

# Imunohistokemijska izