat5a (132), transtiretin prekursor (TTR) (128), feritin laki lanac (FLC) (128, 129), podjedinica aktivatora proteosomskog kompleksa 1 i 2 (128), alfa-1-antitripsin prekursor (128), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) (128), laktat dehidrogenazni lanac B (LDH-B) (128), apolipoprotein A1 prekursor (Apo-A1) (128), DJ-1 protein (128), koflin-1 (128, 130), laktat dehidrogenaza B lanac (129), feritin teški lanac (129), galektin-3 (115), ICAM1 (115), UDP-glukoza 4-epimeraza (115), fibronektin (115, 137), stanična retinoična kiselina - vezujući protein (115), Arp2/3 kompleks (115, 138), aktin (115, 137), timozin b4 (115), timozin b10 (115), IQGAP1 (138), triozafosfat izomeraza (130), katepsin D (130), kopin 1 (130), PNCA (130), prelamin A/C (LMNA) (137), adenilat ciklaza izoenzim 1 (KAD1) (137), PDLIM4 (139) i PDLIM5 (139).

Talijanski istraživači Pagni F i sur. su, retrospektivno, koristeći se tehnikom MALDI-imaging identificirali razlike u proteomskom profilu benignih tvorbi i papilarnih karcinoma, te su prospektivno, upotrebljavajući te razlike, uspješno razlikovali karcinome od benignih tvorbi u 10 slučajeva, što potvrđuje da ova metoda analize može imati i praktičnu, kliničku primjenu (140).

Postoji relativno mali broj proteomskih istraživanja koja su se bavila analizom papilarnih karcinoma koji su metastazirali, bilo da se analiziralo samo tkivo karcinoma ili metastaze.

Alfa aktinin 1, alfa-1-antitripsin, hepatomski čimbenik rasta (HDGF), protein skupine visoke mobilnosti (HMGI-C) i karbonska anhidraza 4 evidentirani su kao mogući čimbenici i biljezi invazivnosti i metastaziranja papilarnog karcinoma u studiji koja je uspoređivala normalno

tkivo štitnjače, benigne tvorbe štitnjače te papilarne karcinome s metastazama i bez njih (141).

U studiji autora Lin P i sur. koja je uspoređivala proteomski profil aspirata papilarnih mikrokarcinoma s centralnim metastazama i bez njih, utvrđena je povećana ekspresija 24 proteina, a smanjena 89 proteina kod metastatskih karcinoma. Statistički najznačajnija povećana ekspresija dobivena je analizirajući protein ISG15 koji se nalazi u bitno većoj količini u metastatskih karcinoma. Ostali potencijalni biljezi su matriks metaloproteinaza 9, kemokinski ligand 18, TGFb i latentni TGFb povezujući protein 3 (LTBP3) (142).

Istraživanjem autora Zhan S i sur. koje je analiziralo papilarne karcinome s različitim stupnjem metastaziranja (N0, N1a, N1b) u pacijenata starijih od 45 godina, utvrđena je povećana ekspresija proteina FAS, S100A4, LAMB3, ATP5A1, LAMC2 i MYOG1 u papilarnim karcinomima kod pacijenata s metastazama na vratu. Također, povećana ekspresija MYOG1 i LAMC2 mRNA pokazala je povezanost s veličinom tumora, višim stupnjevanjem bolesti, mutacijom BRAFV600E i lošijom prognozom (143).

Također, prema radu Villanueva J i sur. 12 peptida koji su identificirani u serumu su sa 95-postotnom specifičnošću i osjetljivošću mogli diferencirati zdrave pacijente od onih s metastazama karcinoma štitnjače (144). Potencijalno bi ova metoda mogla diferencirati pacijente s recidivirajućom bolešću i one pacijente koji u trenutku liječenja imaju klinički neprimjetnu regionalno proširenu bolest.

Zanimljivo, vezano uz metastaze, uspoređujući proteomski profil papilarnih karcinoma i njihovih metastaza, Gawin M i sur. pokazali su veću sličnost između zdravog tkiva i papilarnog karcinoma te papilarnih karcinoma između različitih pacijenata nego između papilarnih karcinoma i metastaza kod istih pacijenata (145).

Jedno od važnih kliničkih pitanja kod udaljenih metastaza papilarnog karcinoma jest razlikovanje metastaza koje mogu biti liječene radionuklidnom I-131 terapijom od onih koje ne mogu. Uspoređujući serumski proteomski profil pacijenata s papilarnim karcinomom štitnjače s udaljenim metastazama, onima koje su osjetljive i onima koje nisu na I-131, kineski autori Song HJ i sur. otkrili su smanjenu ekspresiju afamina u pacijenata s metastazama neosjetljivim na I-131 (146).

2. HIPOTEZA

Razlike u proteomskom profilu dobro diferenciranih papilarnih karcinoma štitnjače s regionalnim metastazama i bez njih u limfnim čvorovima vrata povezane su s regionalnom metastatskom bolešću.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Izrada proteomskog profila dobro diferenciranog papilarnog mikrokarcinoma štitnjače s regionalnim metastazama i bez njih u limfnim čvorovima vrata.

3.2. Specifični ciljevi

- 1.) usporediti razlike u izraženosti proteina u proteomskom profilu dobro diferenciranih papilarnih mikrokarcinoma štitnjače bez regionalnih metastaza i dobro diferenciranih papilarnih mikrokarcinoma štitnjače s regionalnim metastazama koristeći se dostupnim bazama podataka ljudskog proteoma te metodama bioinformatičke analize i funkcionalnog obogaćivanja
- 2.) utvrditi moguću patofiziološku ulogu izraženih proteina u nastanku regionalne metastatske bolesti.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U ovo je istraživanje ukupno bilo uključeno 30 ispitanika s patohistološki potvrđenim papilarnim mikrokarcinomom štitnjače koji su operirani (totalna tireoidektomija s disekcijom vrata ili bez nje) u Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u razdoblju od 2007. do 2018. godine. Petnaest ispitanika u trenutku operacija, a i u kasnijem kliničkom praćenju, nije imalo regionalno proširenu bolest (metastaze), a 15 drugih ispitanika imalo je preoperativno potvrđenu regionalnu metastatsku bolest u lateralnim regijama vrata (regije II – V) u trenutku operacije.

Svi pacijenti potpisali su informirani pristanak. Istraživači su poštovali Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske te Zakon o pravima bolesnika Republike Hrvatske, u svrhu zaštite prava bolesnika, tajnosti osobnih podataka te pravilnog provođenja istraživanja.

Istraživanja vezana uz Laboratorij za mineralizirana tkiva Odjela za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta bila su izvedena uz poštovanje temeljnih etičkih i bioetičkih načela, osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost, u skladu s Nürnberškim kodeksom i Helsinškom deklaracijom. Uzorci tkiva prikupljeni su u skladu s etičkim i bioetičkim načelima, uz očuvanje privatnosti i zaštite podataka ispitanika uključenih u istraživanje. Ovo je istraživanje odobrilo Etičko povjerenstvo KBC „Sestre milosrdnice“, rješenje broj EP-17295/18-1, i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 6. Karakteristike metastaziranja i disekcija u skupini pacijenata s metastazama

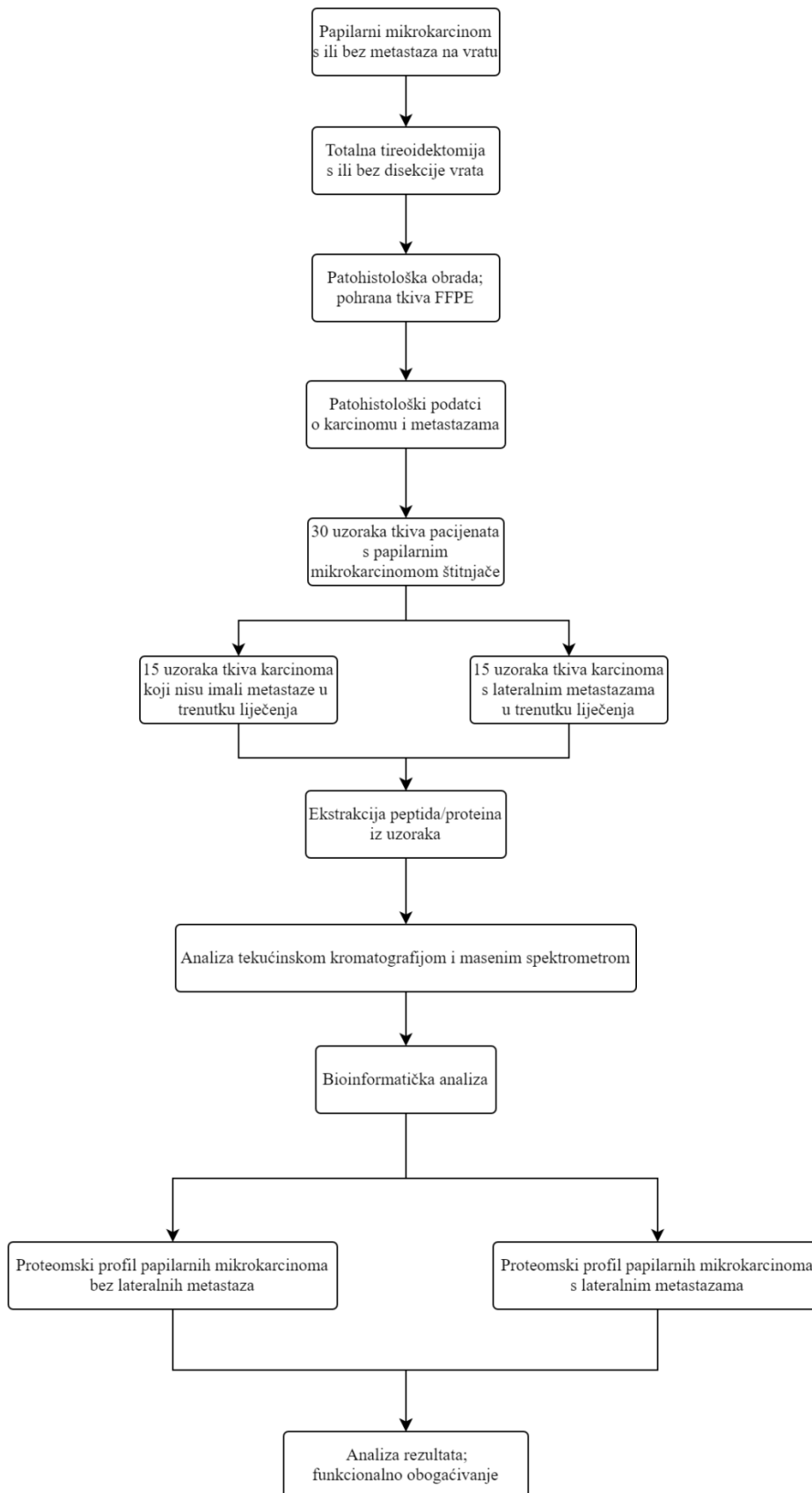
Redni broj	Disekcija regije VI (0/1)	Broj metastatskih čvorova/ukupan broj čvorova u disektatu (N+/N)	Ekstranodalna ekstenzija (ENE+)	Najveći promjer metastaze (r)	Ipsilateralna lateralna disekcija	N+/N	ENE+	r	Kontralateralna lateralna disekcija vrata	N+/N	ENE+	r	„Skip“ metastaza
1.	1	0/0	0	/	1	2/15	0	1.5	0	/	/	/	1
2.	1	5/5	1	1.5	1	6/21	0	2.3	1	1/13	1	2.5	0
3.	1	2/2	0	NP	1	6/11	1	3	0	/	/	/	0
4.	1	7/12	0	1.3	1	11/17	0	2.5	0	/	/	/	0
5.	1	0/0	0	/	1	1/16	0	4	0	/	/	/	1
6.	1	2/9	0	0.8	1	3/25	0	2	0	/	/	/	0
7.	1	5/5	0	0.7	1	7/11	0	2	0	/	/	/	0
8.	1	1/1	0	0.5	1	1/4	0	0.4	0	/	/	/	0
9.	1	0/0	0	/	1	3/10	0	2	0	/	/	/	1
10.	1	0/0	0	/	1	6/10	0	2.5	0	/	/	/	1
11.	1	4/5	0	0.4	1	2/34	1	5	0	/	/	/	0
12.	1	9/9	0	0.5	1	3/13	1	3.5	0	/	/	/	0
13.	1	2/11	0	1	1	3/5	0	4	0	/	/	/	0
14.	1	2/2	1	1.3	1	2/5	1	1.8	0	/	/	/	0
15.	1	7/18	0	1	1	5/11	0	1.2	0	/	/	/	0

4.2. Opis istraživanja

Ovo je istraživanje opažajno, nerandomizirano, retrospektivno i kohortno. Istraživanje se sastoji od kliničkog i laboratorijskog dijela. S obzirom na interdisciplinarnost istraživanja, istraživanje se provelo na Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“, Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ i Odjelu za proteomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Za laboratorijski dio istraživanja upotrijebljeni su uzorci papilarnih mikrokarcinoma štitnjače koji su obrađeni standardnom tehnikom fiksiranja u 10-postotnom formalinu i uklopljeni u parafinske blokove i koji su bili pohranjeni u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“. Na svim uzorcima je u Kliničkom zavodu provedena standardna patohistološka analiza tkiva kojom su određene patohistološke karakteristike tumora – tip tumora, veličina tumora, ekstratireoidna ekstenzija, intraglandularna diseminacija, kalcifikacija, limfangioinvazija te, ovisno o operaciji, broj limfnih čvorova i broj metastaza u disektatima. Kod metastatskih limfnih čvorova također su se opisivali veličina metastaza i postojanje ekstranodalne ekstenzije.

U skupini pacijenata bez metastaza ni jedan od tumora nije, prema patohistološkoj analizi, pokazao znakove kalcifikacije, ekstratireoidne ekstenzije, intraglandularne diseminacije ili limfangioinvazije.



Slika 5. STROBE (engl. Strength of reporting in observational studies) dijagram studije

Tablica 7. Podatci o tumorima u skupini papilarnih mikrokarcinoma bez metastaza dobiveni patohistološkom analizom tkiva

Skupina pacijenata bez metastaza								
Redni broj	Spol	Dob (godine)	T stadij	Veličina tumora (cm)	Intraglandularna diseminacija	Kalcifikacija	Limfangioinvazija	Ekstraglandularna ekstenzija
1.	Ž	67	1a	0,4	0	0	0	0
2.	Ž	38	1a	0,9	0	0	0	0
3.	Ž	31	1a	1	0	0	0	0
4.	Ž	53	1a	1	0	0	0	0
5.	Ž	49	1a	0,7	0	0	0	0
6.	Ž	58	1a	0,8	0	0	0	0
7.	M	29	1a	1	0	0	0	0
8.	Ž	42	1a	0,9	0	0	0	0
9.	M	63	1a	0,7	0	0	0	0
10.	Ž	60	1a	0,7	0	0	0	0
11.	M	60	1a	1	0	0	0	0
12.	Ž	34	1a	0,7	0	0	0	0
13.	Ž	37	1a	0,7	0	0	0	0
14.	M	36	1a	1	0	0	0	0
15.	Ž	58	1a	0,9	0	0	0	0

Tablica 8. Podatci o tumorima u skupini papilarnih mikrokarcinoma s metastazama dobiveni patohistološkom analizom tkiva

Skupina pacijenata s metastazama								
Redni broj	Spol	Dob (godine)	T stadij	Veličina tumora (cm)	Intraglandularna diseminacija	Kalcifikacija	Limfangioinvazija	Ekstraglandularna ekstenzija
1.	M	32	1a	0.5	0	1	0	0
2.	Ž	23	1a	1	1	0	1	0
3.	Ž	32	1a	1	0	0	0	0
4.	Ž	26	1a	0.9	1	0	0	1
5.	M	41	1a	0.8	0	0	0	0
6.	Ž	37	1a	0.7	0	1	0	0
7.	Ž	38	3	0.6	1	0	0	3
8.	Ž	29	1a	0.8	0	0	0	0
9.	M	37	1a	0.8	1	0	0	2
10.	Ž	46	3	1	0	0	0	3
11.	M	56	1a	0.6	1	0	0	2
12.	M	45	3	0.6	0	0	0	3
13.	M	40	3	1.	1	0	0	4
14.	Ž	48	3	0.9	1	0	0	2
15.	Ž	36	1a	0.7	0	0	0	0

4.3. Proteomska analiza uzoraka

4.3.1. Priprema uzoraka

Po kirurškom odstranjenju štitne žlijezde na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, uzorci su na Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak” priređeni za patohistološku analizu standardnom patohistološkom metodom koja se sastoji od fiksacije u 10% puferiranom formalinu u trajanju od 24 sata. Nakon fiksacije, uzorci su uklopljeni u parafinske blokove te je dio uzoraka iskorišten za patohistološku analizu. Uzorci su mikrotomom rezani na debljinu od 3 do 5 mikrometara i potom bojeni hemalaun-eozinom. Standardna patohistološka tehnika bojenja hemalaun-eozinom, koja se temelji na plavo-ljubičastom bojenju kiselih dijelova stanice (hemalaun, odnosno hematoksilin) te na crvenom bojenju lužnatih dijelova (eozin), tijekom vremena pokazala se kao zlatni standard i u patohistološkoj obradi štitne žlijezde, omogućujući točnu diferencijaciju pojedinih komponenti tkiva, kako normalnih tako i patoloških. Patolog provodi analizu pod svjetlosnim mikroskopom gdje se vizualno analizira obojeno tkivo te se ovisno o prisutnosti određenih patohistoloških karakteristika (prema kriterijima World Health Organization) donosi dijagnoza papilarnog karcinoma.

Ostatak tkiva uklopljen u formalin pohranjen je u arhiv Kliničkog zavoda za patologiju na temperaturi od 15 °C.

Za potrebe ovog istraživanja, dio tumora je iz arhiviranih uzoraka izrezan i stavljen u zasebne epruvete Eppendorf koje su prenesene u laboratorij Odjela za proteomiku pri Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu radi nastavka istraživanja.

4.3.2. Deparafinizacija i izolacija proteina

Fiksacijom proteina u formalinu stvaraju se snažne kovalentne veze između proteina koje je potrebno raskinuti radi bolje ekstrakcije i njihove daljnje analize. Uzorci se stoga prvo usitnjavaju kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije proteina, odnosno radi povećavanja

površine uzorka koja reagira s otopinom za ekstrakciju. Usitnjavanje se provodi sterilnim skalpelom, a potom se uzorak homogenizira u tarioniku.

Ekstrakcija proteina izvodi se s pomoću komercijalno dostupnog seta za digestiju proteina FFPE-FASP Protein Digestion Kit (ab270543) proizvođača Abcam (Cambridge, UK) koji se temelji na radu Ostasiewicz P i sur (147).

Tijekom postupka ekstrakcije proteina potrebno je odrediti koncentraciju izoliranih proteina u pojedinim uzorcima radi ujednačavanja količine proteina u svakom uzorku u kasnijim analitičkim postupcima. Za određivanje koncentracije upotrijebljen je komercijalno dostupan set BioRad RC DC Protein Assay Kit II (5000122EDU) temeljen na modificiranom postupku Lowryja OH i sur (148). ApSORBANCija uzorka određena je na 750 nm čitačem SpectraMax i3x (Molecular Devices, San Jose, Kalifornija, SAD) Microplate.

4.3.2.1. Ekstrakcija proteina i određivanje njihove koncentracije

Ekstrakcija proteina započinje deparafinizacijom koja se sastoji od dodavanja 0,4 mL ksilena u epruvetu od 1,5 mL u kojoj se nalazi uzorak tkiva karcinoma štitnjače fiksiran formalinom i uklopljen u parafin. Uzorak se zatim inkubira uz lagano agitiranje na sobnoj temperaturi pet minuta te se ovaj postupak ponovi. Ksilena se ne miješa s vodom te ga je potrebno odstraniti prije provođenja daljnjih postupaka rehidracije uzorka, što se postiže dodavanjem 0,4 mL etanola uz naknadnu inkubaciju agitacijom u trajanju od pet minuta. Etanol se miješa sa ksilenom te se tako odstranjuje. Ovaj postupak se radi uspješnijeg odstranjivanja također ponavlja. Po završetku ovih postupaka, otapalo se u epruveti odstrani te se preparat osuši petominutnim centrifugiranjem u vakuumu uporabom Eppendorf koncentratora 5301. Uzorak, odnosno tkivo štitnjače, zatim se usitni sterilnim skalpelom i homogenizira s ukupno 1500 μ L UPX Universal Protein Extraction pufera u tarioniku. Homogenizirano tkivo se zatim inkubira u epruvetama od 1,5 mL uz agitaciju na 99 °C 45 minuta. Po hlađenju tkiva na sobnu temperaturu, pristupa se centrifugiranju uzorka na 15.000 g kroz deset minuta radi odstranjivanja nehomogeniziranog tkiva. Supernatant se zatim premješta u čistu epruvetu te se postupak centrifugiranja, odnosno odstranjivanja krupnijih, nehomogeniziranih čestica ponavlja.

4.3.2.1.1. Određivanje koncentracije proteina

Sljedeći korak je određivanje koncentracije proteina u lizatima. Za ovaj dio analize koristi se BioRad RC DC Protein Assay Kit II u kojem se nalaze reagensi pomoću kojih se uzorak priprema za određivanje koncentracije.

Postupak započinje dodavanjem 125 μ L RC Reagens A u 25 μ L uzorka uz naknadno vorteksiranje i inkubiranje u trajanju od jedne minute na sobnoj temperaturi. Slijedi dodavanje 125 μ L RC Reagens B u svaku epruvetu te vorteksiranje i centrifugiranje na 15.000 g 3 – 5 minuta. Po centrifugiranju, supernatant se odstranjuje te se uzorcima dodaje 127 μ L Reagens C' (smjesa DC Reagens D i DC Reagens E u omjeru 1:50). Ti se uzorci zatim vorteksiraju i inkubiraju na sobnoj temperaturi pet minuta. Sljedeći, završni korak prije mjerenja apsorbancije, odnosno koncentracije proteina, jest dodavanje 1 mL DC Reagens F u svaki uzorak uz naknadno vorteksiranje i inkubiranje na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Tim uzorcima izmjerena je apsorbancija na 750 nm uporabom SpectraMax i3x čitača pločica (Molecular Devices).

Također, usporedno su za izradu standardne krivulje za određivanje koncentracije uzoraka pripremljena razrjeđenja proteinskog standarda (BSA) od 0 do 1,5 mg/mL proteina.

Tablica 9. Podatci o koncentraciji proteina u uzorcima tkiva bez metastaza

Skupina pacijenata bez metastaza					
Redni broj	Spol	Dob (godine)	Veličina tumora (centimetri)	Masa uzorka (miligrami)	Koncentracija proteina u uzorku (miligrami/mililitru)
1.	Ž	67	0,4	33	2.382
2.	Ž	38	0,9	52	3.626
3.	Ž	31	1	44	4.35
4.	Ž	53	1	55	3.091
5.	Ž	49	0,7	36	4.192
6.	Ž	58	0,8	46	3.916
7.	M	29	1	61	5.191
8.	Ž	42	0,9	59	5.243
9.	M	63	0,7	55	5.046
10.	Ž	60	0,7	38	3.756
11.	M	60	1	58	4.866
12.	Ž	34	0,7	25	1.923
13.	Ž	37	0,7	32	3.128
14.	M	36	1	35	2.777
15.	Ž	58	0,9	55	6.49

Tablica 10. Podatci o koncentraciji proteina u uzorcima tkiva s metastazama

Skupina pacijenata s metastazama					
Redni broj	Spol	Dob (godine)	Veličina tumora (milimetri)	Masa uzorka (miligrami)	Koncentracija proteina u uzorku (miligrami/mililitru)
1.	M	32	0.5	38	2.897
2.	Ž	23	1	38	4.503
3.	Ž	32	1	23	3.72
4.	Ž	26	0.9	29	2.121
5.	M	41	0.8	42	4.65
6.	Ž	37	0.7	36	2.784
7.	Ž	38	0.6	55	3.659
8.	Ž	29	0.8	32	2.984
9.	M	37	0.8	38	3.624
10.	Ž	46	1	34	2.167
11.	M	56	0.6	27	4.073
12.	M	45	0.6	25	3.595
13.	M	40	1.	54	3.21
14.	Ž	48	0.9	53	3.821
15.	Ž	36	0.7	34	3.109

4.3.2.2. Digestija proteina tripsinom

Po određivanju koncentracije proteina, sljedeći proces je digestija proteina. Digestija se radi s pomoću proteaze tripsina, s ciljem razlaganja proteina na peptide prije analize u masenom spektrometru. Razlaganjem proteina na peptide olakšava se analiza u masenom spektrometru te se povećava mogućnost identifikacije i onih proteina čija bi analiza inače bila otežana zbog topivosti ili heterogenosti (149). Prije dodavanja tripsina, uzorku se dodaje ureja radi denaturacije proteina, što pogoduje digestiji, a zatim i jodoacetamid radi sprječavanja renaturacije.

Prvi koraci procesa digestije sastoje se od dodavanja 8M ureje u 50 μ L pročišćenog proteinskog lizata u 10 kDa MWCO (engl. *Molecular weight cut-off*) Spin filtre. Ukupno se u prva dva koraka procesa dodaje 400 μ L ureje, 200 po 200 μ L, uz centrifugiranje na 14.000 g, prvo 30 minuta, zatim 20 minuta. Zatim se odstranjuju netopivi talozi te se dodaje 90 μ L 8 M ureje i 10 μ L 10X jodoacetamida uz vorteksiranje, uzorci se inkubiraju u tami u trajanju od 20 minuta te centrifugiraju na 14.000 g 10 minuta. Zatim se u dva navrata dodaje po 100 μ L 8 M ureje uz centrifugiranje na 14.000 g 15 minuta, te 100 μ L 50 mM amonijeva bikarbonata uz također centrifugiranje na 14.000 g 10 minuta.

U sljedećem koraku dodaje se 75 μ L 50 mM amonijeva bikarbonata s tripsinom (omjer enzima i proteina 1:50), uz naknadno vorteksiranje. Epruvete se zatim zaštićuju parafilmom radi minimiziranja evaporizacije. Tako zaštićene epruvete inkubiraju se na 37 °C preko noći nakon čega se uzorci premještaju u novu 10 kDa MWCO Spin filter epruvetu i centrifugiraju na 14.000 g 10 minuta. Nakon toga im se dodaje 50 μ L 50 mM amonijeva bikarbonata, a zatim i 50 μ L 0,5 M natrijeva klorida, uz centrifugiranje na 14.000 g u trajanju od 10 minuta nakon svakog dodavanja pojedine otopine. U konačnici dobivano filtrat koji sadržava ekstrahirane proteine, koji se acidificiraju i desaliniziraju s 30 μ L 20-postotne octene kiseline.

4.3.2.3. Pročišćavanje i koncentriranje proteina

Pročišćavanje dobivenog uzorka potrebno je zbog prisutnosti zaostalih soli amonijeva bikarbonata i natrijeva klorida koje ometaju ionizaciju u spektrometru masa. Koncentriranje proteina potrebno je radi učinkovitije obrade i nanošenja na tekućinski kromatograf. Proces pročišćavanja i koncentriranja provodi se Stage (Stop and Go Extraction) tipsevima prema protokolu Rappsilber J i sur. (150). Materijal koji se upotrebljava uglavljen u nastavak pipete od 200 μ L (tips) jest C18, poslagan u četiri sloja. Postupak se sastoji od dodavanja, ovisno o koraku, metanola ili octene kiseline i centrifugiranja uz kasnije eluiranje peptida koje je učinjeno ispiranjem Stage tipsa otopinom koja se sastoji od acetonitrila i octene kiseline u omjeru 80:20. Zaostali acetonitril uparen je centrifugiranjem u vakuum-centrifugi 10 minuta na 200 g pri 30 °C.

Konačna koncentracija pročišćenih peptida utvrđena je s pomoću uređaja NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) mjerenjem apsorbancije na 280 nm.

4.3.3 Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa

Pročišćeni peptidi su na temelju polarnosti razdvojeni i analizirani s pomoću High Performance Liquid Chromatography sustava Thermo Scientific UltiMate 3000 nano HPLC spojenog s LTQ-Orbitrap Discovery spektrometrom masa (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) kroz nano-elektrosprej LC-MS sučelje. Peptidi su razdvojeni upotrebom nano Acclaim PepMap RSLC (engl. *Rapid Separation Liquid Chromatography*) 75 μ m x 150 mm C18 kolone (Thermo Scientific). Peptidi su u otapalu 0,1% mravlje kiseline u vodi nanoseni na nanokolonu i razrijeđeni kroz 120-minutni linearni gradijent od 10- do 60-postotnog otapala, koje se sastoji od acetonitrila i 0,1% mravlje kiseline u omjeru 80:20, s protokom od 300 nL/min.

Automatizirani ciklusi mjerenja spektrometra masa sastojali su se od punog skeniranja MS i skeniranja MS/MS do dvadeset najintenzivnijih iona, koristeći se dinamičkim isključenjem kako bi se izbjeglo prekomjerno fragmentiranje (analiza) peptida najveće koncentracije.

Puni skenovi MS (m/z od 300 do 2000) dobiveni su u analizatoru Orbitrap (ThermoFisher Scientific) na rezoluciji od 100.000 s unutrašnjom kalibracijom pomoću tzv. „lock“ mase.

4.3.4. Bioinformatička analiza

Dobivene spektre fragmentiranih peptida potrebno je bioinformatički analizirati. Peptidi su identificirani i kvantificirani s pomoću računalnog programa MaxQuant 1.6.0.16. (Max Planck Institute of Biochemistry). *In silico* digestija provedena je uz tripsin. Zbog nepotpune karbometilacije cisteina, acetilacije N- kraja proteina i degradacije metionina, prilikom sparivanja mase pojedinog peptida s *in silico* podacima učinjena je provjera svih prije navedenih mogućnosti za svaki pojedini parametar, tako da se mogu detektirati sve moguće permutacije. Maksimalna dopuštena pogreška postavljena je na 0,01, a duljina peptida od 7 aminokiselina postavljena je kao minimalna za identifikaciju proteina.

S pomoću omjera zbroja eksperimentalno utvrđenih intenziteta svih peptida i intenziteta pojedinog detektiranog peptida, iBAQ (engl. Intensity Based Absolute Quantification), učinjena je kvantifikacija proteina.

Proteini su identificirani *in silico* koristeći dostupne baze podataka kompletnog proteoma čovjeka u bazi UniProt (Release 2020 05, Proteome ID: UP000005640). Pretraživač iz paketa modula Andromeda MaxQuant (Max Planck Institute of Biochemistry) upotrijebljen je za probabilističko bodovanje peptida i usporedbu i identifikaciju s poznatim proteinima čovjeka.

5. REZULTATI

Analizom 30 uzoraka tumorskog tkiva papilarnog karcinoma štitnjače koji su podijeljeni u dvije jednake skupine, ovisno o prisutnosti metastaza u lateralnim regijama vrata u trenutku operativnog liječenja (karakteristike pacijenata u Tablici 6.), izolirano je ukupno 99 različitih proteina. Četrdeset i četiri proteina bila su prisutna isključivo u skupini pacijenata bez metastaza, 45 isključivo u skupini pacijenata s metastazama, a 10 različitih proteina bilo je prisutno u obje skupine (Tablica 12.). Proteini se u uzorcima pojavljuju u različitim izoformama, tako da je izolirano ukupno 496 izoformi, 313 u skupini bez metastaza te 183 u skupinama s metastazama. (Slika 7.)

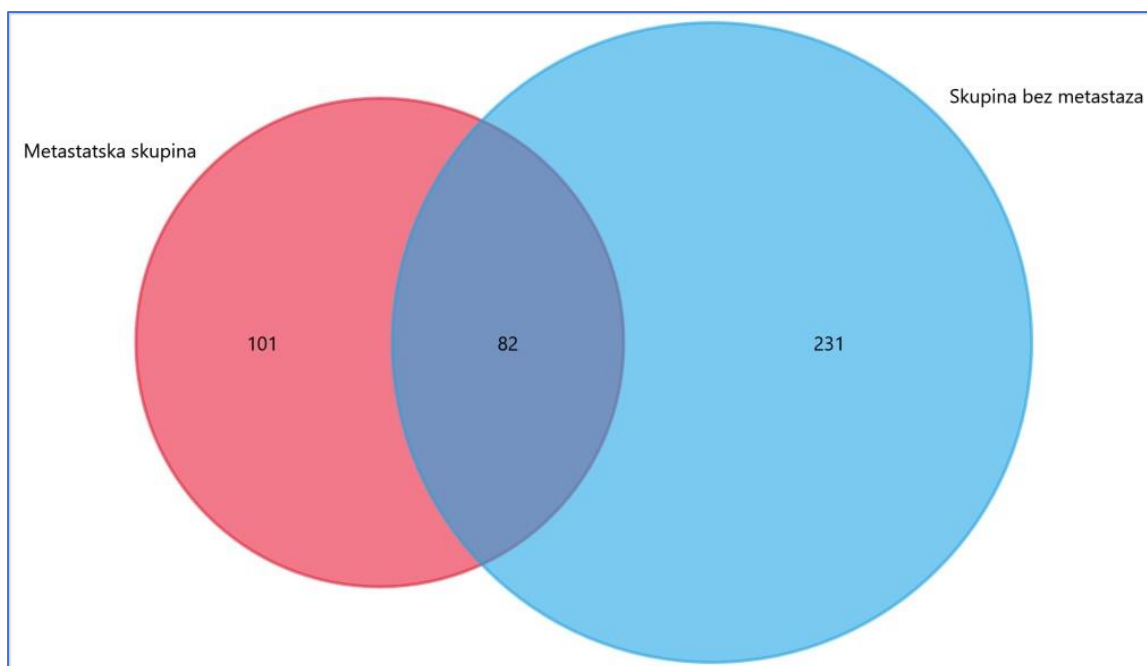
Tablica 11. Sumarni prikaz karakteristika ispitanika, njihovih tumora i uzoraka po skupinama

		Skupina bez metastaza	Skupina s metastazama
Broj ispitanika	Sveukupno		
	<i>N</i>	15	15
	Muških		
<i>N (%)</i>	4 (26,6%)	6 (40%)	
Ženskih			
<i>N (%)</i>	11 (73,3%)	9 (60%)	
Dob u godinama			
<i>prosječna vrijednost (±SD)</i>		47,7 (±12,9)	37,7 (±8,77)
Veličina tumora (mm)			
medijan (Q1 – Q3)		0,9 (0,7 – 1)	0,8 (0,65 – 0,95)
Masa uzorka u (mg)			
<i>prosječna vrijednost (±SD)</i>		45,6 (±11,7)	37,2 (±10,2)
Koncentracija proteina po uzorku (mg/mL)			
<i>prosječna vrijednost (±SD)</i>		4,0 (±1,24)	3,39 (±0,74)
Sveukupan broj izoliranih proteina s izoformama		53	55
<i>N</i>		(313)	(183)

Tablica 12. Nazivi zajedničkih i različitih izoliranih proteina ovisno o skupini

Zajednički proteini izolirani u obje skupine		Protein ID	
Aktin		P68133	
Eukariotski inicijacijski faktor 4A-III		P38919	
Hemoglobin podjedinica beta		P69905	
Histon H2A		Q99878	
Histon H2B		U3KQK0	
Histon H3		K7EK07	
Histon H4		P62805	
Keratin, tip II citoskeletni 8		P05787	
Tireoglobulin		P01266	
Vimentin		P08670	
Razlikovni izolirani proteini po skupinama			
Skupina bez metastaza	Protein ID	Skupina s metastazama	Protein ID
40S ribosomski protein S11	P62280	40S ribosomski protein S18	P62269
40S ribosomski protein S7	P62081	5'-AMP-aktivirana protein kinaza podjedinica gama-2	F8WAY3
Adenine fosforiboziltransferaza	P30101	Beta-alanin-aktivirajući enzim	
Alfa aminoadipična semialdehidna sintetaza, mitohondrijska	Q9UGM6	Alfa-1-antitripsin	P01009
Aneksin A2	P07355	Ankirin ponavljajući domena-sadržavajući protein 18A	Q8IVF6
Centrobin	Q8N137	Ankirin ponavljajući domena-sadržavajući protein 34B	A5PLL1
Centrosomski protein 126 kDa	Q9P2H0	ATP sintaza podjedinica O, mitohondrijska	H7C086
Kalcifozin	K7ES72	ATP-vezujuća kazeta podobitelj B član 5	Q2M3G0
Katepsin B	P07858	cGMP-specifična 3,5-ciklička fosfodiesteraza	O76074
Kolagen alfa-2(IV) lanac	P08572	Citrat sintaza	O75390
Deksametazon-induciran Ras-povezani protein 1	Q9Y272	Kolin transporter-slični protein 2	K7ESF5
Dihidropirimidinaza-povezani protein 5	Q9BPU6	Kolagen alfa-2(I) lanac	P08123
DNA helikaza B	Q8NG08	DNA-usmjerena RNA polimeraza III podjedinica RPC1	O14802
Ferritin	P07741	DnaJ homolog podobitelj C član 13	O75165
Glukoza-6-fosfat 1-dehidrogenaza	P11413	Dinein teški lanac 3, aksonemski	Q8TD57
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	P04406	EZH iinhibitorski protein	Q86X51
Gvanin nukleotid-povezujući	P02794	FAD-ovisna oksidoreduktaza domena-	Q96CU9

protein podjedinica beta-2-slična 1		sadržavajući protein 1	
Hemoglobin podjedinica alfa	P69905	Headcase protein homolog	Q9UBI9
Heterogeni jezgri ribonukleoproteini C1/C2	P07910	Histon-lizin N-metiltransferaza 2C	Q8NEZ4
Histon H1	P16403	Interferon regulatorni faktor 1	P10914
Keratin, tip I citoskeletni 18	P05783	Interferon-povezani razvojni regulator 1	C9JNM6
Keratin, tip I citoskeletni 19	P08727	Kinezin-slični protein KIF21B	O75037
Keratin, tip II citoskeletni 7	P63244	Membrana-protežući 4-domenski podobiteljski A član 6E	H0YEW2
Kinezin-slični protein KIF26B	Q2KJY2	NACHT, LRR i PYD domena-sadržavajući protein 6	P59044
Mitohondrijski 2-oksoglutarat/malate prenašajući protein	Q02978	Negativni regulator asocijacije P-tijela	A0A0U1RRE5
Mitogen-aktivirana protein kinaza 19	Q56UN5	Paneksin-3	Q96QZ0
Multidrug resistance-associated protein 1	Q6ZUJ8	Vjerojatna C-manoziltransferaza DPY19L2	F5H0W1
Pekaneks-slični protein 4	Q63HM2	Vjerojatni RNA-vezujući protein 18	Q96H35
Peroksiredoksin-2	P32119	Protein FAM122C	Q6P4D5
Peroksiredoksin-1	Q06830	Protein HEATR9	A2RTY3
Fosfatidiletanolamin-vezujući protein 1	P30086	Protein shisa-7	A6NL88
Fosfoinozimid 3-kinaza adapter protein 1	Q9UDR5	Receptor ekspresijski-poboljšavajući protein 1	A0A1C7CYY3
POTE ankirin domena F	A5A3E0	Serin proteaza inhibitor Kazal-tip 5	Q9NQ38-3
POTE ankirin domena E	Q6S8J3	SH3 domena-sadržavajući protein 21	D6RD64
POTE ankirin domena I	P0CG38	Sindekan-2	P34741
Prelamin-A/C; Lamin-A/C	P33527	Sindekan-4	P31431-2
Protein AHNAK2	Q8IVF2	Sintaxin-8	Q9UNK0
Protein disulfide-izomeraza A3	P02545	T-stanični receptor alfa lanac V regija PY14	P01737
Protein S100; Protein S100-A6	P06703	Timus-specifična serin proteaza	Q9NQE7
Protimosin alfa	P06454	Transmembranski i TPR ponavljajući-sadržavajući protein 2	Q8N394
Supresor G2 alela SKP1 homologa	Q9Y2Z0	Transporter; Natrij i klor-ovisan taurinski transporter	P31641
Triosefosfat izomeraza	P60174	Tuftelin - interakcijski protein 11	Q9UBB9
Tropomiozin alfa-3 lanac	P06753	Ubikvitin - konjugirajući enzim E2 varijanta 1	Q13404
Triptofan-tRNA ligaza, mitohondrijska	Q9Y272	Vakuolarni protein-sortirajući-asocirani protein 25	Q9BRG1
		Nekarakterizirani protein	J3QS37

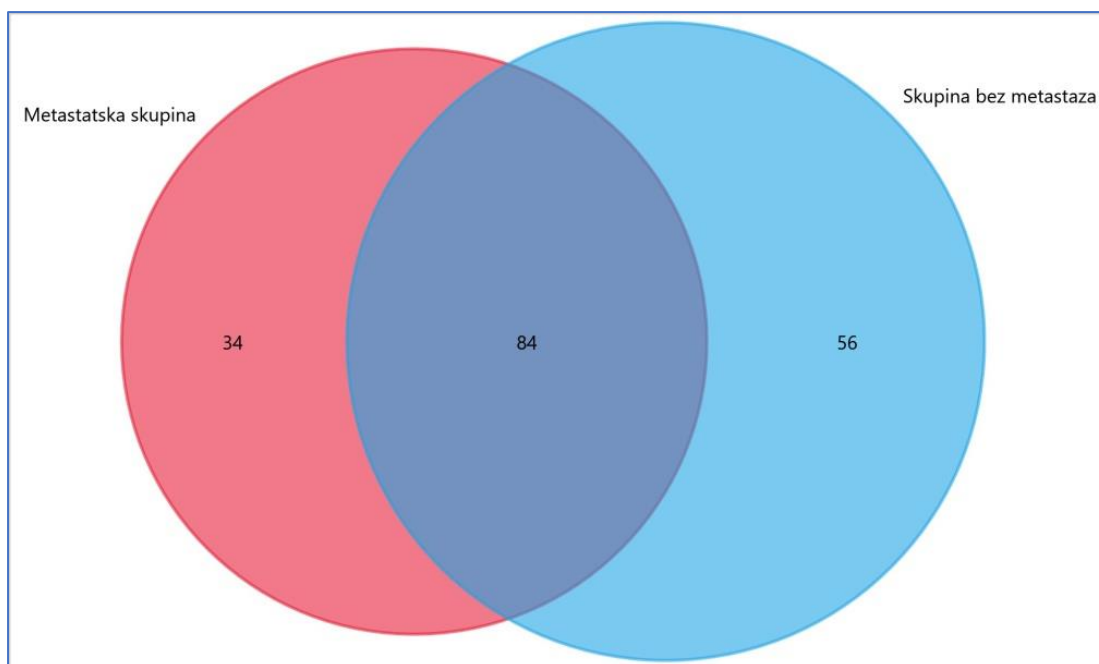


Slika 7. Vennov dijagram – broj zajedničkih i različitih izoformi proteina ovisno o skupinama

Od potencijalno klinički značajnih razlikovnih proteina u metastatskoj skupini izolirani su sindekan-2 i sindekan-4, ubikvitin konjugirajući enzim E2 varijanta 1, natrij i klor ovisan taurinski transporter, alfa-1 antitripsin, histon-lizin N-metiltransferaza C i citrat sintaza.

Analiza dobivenih podataka izvršena je s pomoću programa za funkcionalno obogaćivanje proteina Funrich. Analiza funkcionalnog obogaćivanja je metoda kojom se utvrđuju klase proteina ili gena koji su prekomjerno izraženi u analiziranim skupinama u usporedbi s bazom podataka gena i proteina i koji mogu biti povezani s fenotipom bolesti.

Od ukupno 313 izoformi u skupini bez metastaza, program je uspješno identificirao 248 izoformi koje je pridružio ekspresiji 140 različitih gena. U skupini s metastazama, program je identificirao 145 od 183 izoforme, koje je pridružio ekspresiji 118 gena. (Slika 8.)

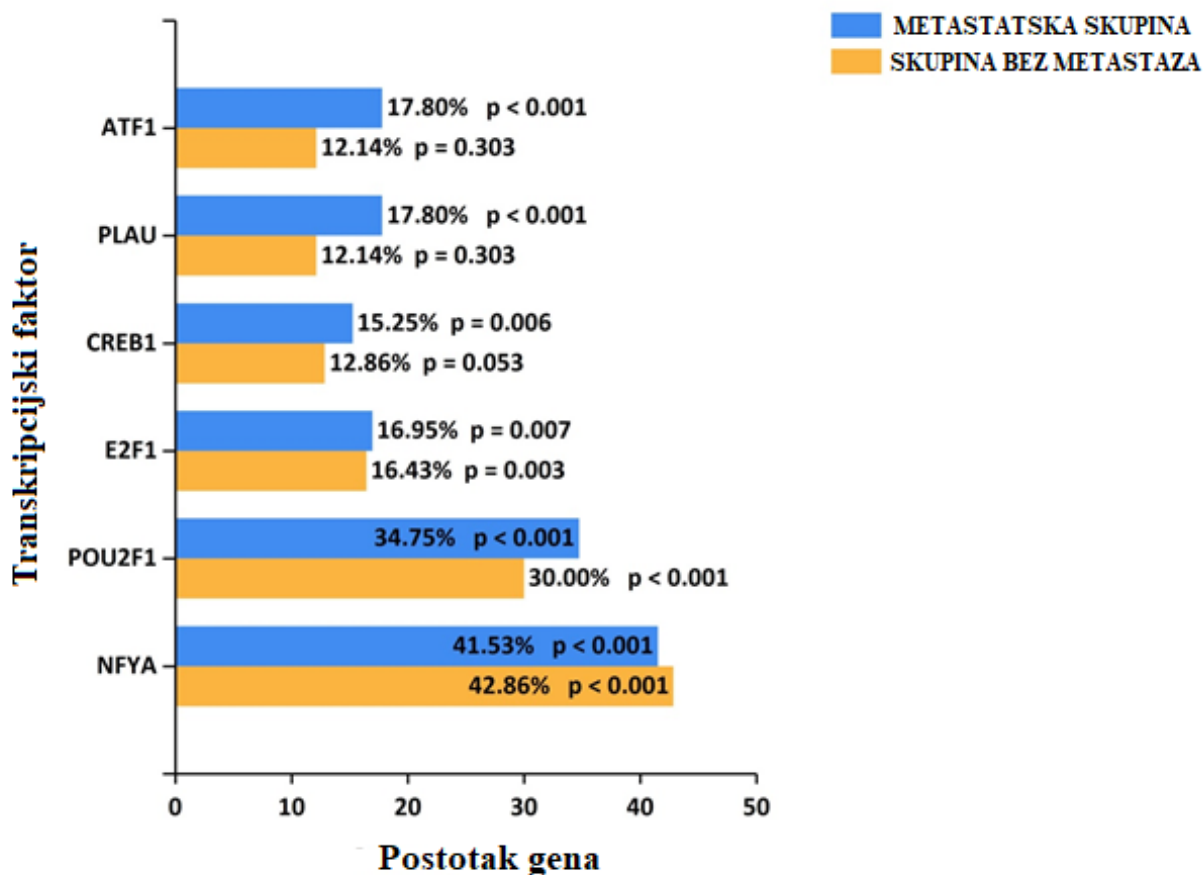


Slika 8. Vennov dijagram – Broj različitih i zajedničkih eksprimiranih gena ovisno o skupini

Analizirajući setove proteina u programu za funkcionalno obogaćivanje nije se dobila značajna razlika između metastatske skupine i skupine bez metastaza u izraženosti proteina ovisno o staničnim odjeljcima, biološkim procesima ili putovima, ili molekularnoj funkciji, no dobila se razlika uspoređujući proteine pridružene transkripcijskim faktorima.

Rezultati pokazuju da postoji povišena ekspresija transkripcijskih faktora CREB1, ATF1 i PLAU u metastatskoj skupini u odnosu na skupinu bez metastaza. Izraženost transkripcijskih faktora dobivena je analizom prisutnosti izoliranih proteina u određenoj skupini (Slika 9., Tablica 13.)

Transkripcijski faktori u skupini bez metastaza i u skupini s metastazama



Slika 9. Razlika izraženosti transkripcijskih faktora u metastatskoj i skupini bez metastaza. Postotci označavaju omjer broja proteina pridruženih određenom transkripcijskom faktoru i ukupnog broja promatranih proteina u skupini

Tablica 13. Nazivi pridruženih proteina ovisno o skupini koji su pridruženi transkripcijskim faktorima PLAU, ATF1 i CREB1

Transkripcijski faktori	Proteini iz skupine bez metastaza	Proteini iz skupine s metastazama
PLAU		
	Centrobin	Citrate sintetaza (CS)
		Headcase protein homolog (HECA)
		Beta-alanin-aktivirajući enzim (AASDH)
	Sindekan-2 (SDC2)	
		DNA-usmjerena RNA polimeraza III, podjedinica RPC1 (POLR3A)
CREB1	Pekaneks-sličan protein 4 (PCNXL4)	Beta-alanin-aktivirajući enzim
	40S ribosomski protein S11 (RPS11)	Vjerojatni RNA-vezujući protein 18 (RBM18)
	Centrobin	Headcase protein homolog
	Centrobin	Headcase protein homolog
		Citrate sintetaza
	Histon H4	Sindekan-2
	Histon H3	DNA-usmjerena RNA polimeraza III, podjedinica RPC1
ATF1		
	Histon H4	
	Histon H3	

Transkripcijski faktori ATF1 i PLAU sadržavaju centrobin u skupini bez metastaza kao razlikovni protein, a proteine AASDH, HECA, CS, SDC2 i POLR3A kao razlikovne u skupini s metastazama. Transkripcijski faktor CREB1 sadržava PCNXL4, RPS11 i centrobin kao razlikovne proteine u skupini bez metastaza, a AASDH, HECA i RBM18 u skupini s metastazama.

6. RASPRAVA

Papilarni karcinomi su karcinomi s najvećim porastom incidencije u svijetu, a gotovo 50% svih novootkrivenih karcinoma su papilarni mikrokarcinomi, tj. oni veličine manje ili jednake 1 cm u najvećem promjeru. Porast incidencije papilarnih karcinoma, ne samo kao incidentaloma nego i kao stvarnog porasta incidencije, pogotovo u mlađoj populaciji, značajan je epidemiološki problem. Prema trenutačnim smjernicama optimalan modalitet liječenja papilarnih karcinoma je kirurgija. No kirurgija sa sobom nosi opasnost od komplikacija i psihološkog opterećenja. Iako su stope komplikacija male, na velikom broju operiranih ljudi one ipak dobivaju na važnosti. S druge strane, zbog većinski indolentnog ponašanja dobro diferenciranih karcinoma štitnjače, pogotovo papilarnih karcinoma, postavlja se pitanje opravdanosti kirurškog liječenja, a također i eventualne profilaktičke disekcije vrata. Dosadašnja brojna istraživanja pokazala su značajan raspon biološke agresivnosti papilarnog karcinoma – od indolentnog tumora do agresivnog sklonog regionalnom recidivirajućem metastaziranju pa čak i udaljenom metastaziranju, no osim pojedinih patohistoloških podtipova koji su rijetki, ne postoji adekvatan način stratifikacije papilarnih karcinoma. Perioperativni, odnosno statički, prognostički čimbenici (dob, veličina tumora, ekstratireoidna ekstenzija, metastaze) nisu dovoljno dobri za ispravno stratificiranje agresivnosti ponašanja papilarnog karcinoma (151). Također, ni trenutačne citološke i patohistološke metode nisu dovoljno dobre da bi razlikovale karcinome različitog biološkog ponašanja te je jedina mogućnost razlikovanja indolentnih i agresivnijih papilarnih karcinoma klinička, radiološka ili citološka potvrda o prisutnosti metastaza ili kliničko ekspektativno praćenje i kirurgija *ad hoc*.

Također, pridonoseći već brojnim oprečnim strategijama i stajalištima o liječenju papilarnog karcinoma, u posljednje vrijeme pojavljuje se sve više dokaza koji kao jednako vrijedan način liječenja papilarnih mikrokarcinoma niskog stadija preporučuju aktivno praćenje.

Zbog svega navedenog javlja se važno kliničko i epidemiološko pitanje o preoperativnom razlikovanju indolentnih papilarnih karcinoma, koji zahtijevaju poštediti operativni zahvat ili čak samo kliničko i radiološko praćenje, od onih s većim malignim potencijalom, kod kojih bi agresivniji pristup u početnom stadiju liječenja smanjio daljnje širenje bolesti, opetovane proširene i agresivnije operativne zahvate i njihove komplikacije.

Jedno od mogućih rješenja ovog pitanja je pronalazak adekvatnog biljega koji bi s velikom specifičnošću i osjetljivošću razlikovao papilarne karcinome različitog biološkog ponašanja. Potencijalni biljeg bi po mogućnosti mogao identificirati karcinom kao takav u slučajevima citološke dubioznosti te identificirati agresivnije od indolentnijih varijanti, što bi bitno utjecalo na izbor optimalnog modaliteta liječenja i opseg kirurškog liječenja.

Proteomskom analizom tkiva štitnjače s metastazama i bez njih idealno bi se pronašao proteinski biljeg koji bi s velikom osjetljivošću i specifičnošću, po mogućnosti više od 90% (152), mogao razlikovati agresivnije od indolentnijih papilarnih karcinoma štitnjače. Iz pragmatičnih razloga, biljeg bi optimalno bilo moguće izolirati u serumu bolesnika jer je takav način analize tehnički najjednostavniji i ekonomski najisplativiji. Drugi načini izolacije biljega su izolacija iz citopunkcijskog uzorka i iz samog tkiva štitnjače, odnosno tumora, patohistološkom analizom. S obzirom na to da je primarno liječenje karcinoma štitnjače kirurško, naknadna analiza tkiva štitnjače patohistološkom analizom te identifikacija biljega u tkivu pruža najviše informacija, ali u suboptimalnom trenutku liječenja. Takav način određivanja biljega mogao bi samo stratificirati bolesnike u one koje bi, teoretski, trebalo češće klinički pratiti ili ih liječiti adjuvantnom radionuklidnom terapijom te reoperirati u smislu profilaktičke disekcije. Očita je mana te metode izostanak preoperativnog stratificiranja pacijenata u visoko- i niskorizične, što onemogućuje određivanje optimalnog algoritma liječenja i prije nego što je prvi korak liječenja započeo. Analiza uzorka dobivenog citološkom punkcijom je preoperativna metoda, ali je invazivna te zahtijeva iskusnog citologa koji mora velikom preciznošću uzorkovati suspektno tkivo štitnjače, pogotovo kada je riječ o papilarnim mikrokarcinomima.

Dakle, prema ranije navedenoj klasifikaciji, a i prema samoj bolesti, idealni biljeg papilarnog karcinoma štitnjače bi istovremeno bio biljeg rizika, dijagnoze i prognoze.

Trenutačno, osim izloženosti ionizirajućem zračenju u djetinjstvu i bolesti u obitelji, ne postoje specifični rizični čimbenici koji bi identificirali određenu podskupinu populacije koja ima viši rizik za razvoj papilarnog karcinoma štitnjače. S obzirom na veliku učestalost tog karcinoma te značajni morbiditet koji uznapredovala bolest uzrokuje, biljeg rizika bi uvelike unaprijedio mogućnost pravovremene intervencije.

Osim papilarnog karcinoma štitnjače, ugrubo postoje još tri tipa karcinoma štitnjače, uz još nekoliko vrsta benignih tvorbi štitnjače koji se ultrazvučno i klinički prezentiraju na sličan način. Zlatni standard dijagnostike, citopunkcija i analiza punktata, kao što je vidljivo iz

najkorištenijeg klasifikacijskog sustava Bethesda, nosi značajnu mogućnost pogreške u dijagnozi bolesti, što se jedino može definitivno razlučiti kirurškim zahvatom i patohistološkom analizom odstranjenog tkiva. Stoga bi potencijalni biljeg dijagnoze značajno reducirao nepotrebne operativne zahvate te probrao one pacijente koji uistinu imaju malignu bolest i zahtijevaju operaciju od onih koji nemaju i čija je terapijska opcija kliničko praćenje.

Iako je prognoza papilarnog karcinoma štitnjače dobra u pogledu preživljenja, odnosno smrti, postoji značajna incidencija recidivirajuće bilo lokalne bilo regionalne bolesti koja zahtijeva kirurško liječenje, što pak sa sobom nosi značajan rizik od morbiditeta. Prognostički biljeg bi mogao stratificirati pacijente koji imaju agresivniju bolest i utjecati na opseg kirurškog liječenja ili na postoperativno liječenje i praćenje.

Primarni cilj ovog rada bio je utvrditi postoje li razlike u proteomskom profilu papilarnih mikrokarcinoma koji su metastazirali u regionalne limfne čvorove i onih koji nisu. Proteomika je izabrana djelomično i zato što je „shotgun“ metoda, to jest, ne analizira se točno određena molekula nego se analizira cjelokupno tkivo, dobiva se kompletni spektar proteina u tkivu i naknadno se analiziraju dobiveni podatci. Smatramo da je navedena metoda dobra jer pruža veliku količinu informacija. Za ovu specifičnu bolest, to je od velike važnosti jer dosadašnja istraživanja nisu uspjela sa sigurnošću potvrditi određeno biokemijsko svojstvo kojim bi se diferencirala bolest ovisno o biološkom ponašanju. Stoga je prvotna namjera bila istražiti postoji li uopće razlika u ekspresiji proteina, a zatim, ako postoji, pokušati razlučiti koji proteini mogu biti odgovorni ili biti biljezi agresivnijeg ponašanja.

Ovo je iznimno zanimljivo područje ako se uzme u obzir šaroliki spektar prezentacije ove bolesti. S obzirom na prirodu bolesti, u kliničkom okruženju teško je uspostaviti povjerljivi odnos s pacijentom i pružiti adekvatne informacije i definirati točno određenu strategiju liječenja. Dodatnu problematiku predstavlja samo ime bolesti – karcinom, što sa sobom nosi kulturološki (i patološki) iznimno nepovoljnu konotaciju. Slijedeći najsuvremenije metode liječenja ove bolesti, poput aktivnog praćenja, teško i komplicirano je objasniti pacijentu da će se njegov karcinom pratiti, neovisno o publikacijama prema kojima je to valjana metoda kod određenih mikrokarcinoma. Tu se također javlja liječnička sumnja u optimalan način liječenja ove bolesti, koja je prije svega vođena kliničkim iskustvom o biološko-kliničkoj nepredvidljivosti bolesti i potencijalnom izlaganju pacijenta riziku od suboptimalnog liječenja.

U ovome radu, analizom izoliranih proteina u skupinama karcinoma koji su dali metastaze i onih koji nisu uočava se razmjerno velika različitost u proteomskom profilu. Papilarni karcinomi između dviju skupina dijele samo 10 proteina, a razlikuju se u svim ostalim izoliranim proteinima. Takav rezultat govori u prilog značajnoj biološkoj razlici patohistološki istovrsnih tumora. Te razlike, i funkcije proteina izoliranih u određenoj skupini, potencijalno bi mogle objasniti bitnu razliku u biološkom ponašanju papilarnih mikrokarcinoma.

Patohistološka (i citološka) klasifikacija ne može diferencirati papilarne karcinome ovisno o njihovu biološkom ponašanju. S obzirom na to da se pod istim nazivom opisuju indolentni, gotovo benigni karcinomi i oni koji su agresivniji sa značajnim moribiditetom, od velike je važnosti pravilno razlikovanje tih dviju skupina. Dubljom analizom pojedinih izoliranih proteina pokušalo se objasniti različitost u biološkom ponašanju i agresivnost karcinoma koji regionalno metastaziraju.

U ovom proteomskom istraživanju identificirano je nekoliko potencijalno zanimljivih i značajnih proteina koji su izolirani u metastatskoj skupini, koji svojim patofiziološkim ulogama sudjeluju u metastaziranju i agresivnijem biološkom ponašanju tumora. To su ubikvitin konjugirajući enzim E2 varijanta 1, natrij- i klor-ovisan taurinski transporter, sindekan-2 i sindekan-4, alfa-1-antitripsin, histon-lizin N-metiltransferaza 2C i citrat sintaza.

Prema ulogama, odnosno smještaju u stanici, oni pripadaju proteinima koji sudjeluju u epigenetskoj metilaciji (histon-lizin N-metiltransferaza 2C), posttranslacijskoj modifikaciji (ubikvitin konjugirajući enzim E2 varijanta 1) te su i transmembranski proteini (sindekani -2 i sindekan-4, natrij- i klor-ovisan taurinski transporter). Zanimljivo, iako su ovi proteini povezani s karcinogenezom tumora mnogih sijela, za većinu postoji oskudna količina znanstvenih istraživanja koja ih povezuju s karcinomima štitnjače. Proteini koji su u radovima dosad povezani s karcinomima štitnjače su alfa-1-antitripsin i sindekan-4 te sindekan-2.

Epigenetska metilacija sudjeluje u regulaciji raznih staničnih procesa, uključujući malignu alteraciju i metastaziranje. U ovom istraživanju izoliran je histon-lizin N-metiltransferaza 2C koji je regulator epigenetske metilacije histona u procesu ekspresije gena te je kao takav povezan s karcinogenezom mnogih sijela (153, 154, 155, 156). Mutacije KMT2C evidentirane su kod karcinoma dojke, sitno- i nesitnostaničnog karcinoma pluća, adenokarcinoma želuca (gdje prema jednom radu sudjeluju u epitelno mezenhimalnoj

tranziciji), kolorektalnog karcinoma, karcinoma jednjaka, a povezane su i s agresivnošću i koštanim metastaziranjem planocelularnog karcinoma kože te je navedena i njihova uloga u migraciji, invazivnosti i metastaziranju osteosarkoma (157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166). Kod karcinoma dojke smanjena ekspresija povezana je s boljom prognozom bolesti, te je predložen kao mogući biljeg osjetljivosti na onkološku terapiju, slično kao i kod kolorektalnog karcinoma i dukalnog adenokarcinoma gušterače (160, 161, 167).

Ubikvitin konjugirajući enzim E2 varijanta 1 (UBE2V1 ili UEV1A) nekatalitički je kofaktor Ubc13 (Ubikvitin E2 konjugirajući enzim), nužan za poliubikvitinaciju ciljnih proteina preko Lys63-vezanih lanaca te sudjeluje u aktivaciji inhibitora nuklearnog faktora-kB kinaze čime posljedično aktivira put NF-kB te sudjeluje i u aktivaciji signalnih putova AKT i MAPK (168, 169, 170, 171, 172). Preko NF-kB puta inhibira stres-induciranu apoptozu (173), pospješuje metastaziranje karcinoma dojke i kolona (174, 175, 176), a preko AKT puta pospješuje migraciju, preživljenje i kemorezistenciju stanica karcinoma dojke (171, 172). Također se nalazi prekomjerno ekspimiran u malignim melanomima, a povišena ekspresija korelira i s lošijim preživljenjem i agresivnijom bolešću kod karcinoma cerviksa (177, 178).

Epitelno-mezenhimalna tranzicija biološki je proces koji ima važnu ulogu u metastaziranju prilikom kojeg stanice epitelnog podrijetla podliježu promjenama u kojima dobivaju mezenhimalni fenotip koji ih čini migratornijima i invazivnijima. Sindekan-2 i sindekan-4 te dijelom i histon-lizin N-metiltransferaza 2C sudjeluju u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji. Sindekan-2 i sindekan-4 članovi su skupine transmembranskih heparan sulfat proteoglikana. Budući da su transmembranski proteini te su sposobni povezati ekstracelularni matriks i unutarstanične signalne kaskade, imaju mnoštvo različitih uloga u rastu i diferencijaciji stanice, kao i u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji i širenju malignih stanica (179, 180, 181). Prekomjerna ekspresija sindekana-4, kao i njegova moguća uloga kao biljega kod papilarnih karcinoma štitnjače navedena je u više studija (182, 183, 184, 185). Također, stišavanje SDC4 gena kod papilarnih karcinoma štitnjače inhibira epitelno-mezenhimalnu tranziciju te inducira apoptozu stanica karcinoma (186).

Osim kod karcinoma štitnjače, povišena ekspresija SDC4 povezana s metastaziranjem, lošijom prognozom i agresivnijom bolešću, uočena je kod karcinoma bubrega, ovarija i osteosarkoma te kod kolorektalnih karcinoma i karcinoma pluća (187, 188, 189, 190, 191).

Za sindekan-2 se također smatra da ima važnu ulogu u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji, kao i za sindekan-4 (192). Zanimljivo, osim u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji, sudjeluje u više

bioloških procesa koji su ključni za metastaziranje. Faktor je u tumorskoj angiogenezi reagirajući s faktorima VEGF, EphB2 i FGF-2 te je povezan s gubitkom kontaktne inhibicije posljedično utječući na karcinogenezu (193).

Gledajući pojedine podtipove karcinoma, povišena ekspresija sindekana-2 povezana je s agresivnijim hilarnim kolangiokarcinomom (194), invazivnošću i metastaziranjem karcinoma dojke (195), povećanom agresivnošću i metastaziranjem karcinoma prostate (196, 197), te se smatra i da sudjeluje u karcinogenezi planocelularnog karcinoma pluća (198).

Više radova bavilo se hipermetiliranim genom *SDC2* kao mogućim biljekom otkrivanja ranih karcinoma kolona (199, 200, 201).

Smanjena ekspresija sindekana-2 povezana je sa smanjenim invazivnim potencijalom kod karcinoma kolona (202) i adenokarcinoma pluća (203). Do sada postoji jedna studija u kojoj je povećana ekspresija sindekana-2 povezana s niskorizičnim papilarnim karcinomom štitnjače (204).

U ovom istraživanju u skupini karcinoma koji su dali metastaze izoliran je još jedan važan transmembranski protein, natrij- i klor ovisan taurinski transporter. Natrij- i klor ovisan taurinski transporter pripada skupini transmembranskih proteina koji sudjeluju u transportu taurina, b-alanina i GABA (205, 206, 207). Prema studijama ovaj protein je povezan s proliferacijom i preživljenjem stanica (208). Također, pokazano je da taurin ima anti-apoptotski učinak (209). Povišena ekspresija transportera uzrokovana hipometilacijom *SLC6A6* gena je, prema jednoj studiji, povezana s tumorigenezom i lošijim preživljenjem kod karcinoma želuca (210). Prekomjerna ekspresija ovog proteina uočena je kod karcinoma cerviksa te kod kolorektalnih karcinoma s lošijim preživljenjem i povezana je s njihovom otpornošću na kemoterapiju. Navodi se i kao mogući biljeg agresivnijih varijanti kolorektalnog karcinoma (211, 212, 213, 214).

Protein, čije bi se djelovanje moglo objasniti u kontekstu tumorske hipoksije, odnosno Warburgova efekta, a koji je izoliran u ovoj studiji u skupini bez metastaza, jest citrat sintetaza. Citrat sintetaza je enzim ciklusa trikarboksilne kiseline koji katalizira reakciju oksaloacetične kiseline i acetil koenzima A u stvaranju citrata.

Postoji nekoliko istraživanja u kojima se izolirala povišena vrijednost citrat sintetaze u stanicama raka dojke, prostate, ovarija i gušterače. Ta se povišena ekspresija tumači hipoksičnim uvjetima u stanicama te je povezana s agresivnijim rastom i metastaziranjem.

Također se pretpostavlja da je citrat, produkt citrat sintetaze, signalna molekula u aktivaciji onkogeni (215, 216, 217, 218).

Razlikovni protein u skupini bez metastaza koji najveći broj istraživanja povezuje s karcinomima štitnjače te ga identificira kao potencijalni biljeg jest alfa-1-antitripsin.

Alfa-1-antitripsin je u više radova identificiran kao mogući biljeg razlikovanja papilarnih karcinoma štitnjače od normalnog tkiva (219, 220, 221) te se njegova mutacija pojavljuje i u nasljednih papilarnih karcinoma (222). Također se navodi kao mogući biljeg u otkrivanju ranih nesitnostaničnih karcinoma pluća (223), ranih kolorektalnih karcinoma (224, 225) te kao biljeg progresije planocelularnog karcinoma kože (226). Kod kolorektalnih karcinoma povišena ekspresija povezana je s invazijom i migracijom (227). U radu autora Janciauskiene S i sur. povišena ekspresija alfa-1-antitripsina u okolnom tkivu i krvi, ali ne i u samom tkivu nesitnostaničnog karcinoma pluća povezana je s lošijim preživljenjem (228). Prekomjerna ekspresija gena alfa-1-antitripsin, SERPINA1, kod karcinoma želuca povezana je s agresivnošću tumora i metastaziranjem (229, 230) te se spominje i kao mogući serumski biljeg karcinoma želuca (231, 232).

Proteini koji su izolirani također mogu biti produkti određenih prekomjerno eksprimiranih gena koji nizvodnim djelovanjem utječu na njihovo sintetiziranje. Metodama funkcionalnog obogaćivanja utvrđeno je, na temelju prisutnosti izoliranih proteina u našem setu, da postoji razlika u ekspresiji triju gena u skupini s metastazama u odnosu na skupinu bez metastaza. To su PLAU, ATF1 i CREB1.

Protein c-AMP response element binding protein (CREB1) transkripcijski je faktor obitelji bZIP, koji se aktivira fosforilacijom SER133 (233).

CREB1 povezan je s lošijom prognozom u karcinoma ovarija te je predložen i kao potencijalni biljeg (234). Aktivacija CREB1 povezana je s proliferacijom, invazivnošću ili metastaziranjem karcinoma želuca (235), mokraćnog mjehura (236, 237), dojke (238, 239), pluća (240), kolorektalnog karcinoma (241, 242, 243, 244, 245), prostate (246, 247), nazofarinksa (248), jajnika (249). Zanimljivo, inaktivacijom CREB1 smanjio se rast i progresija karcinoma jednjaka, želuca, kolona (250, 251, 252, 253, 254).

Također, najčešća genetska alteracija kod papilarnog karcinoma štitnjače, RET/PTC alteracija, potiče CREB1 fosforilaciju koja regulira proliferaciju stanica štitnjače i papilarnog karcinoma (255, 256, 257).

ATF1 transkripcijski je faktor ATF/CREB i bZIP (basic-region leucine zipper) obitelji koji utječe na brojne stanične procese, među ostalim rasta i preživljavanja, regulirajući ekspresiju nizvodnih ciljnih gena (258). Dosadašnja istraživanja povezala su ATF1 s tumorigenezom tumora mnogih sijela. Istraživanja su pokazala da regulira izražaj FRA-1 i Bcl-2, što je, među ostalim, povezano s razvojem nazofaringealnog karcinoma i karcinoma bubrega (259, 260, 261, 262). ATF1 je također povezan s progresijom razvoja kolorektalnog karcinoma (263, 264, 265, 266), karcinoma ovarija (267, 268) i cerviksa (269), invazivnošću i migracijom karcinoma pluća (270, 271). Kod karcinoma jednjaka, invazivnost, migratornost, proliferacije i preživljenje stanica povezani su s povećanom ekspresijom ATF1, a inhibicija ATF1 značajno povećava osjetljivost karcinoma na paklitaksel (272). Kod papilarnih karcinoma štitnjače, HGF preko ATF1 utječe na smanjenje ekspresije Trombofosfodin-1 proteina, što posljedično povećava invazivnost i agresivnost karcinoma (273).

Gen PLAUG kodira serinsku proteazu urokinaza-tip aktivator plazminogena (uPA) ili, jednostavnije, urokinazu, čija je glavna funkcija u organizmu konverzija zimogena plasminogena u plasmin vežući se na receptor uPAR. Plasmin pak aktivira proteolitičku kaskadu koja može imati ulogu u trombolizi, degradaciji ekstracelularnog matriksa, upali, aterosklerozi, tumorskoj invaziji, angiogenezi i metastaziranju (274, 275, 276).

Povišena ekspresija urokinaze povezana je s lošijom prognozom, invazivnošću i metastaziranjem tumora mnogih sijela, kao što su dojka (277, 278, 279, 280), prostata (281, 282), debelo crijevo (283, 284, 285), glava i vrat (286, 287, 288, 289, 290) i dr. (291).

7. ZAKLJUČCI

U ovom se istraživanju na analizi 30 papilarnih mikrokarcinoma štitnjače izradio proteomski profil papilarnih mikrokarcinoma bez metastaza i papilarnih mikrokarcinoma s metastazama u lateralnim regijama vrata.

Uspoređivali su se proteomski profili 15 papilarnih mikrokarcinoma koji u trenutku kirurškog liječenja, a i tijekom daljnjeg praćenja, nisu razvili regionalnu metastatsku bolest s proteomskim profilom papilarnih mikrokarcinoma koji su u trenutku kirurškog liječenja razvili regionalnu metastatsku bolest.

Proteomski profili analizirani su bioinformatičkim metodama i funkcionalnim obogaćivanjem. Također su se analizirale patofiziološke uloge pojedinih proteina koje bi mogle objasniti regionalno metastaziranje papilarnih mikrokarcinoma.

1. Postoje značajne razlike u izraženosti proteina u proteomskom profilu papilarnih mikrokarcinoma s metastazama i bez njih.
2. Analizirajući patofiziološke uloge proteina, utvrdilo se da proteini ubikvitin konjugirajući enzim E2 varijanta 1, natrij- i klor-ovisan taurinski transporter, sindekan-2 i sindekan-4, alfa-1-antiripsin, histon-lizin N-metiltransferaza 2C i citrat sintaza, koji su pronađeni isključivo u skupini s metastazama, potencijalno imaju ulogu u agresivnosti bolesti i metastaziranju papilarnog mikrokarcinoma štitnjače.
3. Bioinformatičkom metodom funkcionalnog obogaćivanja utvrdila se, prema izražaju proteina u dobivenom proteomskom profilu, povećana ekspresija gena PLAU, ATF1 i CREB1 u skupini papilarnih mikrokarcinoma s metastazama. Ti su geni povezani s agresivnijim ponašanjem i metastaziranjem kod tumora drugih sijela te potencijalno imaju ulogu u agresivnijem ponašanju i metastaziranju kod papilarnog mikrokarcinoma štitnjače.

8. SAŽETAK

Povećana incidencija papilarnog karcinoma štitnjače, a prije svega papilarnog mikrokarcinoma velik je dijagnostičko-terapijski problem te opterećenje za pacijente i zdravstveni sustav. Iako se papilarni karcinomi smatraju karcinomima niske smrtnosti, oni nose značajan rizik od regionalnog širenja bolesti, što dovodi do povećanog morbiditeta, s obzirom na to da je primarni način liječenja ove bolesti kirurški. Trenutačno ne postoje biljezi bolesti koji bi preoperativno mogli, s visokom specifičnošću i osjetljivošću, diferencirati indolentnu bolest od one agresivnije. Takva preoperativna diferencijacija omogućila bi optimalno planiranje liječenja uz značajno smanjenje opterećenja i morbiditeta samog liječenja.

Prema svim trenutačno prihvaćenima stratifikacijama papilarni mikrokarcinomi pripadaju skupini niskorizičnih papilarnih karcinoma, no ipak su u znatnoj mjeri skloni regionalnom širenju bolesti. U ovom radu analiziran je proteomski profil 30 papilarnih mikrokarcinoma – 15 koji u trenutku operativnog liječenja nisu dali metastaze i 15 koji su dali metastaze u lateralne regije vrata. Proteomski profil papilarnih mikrokarcinoma pokazao je značajnu razliku u izražaju proteina i gena ovisno o promatranoj skupini.

U skupini s metastazama, utvrđeno je više proteina koji bi mogli biti povezani s metastaziranjem i agresivnijim biološkim ponašanjem. To su ubikvitin konjugirajući enzim E2 varijanta 1, natrij- i klor-ovisan taurinski transporter, sindekani -2 i -4, alfa-1-antitripsin, histon-lizin N-metiltransferaza 2C i citrat sintaza. Također je u skupini s metastazama identificirana pojačana ekspresija triju gena: PLAU, ATF1 i CREB1, koji potencijalno imaju ulogu u agresivnijem ponašanju određenih papilarnih mikrokarcinoma.

Budući da je ovo prvi proteomski rad, prema našim spoznajama, koji je uspoređivao papilarne mikrokarcinome koji su dali regionalne metastaze i one koji nisu, rezultati ovog rada pridonijeli su produbljivanju znanja o proteinskom izražaju i potencijalnoj patofiziološkoj ulozi izraženih proteina u metastaziranju papilarnog mikrokarcinoma štitnjače. Također, ovim radom postavljeni su i temelji za buduća istraživanja.

9. SUMMARY

Prognostic significance of the proteome profile of well differentiated papillary thyroid carcinoma

Filip Matovinović, Zagreb, 2023

The increasing incidence of papillary thyroid cancer, primarily papillary microcarcinoma, represents a significant diagnostic and therapeutic problem and a burden for patients and the health care system. Although papillary carcinomas are considered to be cancers of low mortality, they carry a significant risk of regional spread of disease, which consequently leads to increased morbidity, given that the primary method of treatment is surgery. Currently, there are no biomarkers that could, preoperatively, with high specificity and sensitivity, differentiate an indolent disease from a more aggressive one. Such preoperative differentiation would enable optimal treatment planning with a significant reduction in burden and morbidity of the treatment itself. According to all currently accepted classifications, papillary microcarcinomas belong to the group of low-risk papillary carcinomas, but they are still significantly prone to regional spread of disease. In this thesis, the proteomic profile of 30 papillary microcarcinomas was analyzed – 15 that did not metastasize at the time of surgical treatment and 15 that metastasized to the lateral regions of the neck. The proteomic profile of papillary microcarcinomas showed a significant difference in protein and gene expression, depending on the observed group.

In the group with metastases, certain proteins were identified that could lead to metastatic disease and more aggressive biological behavior. These are ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1, sodium- and chlorine-dependent taurine transporter, syndecans -2 and -4, alpha-1-antitrypsin, histone-lysine N-methyltransferase 2C and citrate synthase. Increased expression of three genes, PLAU, ATF1 and CREB1, was also identified in the group with metastases, which could also potentially play a role in the more aggressive behavior of certain papillary microcarcinomas.

Considering the results and the fact that, to our knowledge, this is the first proteomic thesis that compared papillary microcarcinomas that gave regional metastases and those that did not, this thesis brought new knowledge about protein expression and the potential pathophysiological role of differentially expressed proteins in papillary thyroid microcarcinomas and laid the foundations for future research.

10. POPIS LITERATURE

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov;68(6):394–424. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
2. National Cancer Institute. SEER Cancer Stat Facts: Thyroid Cancer [Internet]. 2021. Dostupno na: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018. *Regist za rak Republike Hrvat.* 2020;(Bilten br. 48).
4. Wiltshire JJ, Drake TM, Uttley L, Balasubramanian SP. Systematic review of trends in the incidence rates of thyroid cancer. *Thyroid.* 2016;26(11):1541–52.
5. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974–2013. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017;317(13):1338–48.
6. Alok Pathak K, Leslie WD, Klonisch TC, Nason RW. The changing face of thyroid cancer in a population-based cohort. *Cancer Med* [Internet]. 2013 Aug 26;2(4):537–44. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.103>
7. Mack WJ, Preston-Martin S, Bernstein L, Qian D, Xiang M. Reproductive and hormonal risk factors for thyroid cancer in Los Angeles County females. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 1999 Nov;8(11):991–7. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10566554>
8. Peterson E, De P, Nuttall R. BMI, Diet and Female Reproductive Factors as Risks for Thyroid Cancer: A Systematic Review. Ludgate M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan 19;7(1):e29177. Dostupno na: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0029177>
9. Nikiforov YE. Radiation-induced thyroid cancer: What we have learned from Chernobyl. *Endocr Pathol* [Internet]. 2006 Dec;17(4):307–18. Dostupno na: <http://link.springer.com/10.1007/s12022-006-0001-5>
10. Efanov AA, Brenner A V, Bogdanova TI, Kelly LM, Liu P, Little MP, i sur.

- Investigation of the Relationship Between Radiation Dose and Gene Mutations and Fusions in Post-Chernobyl Thyroid Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2018 Apr 1;110(4):371–8. Dostupno na: <https://academic.oup.com/jnci/article/110/4/371/4641728>
11. Han MA, Kim JH. Diagnostic X-Ray Exposure and Thyroid Cancer Risk: Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid* [Internet]. 2018 Feb;28(2):220–8. Dostupno na: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2017.0159>
 12. Iglesias ML, Schmidt A, Ghuzlan A Al, Lacroix L, de Vathaire F, Chevillard S, i sur. Radiation exposure and thyroid cancer: A review. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(2):180–7.
 13. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G RJ, editor. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th Edition. International Agency for Research on Cancer; 2017.
 14. Livolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: An update. *Mod Pathol*. 2011;24:S1–9.
 15. Tuluc M, Solomides C. Thyroid Cytology. *Otolaryngol Clin North Am* [Internet]. 2014;47(4):475–89. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otc.2014.04.011>
 16. Lloyd R V., Buehler D, Khanafshar E. Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head Neck Pathol*. 2011;5(1):51–6.
 17. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, i sur. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1–133.
 18. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2009 Nov 1;132(5):658–65. Dostupno na: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCPPHLWMI3JV4LA>
 19. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* [Internet]. 2017 Nov;27(11):1341–6. Dostupno na: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2017.0500>
 20. Seningen JL, Nassar A, Henry MR. Correlation of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology with corresponding histology at Mayo Clinic, 2001-2007: An

- institutional experience of 1,945 cases. Baloch Z, editor. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2012 May;40(S1):E27–32. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/dc.21566>
21. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, i sur. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: A synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2008 Jun;36(6):425–37. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/dc.20830>
 22. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* [Internet]. 1988 Dec;104(6):947–53. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3194846>
 23. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* [Internet]. 1987 Dec;102(6):1088–95. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3686348>
 24. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* [Internet]. 1993 Dec;114(6):1050–7; discussion 1057-8. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8256208>
 25. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary Thyroid Cancer Treated at the Mayo Clinic, 1946 Through 1970: Initial Manifestations, Pathologic Findings, Therapy, and Outcome. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 1986;61(12):978–96. Dostupno na: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)62641-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-6196(12)62641-X)
 26. Machens A, Hinze R, Thomusch O, Dralle H. Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer. *World J Surg*. 2002;26(1):22–8.
 27. Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, i sur. Neck Dissection Classification Update. *Arch Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2002 Jul 1;128(7):751. Dostupno na: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archotol.128.7.751>

28. Davidson HC, Park BJ, Johnson JT. Papillary thyroid cancer: Controversies in the management of neck metastasis. *Laryngoscope*. 2008;118(12):2161–5.
29. Kim SK, Park I, Woo JW, Lee JH, Choe JH, Kim JH, i sur. Predictive Factors for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(9):2866–73.
30. Lai XJ, Zhang B, Jiang YX, Li JC, Zhao RN, Yang X, i sur. High Risk of Lateral Nodal Metastasis in Lateral Solitary Solid Papillary Thyroid Cancer. *Ultrasound Med Biol*. 2016;42(1):75–81.
31. Feng JW, Yang XH, Wu BQ, Sun DL, Jiang Y, Qu Z. Predictive factors for central lymph node and lateral cervical lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2019;21(11):1482–91.
32. Feng J-W, Qin A-C, Ye J, Pan H, Jiang Y, Qu Z. Predictive Factors for Lateral Lymph Node Metastasis and Skip Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocr Pathol* [Internet]. 2020 Mar 11;31(1):67–76. Dostupno na: <http://link.springer.com/10.1007/s12022-019-09599-w>
33. Song M, Huang Z, Wang S, Huang J, Shi H, Liu Y, i sur. Predictive factors of lateral lymph node metastasis in conventional papillary thyroid carcinoma. *Gland Surg*. 2020;9(4):1000–7.
34. Moreno MA, Edeiken-Monroe BS, Siegel ER, Sherman SI, Clayman GL. In papillary thyroid cancer, preoperative central neck ultrasound detects only macroscopic surgical disease, but negative findings predict excellent long-term regional control and survival. *Thyroid*. 2012;22(4):347–55.
35. Wada N, Masudo K, Nakayama H, Suganuma N, Matsuzu K, Hirakawa S, i sur. Clinical outcomes in older or younger patients with papillary thyroid carcinoma: Impact of lymphadenopathy and patient age. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34(2):202–7.
36. Frazell EL, Foote FW. Papillary thyroid carcinoma: Pathological findings in cases with and without clinical evidence of cervical node involvement. *Cancer*. 1955;8(6):1164–6.
37. Wada N, Duh QY, Sugino K, Iwasaki H, Kameyama K, Mimura T, i sur. Lymph Node Metastasis from 259 Papillary Thyroid Microcarcinomas: Frequency, Pattern of

- Occurrence and Recurrence, and Optimal Strategy for Neck Dissection. *Ann Surg.* 2003;237(3):399–407.
38. Lee SK, Kim SH, Hur SM, Choe JH, Kim JH, Kim JS. The efficacy of lateral neck sentinel lymph node biopsy in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2011;35(12):2675–82.
 39. Hartl DM, Leboulleux S, Al Ghuzlan A, Baudin E, Chami L, Schlumberger M, i sur. Optimization of staging of the neck with prophylactic central and lateral neck dissection for papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg.* 2012;255(4):777–83.
 40. Machens A, Hauptmann S, Dralle H. Lymph node dissection in the lateral neck for completion in central node-positive papillary thyroid cancer. *Surgery [Internet].* 2009;145(2):176–81. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2008.09.003>
 41. Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. Skip Metastases in Thyroid Cancer Leaping the Central Lymph Node Compartment. *Arch Surg.* 2004;139(1):43–5.
 42. Chung YS, Kim JY, Bae JS, Song BJ, Kim JS, Jeon HM, i sur. Lateral lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: Results of therapeutic lymph node dissection. *Thyroid.* 2009;19(3):241–6.
 43. Zhao H, Huang T, Li H. Risk factors for skip metastasis and lateral lymph node metastasis of papillary thyroid cancer. *Surg (United States) [Internet].* 2019;166(1):55–60. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2019.01.025>
 44. Lim YC, Koo BS. Predictive factors of skip metastases to lateral neck compartment leaping central neck compartment in papillary thyroid carcinoma. *Oral Oncol [Internet].* 2012;48(3):262–5. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.10.006>
 45. Park JH, Lee YS, Kim BW, Chang HS, Park CS. Skip lateral neck node metastases in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2012;36(4):743–7.
 46. Lee YS, Shin S-C, Lim Y-S, Lee J-C, Wang S-G, Son S-M, i sur. Tumor location-dependent skip lateral cervical lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *Head Neck [Internet].* 2014 Jun;36(6):887–91. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.23391>
 47. Lei J, Zhong J, Jiang K, Li Z, Gong R, Zhu J. Skip lateral lymph node metastasis

- leaping over the central neck compartment in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(16):27022–33.
48. Hou J, Zhang Y, Fan Y, Wu B. Risk factors of skip lateral lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2020;(0123456789):3–8.
 49. Dou Y, Hu D, Chen Y, Xiong W, Xiao Q, Su X. PTC located in the upper pole is more prone to lateral lymph node metastasis and skip metastasis. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2020 Dec 28;18(1):188. Dostupno na: <https://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12957-020-01965-x>
 50. McGregor GI, Luoma A, Jackson SM. Lymph node metastases from well-differentiated thyroid cancer. A clinical review. *Am J Surg*. 1985;149(5):610–2.
 51. Javid M, Graham E, Malinowski J, Quinn CE, Carling T, Udelsman R, i sur. Dissection of levels II through v is required for optimal outcomes in patients with lateral neck lymph node metastasis from papillary thyroid carcinoma. *J Am Coll Surg* [Internet]. 2016;222(6):1066–73. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2016.02.006>
 52. Noguchi S, Yamashita H, Uchino S. Modified radical neck dissection is better than partial dissection of lymph nodes. *World J Surg*. 2009;33(3):394–6.
 53. Shaha AR. Editorial: Complications of Neck Dissection for Thyroid Cancer. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2008 Feb 6;15(2):397–9. Dostupno na: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-007-9724-x>
 54. Tam S, Boonsripitayanon M, Amit M, Fellman BM, Li Y, Busaidy NL, i sur. Survival in Differentiated Thyroid Cancer: Comparing the AJCC Cancer Staging Seventh and Eighth Editions. *Thyroid*. 2018;28(10):1301–10.
 55. Smith VA, Sessions RB, Lentsch EJ. Cervical lymph node metastasis and papillary thyroid carcinoma: Does the compartment involved affect survival? Experience from the SEER database. *J Surg Oncol*. 2012;106(4):357–62.
 56. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*. 1994;97(5):418–28.
 57. Podnos YD, Smith D, Wagman LD, Ellenhorn JDI. The implication of lymph node

- metastasis on survival in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Am Surg*. 2005;71(9):731–4.
58. Lundgren CI, Hall P, Dickman PW, Zedenius J. Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: A population-based, nested case-control study. *Cancer*. 2006;106(3):524–31.
 59. Ito Y, Miyauchi A, Jikuzono T, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, et al. Risk factors contributing to a poor prognosis of papillary thyroid carcinoma: Validity of UICC/AJCC TNM classification and stage grouping. *World J Surg*. 2007;31(4):838–48.
 60. Ito Y, Fukushima M, Tomoda C, Inoue H, Kihara M, Higashiyama T, et al. Prognosis of patients with papillary thyroid carcinoma having clinically apparent metastasis to the lateral compartment. *Endocr J*. 2009;56(6):759–66.
 61. Beasley NJP, Lee J, Eski S, Walfish P, Witterick I, Freeman JL. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2002;128(7):825–8.
 62. Schneider DF, Mazeh H, Chen H, Sippel RS. Lymph Node Ratio Predicts Recurrence in Papillary Thyroid Cancer. *Oncologist*. 2013;18(2):157–62.
 63. Mazzaferri EL, Young RL. Papillary thyroid carcinoma: A 10 year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients. *Am J Med*. 1981;70(3):511–8.
 64. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: A matched-pair analysis. *Head Neck*. 1996;18(2):127–32.
 65. Harwood J, Clark OH, Dunphy JE. Significance of lymph node metastasis in differentiated thyroid cancer. *Am J Surg*. 1978;136(1):107–12.
 66. 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 [Internet]*. 2008;144(6):1070–8. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2008.08.034>
 67. Scheumann GFW, Gimm O, Wegener G, Hundeshagen H, Dralle H. Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in

- papillary thyroid cancer. *World J Surg.* 1994;18(4):559–67.
68. Toniato A, Boschin I, Casara D, Mazzarotto R, Rubello D, Pelizzo M. Papillary thyroid carcinoma: Factors influencing recurrence and survival. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(5):1518–22.
 69. Wang LY, Migliacci JC, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, Patel SG, i sur. Management and outcome of clinically evident neck recurrence in patients with papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2017 Nov 12;87(5):566–71. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12426>
 70. Chéreau N, Buffet C, Trésallet C, Tissier F, Leenhardt L, Menegaux F. Recurrence of papillary thyroid carcinoma with lateral cervical node metastases: Predictive factors and operative management. *Surg (United States).* 2016;159(3):755–62.
 71. Rivera-Robledo CG, Velázquez-Fernández D, Pantoja JP, Sierra M, Pérez-Enriquez B, Rivera-Moscoso R, i sur. Recurrent Papillary Thyroid Carcinoma to the Cervical Lymph Nodes: Outcomes of Compartment-Oriented Lymph Node Resection. *World J Surg.* 2019;43(11):2842–9.
 72. Onkendi EO, McKenzie TJ, Richards ML, Farley DR, Thompson GB, Kasperbauer JL, i sur. Reoperative experience with papillary thyroid cancer. *World J Surg.* 2014;38(3):645–52.
 73. Giordano D, Frasoldati A, Kasperbauer JL, Gabrielli E, Pernice C, Zini M, i sur. Lateral neck recurrence from papillary thyroid carcinoma: Predictive factors and prognostic significance. *Laryngoscope.* 2015;125(9):2226–31.
 74. Bardet S, Malville E, Rame JP, Babin E, Samama G, De Raucourt D, i sur. Macroscopic lymph-node involvement and neck dissection predict lymph-node recurrence in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(4):551–60.
 75. Simon D, Goretzki PE, Witte J, Röher HD. Incidence of regional recurrence guiding radicality in differentiated thyroid carcinoma. *World J Surg.* 1996;20(7):860–6.
 76. Zhao W jun, Luo H, Zhou Y mei, Dai W yu, Zhu J qiang. Evaluating the effectiveness of prophylactic central neck dissection with total thyroidectomy for cN0 papillary thyroid carcinoma: An updated meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2017;43(11):1989–2000. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2017.07.008>

77. Chen L, Wu YH, Lee CH, Chen HA, Loh EW, Tam KW. Prophylactic Central Neck Dissection for Papillary Thyroid Carcinoma with Clinically Uninvolved Central Neck Lymph Nodes: A Systematic Review and Meta-analysis. *World J Surg* [Internet]. 2018;42(9):2846–57. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s00268-018-4547-4>
78. Fujishima M, Miyauchi A, Ito Y, Kudo T, Kihara M, Miya A. Selective prophylactic lateral node dissection improves the ipsilateral lateral node recurrence-free survival: A retrospective single-center cohort study. *Ann Med Surg* [Internet]. 2020;57(July):190–5. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.07.046>
79. Noguchi S, Murakami N, Yamashita H, Toda M, Kawamoto H. Papillary Thyroid Carcinoma. *Arch Surg* [Internet]. 1998 Mar 1;133(3):287–92. Dostupno na: <http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archsurg.133.3.276>
80. Liu C, Xiao C, Chen J, Li X, Feng Z, Gao Q, i sur. Risk factor analysis for predicting cervical lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: A study of 966 patients. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–10.
81. Ito Y, Miyauchi A, Kudo T, Kihara M, Fukushima M, Miya A. The Effectiveness of Prophylactic Modified Neck Dissection for Reducing the Development of Lymph Node Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. *World J Surg*. 2017;41(9):2283–9.
82. White ML, Gauger PG, Doherty GM. Central Lymph Node Dissection in Differentiated Thyroid Cancer. *World J Surg* [Internet]. 2007 May 2;31(5):895–904. Dostupno na: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-006-0907-6>
83. Kupferman ME, Patterson DM, Mandel SJ, LiVolsi V, Weber RS. Safety of Modified Radical Neck Dissection for Differentiated Thyroid Carcinoma. *Laryngoscope*. 2004;114(3):403–6.
84. Ducoudray R, Trésallet C, Godiris-Petit G, Tissier F, Leenhardt L, Menegaux F. Prophylactic lymph node dissection in papillary thyroid carcinoma: Is there a place for lateral neck dissection? *World J Surg*. 2013;37(7):1584–91.
85. Eichhorn W, Tabler H, Lippold R, Lochmann M, Schreckenberger M, Bartenstein P. Prognostic Factors Determining Long-Term Survival in Well-Differentiated Thyroid Cancer: An Analysis of Four Hundred Eighty-Four Patients Undergoing Therapy and Aftercare at the Same Institution. *Thyroid*. 2003;13(10):949–58.

86. O'Neill CJ, Coorough N, Lee JC, Clements J, Delbridge LW, Sippel R, i sur. Disease outcomes and nodal recurrence in patients with papillary thyroid cancer and lateral neck nodal metastases. *ANZ J Surg*. 2014;84(4):240–4.
87. Gambardella C, Tartaglia E, Nunziata A, Izzo G, Siciliano G, Cavallo F, i sur. Clinical significance of prophylactic central compartment neck dissection in the treatment of clinically node-negative papillary thyroid cancer patients. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2016;14(1):1–5. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/s12957-016-1003-5>
88. Miyauchi A. Clinical Trials of Active Surveillance of Papillary Microcarcinoma of the Thyroid. *World J Surg*. 2016;40(3):516–22.
89. Davies L, Roman BR, Fukushima M, Ito Y, Miyauchi A. Patient Experience of Thyroid Cancer Active Surveillance in Japan. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2019;145(4):363–70.
90. Walgama E, Sacks WL, Ho AS. Papillary thyroid microcarcinoma: Optimal management versus overtreatment. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(1):1–6.
91. Hedman C, Strang P, Djärv T, Widberg I, Lundgren CI. Anxiety and Fear of Recurrence Despite a Good Prognosis: An Interview Study with Differentiated Thyroid Cancer Patients. *Thyroid*. 2017;27(11):1417–23.
92. Sugitani I, Ito Y, Takeuchi D, Nakayama H, Masaki C, Shindo H, i sur. Indications and Strategy for Active Surveillance of Adult Low-Risk Papillary Thyroid Microcarcinoma: Consensus Statements from the Japan Association of Endocrine Surgery Task Force on Management for Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Thyroid*. 2021;31(2):183–92.
93. Oda H, Miyauchi A, Ito Y, Yoshioka K, Nakayama A, Sasai H, i sur. Incidences of Unfavorable Events in the Management of Low-Risk Papillary Microcarcinoma of the Thyroid by Active Surveillance Versus Immediate Surgery. *Thyroid* [Internet]. 2016 Jan;26(1):150–5. Dostupno na: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2015.0313>
94. Al-Qurayshi Z, Nilubol N, Tufano RP, Kandil E. Wolf in Sheep's Clothing: Papillary Thyroid Microcarcinoma in the US. *J Am Coll Surg* [Internet]. 2020;230(4):484–91. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2019.12.036>

95. Mehanna H, Al-Maqbili T, Carter B, Martin E, Campain N, Watkinson J, i sur. Differences in the recurrence and mortality outcomes rates of incidental and nonincidental papillary thyroid microcarcinoma: A systematic review and meta-analysis of 21 329 person-years of follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):2834–43.
96. Kim K, Zheng X, Kim JK, Lee CR, Kang SW, Lee J, i sur. The contributing factors for lateral neck lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma (PTMC). *Endocrine* [Internet]. 2020;69(1):149–56. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-020-02251-2>
97. Back K, Kim JS, Kim JH, Choe JH. Superior Located Papillary Thyroid Microcarcinoma is a Risk Factor for Lateral Lymph Node Metastasis. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2019;26(12):3992–4001. Dostupno na: <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07587-2>
98. Zhang X, Zhang L, Xue S, Wang P, Chen G. Predictive factors of lateral lymph node metastasis in solitary papillary thyroid microcarcinoma without gross extrathyroidal extension. *Asian J Surg* [Internet]. 2019;42(4):563–70. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2018.07.003>
99. Xue S, Han Z, Lu Q, Wang P, Chen G. Clinical and ultrasonic risk factors for lateral lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2020;10(April):1–9.
100. Wang W, Zhang Z, Zhao Y, Xue W, Xia F, Li X. Management of Lateral Multiple-Level Metastasis in N1b Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Front Oncol*. 2020;10(August):1–7.
101. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, i sur. Proteomics: New perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*. 2000;356(9243):1749–56.
102. Tan HT, Lee YH, Chung MCM. Cancer proteomics. *Mass Spectrom Rev* [Internet]. 2012 Sep;31(5):583–605. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2->

eng.pdf;jsessionid=F9A3B620D10ECFAF8498AC0E08EFCBC8?sequence=1%0Ahttp://apps.who.int/

103. Abdellah Z, Ahmadi A, Ahmed S, Aimable M, Ainscough R, Almeida J, i sur. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931–45.
104. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, i sur. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* [Internet]. 2014 Oct;159(3):676–90. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012380>
105. Hood BL, Darfler MM, Guiel TG, Furusato B, Lucas DA, Ringeisen BR, i sur. Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(11):1741–53.
106. Bronsert P, Weißer J, Biniossek ML, Kuehs M, Mayer B, Drendel V, i sur. Impact of routinely employed procedures for tissue processing on the proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Proteomics - Clin Appl*. 2014;8(9–10):796–804.
107. Jain KK. Role of proteomics in diagnosis of cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2002;1(4):281–6.
108. Novak R, Grgurević L. Primjena proteomike u biomedicini. In: Lovrić J, Rogić D, editors. *Biokemijske metode u biomedicinskim istraživanjima*. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. p. 153–4.
109. Altelaar AFM, Munoz J, Heck AJR. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2013 Jan 4;14(1):35–48. Dostupno na: <http://www.nature.com/articles/nrg3356>
110. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, i sur. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
111. Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, Srivastava S. Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clin Chem*. 2002;48(8):1160–9.
112. McDermott JE, Wang J, Mitchell H, Webb-Robertson BJ, Hafen R, Ramey J, i sur.

- Challenges in biomarker discovery: Combining expert insights with statistical analysis of complex omics data. *Expert Opin Med Diagn*. 2013;7(1):37–51.
113. Haugen BR, Duncan MW. Applications of proteomics to Thyroid neoplasms: Are we there yet? *Thyroid*. 2010;20(10):1051–2.
 114. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, Netea-Maier RT, Chiang SA, Heinz DE, i sur. Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol Carcinog* [Internet]. 2006 Aug;45(8):613–26. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/mc.20193>
 115. Martínez-Aguilar J, Clifton-Bligh R, Molloy MP. Proteomics of thyroid tumours provides new insights into their molecular composition and changes associated with malignancy. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(March):1–12. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/srep23660>
 116. Sofiadis A, Dinets A, Orre LM, Branca RM, Juhlin CC, Foukakis T, i sur. Proteomic study of thyroid tumors reveals frequent up-regulation of the Ca²⁺-binding protein S100A6 in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2010;20(10):1067–76.
 117. Martínez-Aguilar J, Clifton-Bligh R, Molloy MP. A multiplexed, targeted mass spectrometry assay of the S100 protein family uncovers the isoform-specific expression in thyroid tumours. *BMC Cancer*. 2015;15(1):1–14.
 118. Cheon MG, Son YW, Lee JH, Jang HH, Chung YS. Mts1 Up-regulation is Associated with Aggressive Pathological Features in Thyroid Cancer. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2019;16(5):369–76.
 119. Min HS, Choe G, Kim SW, Park YJ, Park DJ, Youn YK, i sur. S100A4 expression is associated with lymph node metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Mod Pathol*. 2008;21(6):748–55.
 120. Zou M, Al-Baradie RS, Al-Hindi H, Farid NR, Shi Y. S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer*. 2005;93(11):1277–84.
 121. Nipp M, Elsner M, Balluff B, Meding S, Sarioglu H, Ueffing M, i sur. S100-A10, thioredoxin, and S100-A6 as biomarkers of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis identified by MALDI Imaging. *J Mol Med*. 2012;90(2):163–74.

122. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, i sur. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 1998 Jul 15;58(14):3015–20. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679965>
123. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, i sur. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* [Internet]. 1999 Jun 1;85(11):2475–84. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357421>
124. Lloyd R V. Distinguishing Benign from Malignant Thyroid Lesions: Galectin 3 as the Latest Candidate. *Endocr Pathol* [Internet]. 2001;12(3):255–8. Dostupno na: <http://link.springer.com/10.1385/EP:12:3:255>
125. Pagni F, L’Imperio V, Bono F, Garancini M, Roversi G, De Sio G, i sur. Proteome analysis in thyroid pathology. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(4):375–90.
126. Torres-Cabala C, Bibbo M, Panizo-Santos A, Barazi H, Krutzsch H, Roberts DD, i sur. Proteomic identification of new biomarkers and application in thyroid cytology. *Acta Cytol*. 2006;50(5):518–28.
127. Kim DS. Thyroid cancer: Are molecular studies making any difference? *J Laryngol Otol*. 2007;121(10):917–26.
128. Giusti L, Iacconi P, Ciregia F, Giannaccini G, Donatini GL, Basolo F, i sur. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: Proteomic analysis to identify cancer biomarkers. *J Proteome Res*. 2008;7(9):4079–88.
129. Ciregia F, Giusti L, Molinaro A, Niccolai F, Agretti P, Rago T, i sur. Presence in the pre-surgical fine-needle aspiration of potential thyroid biomarkers previously identified in the post-surgical one. *PLoS One*. 2013;8(9):2–8.
130. Paricharttanakul NM, Saharat K, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, Svasti J. Unveiling a novel biomarker panel for diagnosis and classification of well-differentiated thyroid carcinomas. *Oncol Rep*. 2016;35(4):2286–96.
131. Jung EJ, Moon HG, Park ST, Cho BI, Jeong SML, Ju YT, i sur. Decreased annexin A3 expression correlates with tumor progression in papillary thyroid cancer. *Proteomics - Clin Appl*. 2010;4(5):528–37.

132. Braunschweig T, Kaserer K, Chung JY, Bilke S, Krizman D, Knezevic V, i sur. Proteomic expression profiling of thyroid neoplasms. *Proteomics - Clin Appl*. 2007;1(3):264–71.
133. Fan Y, Shi L, Liu Q, Dong R, Zhang Q, Yang S, i sur. Discovery and identification of potential biomarkers of papillary thyroid carcinoma. *Mol Cancer*. 2009;8:79.
134. Kashat L, So AKC, Masui O, Wang XS, Cao J, Meng X, i sur. Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *J Proteome Res*. 2010;9(11):5757–69.
135. So AKC, Kaur J, Kak I, Assi J, MacMillan C, Ralhan R, i sur. Biotinidase is a novel marker for papillary thyroid cancer aggressiveness. *PLoS One*. 2012;7(7).
136. Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, Mueller EC, Punyarit P, Wittmann-Liebold B, i sur. Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics*. 2002;2(6):706–12.
137. Galli M, Pagni F, De Sio G, Smith A, Chinello C, Stella M, i sur. Proteomic profiles of thyroid tumors by mass spectrometry-imaging on tissue microarrays. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2017;1865(7):817–27. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.11.020>
138. Ucal Y, Eravci M, Tokat F, Duren M, Ince U, Ozpinar A. Proteomic analysis reveals differential protein expression in variants of papillary thyroid carcinoma. *EuPA Open Proteomics* [Internet]. 2017;17(32):1–6. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euprot.2017.09.001>
139. Wei X, Zhang Y, Yu S, Li S, Jiang W, Zhu Y, i sur. PDLIM5 identified by label-free quantitative proteomics as a potential novel biomarker of papillary thyroid carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018;499(2):338–44. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.159>
140. Pagni F, De Sio G, Garancini M, Scardilli M, Chinello C, Smith AJ, i sur. Proteomics in thyroid cytopathology: Relevance of MALDI-imaging in distinguishing malignant from benign lesions. *Proteomics*. 2016;16(11–12):1775–84.
141. Jin S, Bao W, Yang YT, Fu Q, Bai Y, Liu Y. Proteomic analysis of the papillary thyroid microcarcinoma. *Ann Endocrinol (Paris)* [Internet]. 2019;80(5–6):293–300.

Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ando.2019.01.003>

142. Lin P, Yao Z, Sun Y, Li W, Liu Y, Liang K, i sur. Deciphering novel biomarkers of lymph node metastasis of thyroid papillary microcarcinoma using proteomic analysis of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy samples. *J Proteomics* [Internet]. 2019;204(June):103414. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103414>
143. Zhan S, Wang T, Wang M, Li J, Ge W. In-Depth Proteomics Analysis to Identify Biomarkers of Papillary Thyroid Cancer Patients Older Than 45 Years with Different Degrees of Lymph Node Metastases. *Proteomics - Clin Appl*. 2019;13(5):1–10.
144. Villanueva J, Martorella AJ, Lawlor K, Philip J, Fleisher M, Robbins RJ, i sur. Serum peptidome patterns that distinguish metastatic thyroid carcinoma from cancer-free controls are unbiased by gender and age. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1840–52.
145. Gawin M, Kurczyk A, Stobiecka E, Frątczak K, Polańska J, Pietrowska M, i sur. Molecular Heterogeneity of Papillary Thyroid Cancer: Comparison of Primary Tumors and Synchronous Metastases in Regional Lymph Nodes by Mass Spectrometry Imaging. *Endocr Pathol*. 2019;30(4):250–61.
146. Song HJ, Xue YL, Qiu ZL, Luo QY. Comparative serum proteomic analysis identified afamin as a downregulated protein in papillary thyroid carcinoma patients with non-131I-avid lung metastases. *Nucl Med Commun*. 2013;34(12):1196–203.
147. Ostasiewicz P, Zielinska DF, Mann M, Wiśniewski JR. Proteome, Phosphoproteome, and N-Glycoproteome Are Quantitatively Preserved in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue and Analyzable by High-Resolution Mass Spectrometry. *J Proteome Res* [Internet]. 2010 Jul 2;9(7):3688–700. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr100234w>
148. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 Nov;193(1):265–75. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
149. Kim J, Kim BC, Lopez-Ferrer D, Petritis K, Smith RD. Nanobiocatalysis for protein digestion in proteomic analysis. *Proteomics* [Internet]. 2010 Feb;10(4):687–99. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200900519>
150. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-

- fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 Aug 2;2(8):1896–906. Dostupno na: <http://www.nature.com/articles/nprot.2007.261>
151. Ito Y, Miyauchi A, Kobayashi K, Kihara M, Miya A. Static and dynamic prognostic factors of papillary thyroid carcinoma. *Endocr J*. 2014;61(12):1145–51.
 152. Brower V. Biomarkers: Portents of malignancy. *Nature* [Internet]. 2011 Mar 23;471(7339):S19–20. Dostupno na: <http://www.nature.com/articles/471S19a>
 153. Chen X, Zhang G, Chen B, Wang Y, Guo L, Cao L, i sur. Association between histone lysine methyltransferase KMT2C mutation and clinicopathological factors in breast cancer. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;116(April):108997. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108997>
 154. McGrath J, Trojer P. Targeting histone lysine methylation in cancer. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2015;150:1–22. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.002>
 155. Ford DJ, Dingwall AK. The cancer COMPASS: Navigating the functions of MLL complexes in cancer. *Cancer Genet* [Internet]. 2015;208(5):178–91. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.01.005>
 156. Fagan RJ, Dingwall AK. COMPASS Ascending: Emerging clues regarding the roles of MLL3/KMT2C and MLL2/KMT2D proteins in cancer. *Cancer Lett*. 2019;458:56–65.
 157. Chang YS, Tu SJ, Chen YC, Liu TY, Lee YT, Yen JC, i sur. Mutation profile of non-small cell lung cancer revealed by next generation sequencing. *Respir Res* [Internet]. 2021;22(1):1–10. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01608-5>
 158. Hu J, Wang Y, Zhang Y, Yu Y, Chen H, Liu K, i sur. Comprehensive genomic profiling of small cell lung cancer in Chinese patients and the implications for therapeutic potential. *Cancer Med*. 2019;8(9):4338–47.
 159. Wang R, Song S, Harada K, Ghazanfari Amlashi F, Badgwell B, Pizzi MP, i sur. Multiplex profiling of peritoneal metastases from gastric adenocarcinoma identified novel targets and molecular subtypes that predict treatment response. *Gut*. 2020;69(1):18–31.

160. Liu K, Wang JF, Zhan Y, Kong DL, Wang C. Prognosis model of colorectal cancer patients based on NOTCH3, KMT2C, and CREBBP mutations. *J Gastrointest Oncol*. 2021;12(1):79–88.
161. Liu X, Qiu R, Xu M, Meng M, Zhao S, Ji J, i sur. KMT2C is a potential biomarker of prognosis and chemotherapy sensitivity in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2021;189(2):347–61. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06325-1>
162. Song Y, Li L, Ou Y, Gao Z, Li E, Li X, i sur. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature* [Internet]. 2014;508(7498):91–5. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13176>
163. Cho S-J, Yoon C, Lee JH, Chang KK, Lin J, Kim Y-H, i sur. KMT2C Mutations in Diffuse-Type Gastric Adenocarcinoma Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 Dec 15;24(24):6556–69. Dostupno na: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-17-1679>
164. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, Drummond JA, Peng SA, Saade RE, i sur. Mutational Landscape of Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 Dec 15;20(24):6582–92. Dostupno na: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-1768>
165. Mastoraki S, Balgkouranidou I, Tsaroucha E, Klinakis A, Georgoulas V, Lianidou E. KMT2C promoter methylation in plasma-circulating tumor DNA is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol*. 2021;15(9):2412–22.
166. Chiappetta C, Carletti R, Della Rocca C, Di Cristofano C. KMT2C modulates migration and invasion processes in osteosarcoma cell lines. *Pathol Res Pract*. 2019;215(10):1–6.
167. Dawkins JBN, Wang J, Maniati E, Heward JA, Koniali L, Kocher HM, i sur. Reduced Expression of Histone Methyltransferases KMT2C and KMT2D Correlates with Improved Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Aug 15;76(16):4861–71. Dostupno na: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-16-0481>
168. Andersen PL, Zhou H, Pastushok L, Moraes T, McKenna S, Ziola B, i sur. Distinct

- regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol* [Internet]. 2005 Aug 29;170(5):745–55. Dostupno na: <https://rupress.org/jcb/article/170/5/745/34194/Distinct-regulation-of-Ubc13-functions-by-the-two>
169. Wu Z, Andersen PL, Moraes T, McKenna SA, Zhang Y, Zhang W, i sur. Uev1A amino terminus stimulates poly-ubiquitin chain assembly and is required for NF- κ B activation. *Cell Signal* [Internet]. 2020;74(April 2019):109712. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109712>
 170. Yang W-L, Wang J, Chan C-H, Lee S-W, Campos AD, Lamothe B, i sur. The E3 Ligase TRAF6 Regulates Akt Ubiquitination and Activation. *Science (80-)* [Internet]. 2009 Aug 28;325(5944):1134–8. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1175065>
 171. Wu Z, Niu T, Xiao W. Uev1A promotes breast cancer cell survival and chemoresistance through the AKT-FOXO1-BIM pathway. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2019;19(1):1–15. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1050-4>
 172. Niu T, Wu Z, Xiao W. Uev1A promotes breast cancer cell migration by up-regulating CT45A expression via the AKT pathway. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1–16.
 173. Syed NA, Andersen PL, Warrington RC, Xiao W. Uev1A, a ubiquitin conjugating enzyme variant, inhibits stress-induced apoptosis through NF- κ B activation. *Apoptosis*. 2006;11(12):2147–57.
 174. Wu Z, Shen S, Zhang Z, Zhang W, Xiao W. Erratum to: Ubiquitin-conjugating enzyme complex Uev1A-Ubc13 promotes breast cancer metastasis through nuclear factor- κ B mediated matrix metalloproteinase-1 gene regulation. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):41.
 175. Wu Z, Neufeld H, Torlakovic E, Xiao W. Uev1A-Ubc13 promotes colorectal cancer metastasis through regulating CXCL1 expression via NF- κ B activation. *Oncotarget*. 2018;9(22):15952–67.
 176. Shen T, Cai LD, Liu YH, Li S, Gan WJ, Li XM, i sur. Ube2v1-mediated ubiquitination and degradation of Sirt1 promotes metastasis of colorectal cancer by epigenetically suppressing autophagy. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1–16.

177. Dikshit A, Jin YJ, Degan S, Hwang J, Foster MW, Li C-Y, i sur. UBE2N Promotes Melanoma Growth via MEK/FRA1/SOX10 Signaling. *Cancer Res* [Internet]. 2018 Nov 15;78(22):6462–72. Dostupno na: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-18-1040>
178. Ren Z, Liu Z, Ma S, Yue J, Yang J, Wang R, i sur. Expression and clinical significance of UBE2V1 in cervical cancer. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 2021;28(7):101108. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101108>
179. Onyeisi JOS, Lopes CC, Götte M. Syndecan-4 as a pathogenesis factor and therapeutic target in cancer. *Biomolecules*. 2021;11(4):1–16.
180. Keller-Pinter A, Gyulai-Nagy S, Becsky D, Dux L, Rovo L. Syndecan-4 in tumor cell motility. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13):1–24.
181. Huang CP, Cheng CM, Su HL, Lin YW. Syndecan-4 Promotes Epithelial Tumor Cells Spreading and Regulates the Turnover of PKC α Activity under Mechanical Stimulation on the Elastomeric Substrates. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(4):1291–304.
182. Reyes I, Reyes N, Suriano R, Iacob C, Suslina N, Policastro A, i sur. Gene expression profiling identifies potential molecular markers of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biomarkers*. 2019;24(1):71–83.
183. Jin Y, Yang Y. Identification and analysis of genes associated with head and neck squamous cell carcinoma by integrated bioinformatics methods. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(8):1–8.
184. Armanious H, Adam B, Meunier D, Formenti K, Izevbaye I. Digital gene expression analysis might aid in the diagnosis of thyroid cancer. *Curr Oncol*. 2020;27(2):e93–9.
185. Wang X, Zhang Q, Cai Z, Dai Y, Mou L. Identification of novel diagnostic biomarkers for thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(67):111551–66.
186. Chen LL, Gao GX, Shen FX, Chen X, Gong XH, Wu WJ. SDC4 gene silencing favors human papillary thyroid carcinoma cell apoptosis and inhibits epithelial mesenchymal transition via wnt/ β -catenin pathway. *Mol Cells*. 2018;41(9):853–67.
187. Erdem M, Erdem S, Sanli O, Sak H, Kilicaslan I, Sahin F, i sur. Up-regulation of TGM2 with ITGB1 and SDC4 is important in the development and metastasis of renal

- cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2014;32(1):25.e13-25.e20. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.08.022>
188. Na KY, Bacchini P, Bertoni F, Kim YW, Park YK. Syndecan-4 and fibronectin in osteosarcoma. *Pathology*. 2012;44(4):325–30.
189. Wu Y, Wang T, Xia L, Zhang M. LncRNA WDFY3-AS2 promotes cisplatin resistance and the cancer stem cell in ovarian cancer by regulating hsa-miR-139-5p/SDC4 axis. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021;21(1):1–14. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01993-x>
190. Jechorek D, Haeusler-Pliske I, Meyer F, Roessner A. Diagnostic value of syndecan-4 protein expression in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2021;222:153431. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153431>
191. Onyeisi JOS, Pernambuco Filho PC de A, Mesquita AP de S, Azevedo LC de, Nader HB, Lopes CC. Effects of syndecan-4 gene silencing by micro RNA interference in anoikis resistant endothelial cells: Syndecan-4 silencing and anoikis resistance. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2020;128(September):105848. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105848>
192. Mytilinaiou M, Nikitovic D, Berdiaki A, Kostouras A, Papoutsidakis A, Tsatsakis AM, et al. Emerging roles of syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression. *IUBMB Life* [Internet]. 2017 Nov;69(11):824–33. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1678>
193. Essner J, Chen E, Ekker S. Syndecan-2. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2006 Feb;38(2):152–6. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135727250500258X>
194. Yu G, Yu W, Jin G, Xu D, Chen Y, Xia T, et al. PKM2 regulates neural invasion of and predicts poor prognosis for human hilar cholangiocarcinoma. *Mol Cancer* [Internet]. 2015;1–13. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-015-0462-6>
195. Loftus PG, Watson L, Deedigan LM, Camarillo-Retamosa E, Dwyer RM, O’Flynn L, et al. Targeting stromal cell Syndecan-2 reduces breast tumour growth, metastasis and limits immune evasion. *Int J Cancer* [Internet]. 2021 Mar 2;148(5):1245–59. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33383>

196. Baniwal SK, Khalid O, Gabet Y, Shah RR, Purcell DJ, Mav D, et al. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. *Mol Cancer* [Internet]. 2010;9(1):258. Dostupno na: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-9-258>
197. Popović A, Demirović A, Spajić B, Štimac G, Krušlin B, Tomas D. Expression and prognostic role of syndecan-2 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2010 Mar 29;13(1):78–82. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/pcan200943>
198. Luo Q, Wu X, Nan Y, Chang W, Zhao P, Zhang Y, i sur. TRIM32/USP11 Balances ARID1A Stability and the Oncogenic/Tumor-Suppressive Status of Squamous Cell Carcinoma. *CellReports* [Internet]. 2020;30(1):98-111.e5. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.017>
199. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, Pedersen IS, Madsen PH, Thorlacius-Ussing O. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: a systematic review. *Color Dis* [Internet]. 2016 Jun;18(6):549–61. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/codi.13336>
200. Han YD, Oh TJ, Chung T, Jang HW, Kim YN, An S, et al. Early detection of colorectal cancer based on presence of methylated syndecan-2 (SDC2) in stool DNA. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2019 Dec 15;11(1):51. Dostupno na: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0642-0>
201. Wang J, Liu S, Wang H, Zheng L, Zhou C, Li G, i sur. Robust performance of a novel stool DNA test of methylated. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2020;1–12. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00954-x>
202. Kim Y, Park H, Lim Y, Han I, Kwon HJ, Woods A, et al. Decreased syndecan-2 expression correlates with trichostatin-A induced-morphological changes and reduced tumorigenic activity in colon carcinoma cells. *Oncogene* [Internet]. 2003 Feb 13;22(6):826–30. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/1206068>
203. Tsoyi K, Osorio JC, Chu SG, Fernandez IE, De Frias SP, Sholl L, i sur. Lung Adenocarcinoma Syndecan-2 Potentiates Cell Invasiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2019 Jun;60(6):659–66. Dostupno na:

- <https://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2018-0118OC>
204. Zhang L, Wang Y, Li X, Wang Y, Wu K, Wu J i sur. Identification of a Recurrence Signature and Validation of Cell Infiltration Level of Thyroid Cancer Microenvironment. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2020 Jul 23;11(July):1–13. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.00467/full>
 205. Kamphuis W, Dijk F, van Soest S, Bergen AAB. Global gene expression profiling of ischemic preconditioning in the rat retina. *Mol Vis* [Internet]. 2007 Jun 28;13:1020–30. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653046>
 206. Tomi M, Tajima A, Tachikawa M, Hosoya K. Function of taurine transporter (Slc6a6/TauT) as a GABA transporting protein and its relevance to GABA transport in rat retinal capillary endothelial cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2008 Oct;1778(10):2138–42. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273608001454>
 207. Anderson CMH, Howard A, Walters JRF, Ganapathy V, Thwaites DT. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol* [Internet]. 2009 Feb 15;587(4):731–44. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2008.164228>
 208. Lötsch J, Hummel T, Warskulat U, Coste O, Häussinger D, Geisslinger G, i sur. Congenital taurine deficiency in mice is associated with reduced sensitivity to nociceptive chemical stimulation. *Neuroscience* [Internet]. 2014 Feb;259:63–70. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452213009846>
 209. Warskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, Zilles K, Haas H, Lang F, et al. Phenotype of the taurine transporter knockout mouse. *Methods Enzymol* [Internet]. 2007;428:439–58. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687907280255>
 210. Wang D, Du J, Ren C, Zhou M, Xia Z. Elevated SLC6A6 expression drives tumorigenesis and affects clinical outcomes in gastric cancer. *Biomark Med*. 2019;13(2):95–104.
 211. Gowrikumar S, Primeaux M, Pravoverov K, Wu C, Szeglin BC, Sauv  CEG, i sur. A claudin-based molecular signature identifies high-risk, chemoresistant colorectal

- cancer patients. *Cells*. 2021;10(9):1–23.
212. Xia YF, Pei GH, Wang N, Che YC, Yu FS, Yin FF, i sur. MiR-3156-3p is downregulated in HPV-positive cervical cancer and performs as a tumor-suppressive miRNA. *Virology*. 2017;14(1):1–13.
213. Janikowska G, Janikowski T, Pyka-Pajak A, Mazurek U, Janikowski M, Gonciarz M, i sur. Potential biomarkers for the early diagnosis of colorectal adenocarcinoma - Transcriptomic analysis of four clinical stages. *Cancer Biomarkers*. 2018;22(1):89–99.
214. Yasunaga M, Matsumura Y. Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer. *Sci Rep*. 2014;4:1–9.
215. Peng M, Yang D, Hou Y, Liu S, Zhao M, Qin Y, i sur. Intracellular citrate accumulation by oxidized ATM-mediated metabolism reprogramming via PFKFB3 and CS enhances hypoxic breast cancer cell invasion and metastasis. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019;10(3). Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1475-7>
216. Cai Z, Deng Y, Ye J, Zhuo Y, Liu Z, Liang Y, i sur. Aberrant expression of citrate synthase is linked to disease progression and clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Manag Res*. 2020;12:6149–63.
217. Chen L, Liu T, Zhou J, Wang Y, Wang X, Di W, i sur. Citrate synthase expression affects tumor phenotype and drug resistance in human ovarian carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(12):1–19.
218. Schlichtholz B, Turyn J, Goyke E, Biernacki M, Jaskiewicz K, Sledzinski Z, i sur. Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2005;30(2):99–104.
219. Teng H, Mao F, Liang J, Xue M, Wei W, Li X, i sur. Transcriptomic signature associated with carcinogenesis and aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Theranostics*. 2018;8(16):4345–58.
220. Griffith OL, Melck A, Jones SJM, Wiseman SM. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. *J Clin Oncol*. 2006;24(31):5043–51.
221. Vierlinger K, Mansfeld MH, Koperek O, Nöhammer C, Kaserer K, Leisch F. Identification of SERPINA1 as single marker for papillary thyroid carcinoma through

- microarray meta analysis and quantification of its discriminatory power in independent validation. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2011;4(1):30. Dostupno na: <http://www.biomedcentral.com/1755-8794/4/30>
222. Sarquis M, Moraes DC, Bastos-Rodrigues L, Azevedo PG, Ramos A V., Reis FV, i sur. Germline Mutations in Familial Papillary Thyroid Cancer. *Endocr Pathol.* 2020;31(1):14–20.
 223. Boccellino M, Pinto F, Ieluzzi V, Giovane A, Quagliuolo L, Fariello C, i sur. Proteomics analysis of human serum of patients with non-small-cell lung cancer reveals proteins as diagnostic biomarker candidates. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):23798–806.
 224. Jaberie H, Hosseini SV, Naghibalhossaini F. Evaluation of Alpha 1-Antitrypsin for the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(2):1165–73.
 225. Peltier J, Roperch JP, Audebert S, Borg JP, Camoin L. Quantitative proteomic analysis exploring progression of colorectal cancer: Modulation of the serpin family. *J Proteomics* [Internet]. 2016;148:139–48. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.031>
 226. Farshchian M, Kivisaari A, Ala-Aho R, Riihil P, Kallajoki M, Grénman R, i sur. Serpin peptidase inhibitor clade a member 1 (SerpinA1) is a novel biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* [Internet]. 2011;179(3):1110–9. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.012>
 227. Kwon CH, Park HJ, Choi JH, Lee JR, Kim HK, Jo H jae, i sur. Snail and serpinA1 promote tumor progression and predict prognosis in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015;6(24):20312–26.
 228. Janciauskiene S, Ercetin E, Richtmann S, Delgado BM, Gomez-Mariano G, Wrenger S, i sur. Clinical significance of serpinA1 gene and its encoded alpha1-antitrypsin protein in nscl. *Cancers (Basel).* 2019;11(9).
 229. Kwon CH, Park HJ, Lee JR, Kim HK, Jeon TY, Jo HJ, i sur. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 is a biomarker of poor prognosis in gastric cancer. *Br J Cancer.* 2014;111(10):1993–2002.
 230. Jiang L, George Hu L. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1-overexpression in

- gastric cancer promotes tumor progression in vitro and is associated with poor prognosis. *Oncol Lett.* 2020;20(6):1–12.
231. Normandin K, Péant B, Le Page C, De Ladurantaye M, Ouellet V, Tonin PN, i sur. Protease inhibitor SERPINA1 expression in epithelial ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2010;27(1):55–69.
 232. Yang J, Xiong X, Wang X, Guo B, He K, Huang C. Identification of peptide regions of SERPINA1 and ENOSF1 and their protein expression as potential serum biomarkers for gastric cancer. *Tumor Biol.* 2015;36(7):5109–18.
 233. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821–61.
 234. Li JY, Li CJ, Lin L Te, Tsui KH. Multi-Omics Analysis Identifying Key Biomarkers in Ovarian Cancer. *Cancer Control.* 2020;27(1):1–10.
 235. Huang X, Liu F, Jiang Z, Guan H, Jia Q. CREB1 suppresses transcription of microRNA-186 to promote growth, invasion and epithelial– mesenchymal transition of gastric cancer cells through the KRT8/HIF-1 α axis. *Cancer Manag Res.* 2020;12:9097–111.
 236. Zhuang C, Huang X, Yu J, Gui Y. Circular RNA hsa_circ_0075828 Promotes Bladder Cancer Cell Proliferation Through Activation of CREB1. *BMB Rep [Internet].* 2020 Feb 29;53(2):82–7. Dostupno na: <http://www.bmbreports.org/journal/view.html?doi=10.5483/BMBRep.2020.53.2.059>
 237. Guo L, Yin M, Wang Y. CREB1, a direct target of miR-122, promotes cell proliferation and invasion in bladder cancer. *Oncol Lett.* 2018;16(3):3842–8.
 238. Hu PC, Li K, Tian YH, Pan WT, Wang Y, Xu XL, i sur. Creb1/lin28/mir-638/vasp interactive network drives the development of breast cancer. *Int J Biol Sci.* 2019;15(12):2733–49.
 239. Chhabra A, Fernando H, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. *Oncol Rep [Internet].* 2007 Oct;18(4):953–8. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786359>
 240. Chen Z, Li JL, Lin S, Cao C, Gimbrone NT, Yang R, i sur. cAMP/CREB-regulated

- LINC00473 marks LKB1-inactivated lung cancer and mediates tumor growth. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2267–79.
241. Li Y, Zang H, Zhang X, Huang G. Circ_0136666 facilitates the progression of colorectal cancer via mir-383/creb1 axis. *Cancer Manag Res*. 2020;12:6795–806.
 242. Cheng Y, Wu J, Qin B, Zou B, Wang Y, Li Y. CREB1-induced lncRNA LEF1-AS1 contributes to colorectal cancer progression via the miR-489/DIAPH1 axis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020;526(3):678–84. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.153>
 243. Chen R, Zhou S, Chen J, Lin S, Ye F, Jiang P. Lncrna blcat1/mir-519d-3p/creb1 axis mediates proliferation, apoptosis, migration, invasion, and drug-resistance in colorectal cancer progression. *Cancer Manag Res*. 2020;12:13137–48.
 244. Han J, Jiang Q, Ma R, Zhang H, Tong D, Tang K, i sur. Norepinephrine-CREB1-miR-373 axis promotes progression of colon cancer. *Mol Oncol*. 2020;14(5):1059–73.
 245. Yan L, You WQ, Sheng NQ, Gong JF, Hu LD, Tan GW, i sur. A CREB1/miR-433 reciprocal feedback loop modulates proliferation and metastasis in colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(12):3774–93.
 246. Wang S, Wang X, Li J, Meng S, Liang Z, Xu X, i sur. c-Met, CREB1 and EGFR are involved in miR-493-5p inhibition of EMT via AKT/GSK-3 β /Snail signaling in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(47):82303–13.
 247. Watson MJ, Berger PL, Banerjee K, Frank SB, Tang L, Ganguly SS, i sur. Aberrant CREB1 activation in prostate cancer disrupts normal prostate luminal cell differentiation. *Oncogene* [Internet]. 2021;40(18):3260–72. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-021-01772-y>
 248. Su B, Xiang B, Wang L, Cao L, Xiao L, Li X, i sur. Profiling and comparing transcription factors activated in non-metastatic and metastatic nasopharyngeal carcinoma cells. *J Cell Biochem*. 2010;109(1):173–83.
 249. Tong L, Wang Y, Ao Y, Sun X. CREB1 induced lncRNA HAS2-AS1 promotes epithelial ovarian cancer proliferation and invasion via the miR-466/RUNX2 axis. *Biomed Pharmacother*. 2019;115(April):0–6.
 250. Liu H, Du F, Sun L, Wu Q, Wu J, Tong M, i sur. GATA6 suppresses migration and

- metastasis by regulating the miR-520b/CREB1 axis in gastric cancer. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019;10(2). Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-1270-x>
251. Chen P, Li M, Hao Q, Zhao X, Hu T. Targeting the overexpressed CREB inhibits esophageal squamous cell carcinoma cell growth. *Oncol Rep*. 2018;39(3):1369–77.
 252. Yang Q, Yu W, Han X. Overexpression of microRNA-101 causes anti-tumor effects by targeting CREB1 in colon cancer. *Mol Med Rep*. 2019;19(4):3159–67.
 253. Liu Y, Lang T, Jin B, Chen F, Zhang Y, Beuerman RW, i sur. Luteolin inhibits colorectal cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition by suppressing CREB1 expression revealed by comparative proteomics study. *J Proteomics* [Internet]. 2017;161(222):1–10. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.005>
 254. Yao W, Wang Y, Lu J, Guo L, Qi B, Chen Z. MicroRNA-506 inhibits esophageal cancer cell proliferation via targeting CREB1. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2015;8(9):10868–74. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617801>
 255. Luise C, Merolla F, Leone V, Paladino S, Sarnataro D, Fusco A, i sur. Identification of Sumoylation Sites in CCDC6, the First Identified RET Partner Gene in Papillary Thyroid Carcinoma, Uncovers a Mode of Regulating CCDC6 Function on CREB1 Transcriptional Activity. *PLoS One*. 2012;7(11).
 256. Castellone MD, De Falco V, Rao DM, Bellelli R, Muthu M, Basolo F, i sur. The β -Catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/Papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation. *Cancer Res*. 2009;69(5):1867–76.
 257. Leone V, Langella C, Esposito F, Arra C, Palma G, Rea D, i sur. Ccdc6 knock-in mice develop thyroid hyperplasia associated to an enhanced CREB1 activity. *Oncotarget*. 2015;6(17):15628–38.
 258. ATF1 activating transcription factor 1 [Internet]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=466>
 260. Huang G, Liao D, Chen H, Lu Y, Chen L, Li H, i sur. The protein level and transcription activity of activating transcription factor 1 is regulated by prolyl isomerase Pin1 in nasopharyngeal carcinoma progression. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016;7(12):e2571-11. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.349>

261. Belkhiri A, Dar AA, Zaika A, Kelley M, El-Rifai W. t-Darpp Promotes Cancer Cell Survival by Up-regulation of Bcl2 through Akt-Dependent Mechanism. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Jan 15;68(2):395–403. Dostupno na: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/2/395/541370/t-Darpp-Promotes-Cancer-Cell-Survival-by-Up>
262. Adisheshaiah P, Peddakama S, Zhang Q, Kalvakolanu D V, Reddy SP. Mitogen regulated induction of FRA-1 proto-oncogene is controlled by the transcription factors binding to both serum and TPA response elements. 2005;(April):4193–205.
263. Zhao X, Weng W, Long Y, Pan W, Li Z, Sun F. LINC00665/miR-9-5p/ATF1 is a novel axis involved in the progression of colorectal cancer. *Hum Cell* [Internet]. 2020;33(4):1142–54. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00393-z>
264. Tian J, Chang J, Gong J, Lou J, Fu M, Li J, i sur. Systematic Functional Interrogation of Genes in GWAS Loci Identified ATF1 as a Key Driver in Colorectal Cancer Modulated by a Promoter-Enhancer Interaction. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2019;105(1):29–47. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.05.004>
265. Huang GL, Guo HQ, Yang F, Liu OF, Li B Bin, Liu XY, i sur. Activating transcription factor 1 is a prognostic marker of colorectal cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2012;13(3):1053–7.
266. Yue M, Yun Z, Li S, Yan G, Kang Z. NEDD4 triggers FOXA1 ubiquitination and promotes colon cancer progression under microRNA-340-5p suppression and ATF1 upregulation. *RNA Biol* [Internet]. 2021;18(11):1981–95. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1885232>
267. Cui X, Chen J, Zheng Y, Shen H. Circ_0000745 Promotes the Progression of Cervical Cancer by Regulating miR-409-3p/ATF1 Axis. *Cancer Biother Radiopharm*. 2020;00(00):1–13.
268. Shi Y, Wang W, Yang B, Tian H. ATF1 and RAS in exosomes are potential clinical diagnostic markers for cervical cancer. *Cell Biochem Funct*. 2017;35(7):477–83.
269. Xu Y, Zhou W, Zhang C, Liu X, Lv J, Li X, i sur. Long non-coding RNA RP11-552M11.4 favors tumorigenesis and development of cervical cancer via modulating miR-3941/ATF1 signaling. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;130:24–33. Dostupno na:

na: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.083>

270. Yang G, Yang C, She Y, Shen Z, Gao P. LINC01354 enhances the proliferation and invasion of lung cancer cells by regulating miR-340-5p/ATF1 signaling pathway. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Internet]. 2019;47(1):3737–44. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1667816>
271. Cui J, Yin Z, Liu G, Chen X, Gao X, Lu H, i sur. Activating transcription factor 1 promoted migration and invasion in lung cancer cells through regulating EGFR and MMP-2. *Mol Carcinog* [Internet]. 2019;58(10):1919–24. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1002/mc.23086>
272. Hao Q, Zhao X, Zhang Y, Dong Z, Hu T, Chen P. Targeting Overexpressed Activating Transcription Factor 1 (ATF1) Inhibits Proliferation and Migration and Enhances Sensitivity to Paclitaxel In Esophageal Cancer Cells. *Med Sci Monit Basic Res*. 2017;23:304–12.
273. Ghoneim C, Soula-Rothhut M, Blanchevoye C, Martiny L, Antonicelli F, Rothhut B. Activating transcription factor-1-mediated hepatocyte growth factor-induced down-regulation of thrombospondin-1 expression leads to thyroid cancer cell invasion. *J Biol Chem*. 2007;282(21):15490–7.
274. Choong PFM, Nadesapillai APW. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;(415):46–58.
275. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, i sur. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost*. 2005;(93):676–81.
276. Sudol M. From Rous sarcoma virus to plasminogen activator, src oncogene and cancer management. *Oncogene* [Internet]. 2011;30(27):3003–10. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.38>
277. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, i sur. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* [Internet]. 2000 Feb 1;60(3):636–43. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676647>
278. Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, et al. Progression-

- Specific Genes Identified by Expression Profiling of Matched Ductal Carcinomas In situ and Invasive Breast Tumors, Combining Laser Capture Microdissection and Oligonucleotide Microarray Analysis. *Cancer Res* [Internet]. 2006 May 15;66(10):5278–86. Dostupno na: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/66/10/5278/525813/Progression-Specific-Genes-Identified-by>
279. Wang Y, Zhu M, Li J, Xiong Y, Wang J, Jing H, i sur. Overexpression of PSMC2 promotes the tumorigenesis and development of human breast cancer via regulating plasminogen activator urokinase (PLAU). *Cell Death Dis* [Internet]. 2021;12(7):1–11. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-021-03960-w>
280. Harbeck N, Kates R, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* [Internet]. 2004 Dec 5;91(03):450–6. Dostupno na: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH03-12-0798>
281. Shariat SF, Roehrborn CG, McConnell JD, Park S, Alam N, Wheeler TM, i sur. Association of the Circulating Levels of the Urokinase System of Plasminogen Activation With the Presence of Prostate Cancer and Invasion, Progression, and Metastasis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Feb 1;25(4):349–55. Dostupno na: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2006.05.6853>
282. Kumano M, Miyake H, Muramaki M, Furukawa J, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of urokinase-type plasminogen activator system in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2009 Mar;27(2):180–6. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078143908000148>
283. Yang JL, Seetoo D q, Wang Y, Ranson M, Berney CR, Ham JM, i sur. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets. *Int J cancer* [Internet]. 2000 Sep 20;89(5):431–9. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11008205>
284. Riisbro R, Christensen IJ, Nielsen HJ, Brüner N, Nilbert M, Fernebro E. Preoperative

- plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor as a prognostic marker in rectal cancer patients. An EORTC-Receptor and Biomarker Group collaboration. *Int J Biol Markers* [Internet]. 20(2):93–102. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011039>
285. Herszényi L, Farinati F, Cardin R, István G, Molnár LD, Hritz I, i sur. Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2008 Dec 10;8(1):194. Dostupno na: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-8-194>
 286. Li Z, Chen C, Wang J, Wei M, Liu G, Qin Y, i sur. Overexpressed PLA1 and its potential prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *PeerJ*. 2021;9:1–19.
 287. Zhao XT, Zhu Y, Zhou JF, Gao YJ, Liu FZ. Development of a novel 7 immune-related genes prognostic model for oral cancer: A study based on TCGA database. *Oral Oncol* [Internet]. 2021;112(November 2020):105088. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.105088>
 288. Yang K, Zhang S, Zhang D, Tao Q, Zhang T, Liu G, i sur. Identification of SERPINE1, PLA1 and ACTA1 as biomarkers of head and neck squamous cell carcinoma based on integrated bioinformatics analysis. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2019;24(9):1030–41. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01435-9>
 289. Huo Z, Li X, Zhou J, Fan Y, Wang Z, Zhang Z. Hypomethylation and downregulation of miR-23b-3p are associated with upregulated PLA1: a diagnostic and prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021;21(1):1–13. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02251-w>
 290. Chen G, Sun J, Xie M, Yu S, Tang Q, Chen L. PLA1 Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Genet*. 2021;12(May):1–14.
 291. Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Feb 12;8(February). Dostupno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00024/full>

11. ŽIVOTOPIS

Rođen 18. kolovoza 1990. u Zagrebu.

Završio V. gimnaziju u Zagrebu 2009. godine.

Upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2009./2010., završio studij u akademskoj godini 2014./2015. s prosječnom ocjenom 4,34.

Specijalizaciju iz otorinolaringologije u Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata pri Kliničkom bolničkom centru „Sestre milosrdnice“ započeo u siječnju 2017. godine, a završio u svibnju 2022. godine.

Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao u akademskoj godini 2017./2018.

Oženjen, otac dvoje djece.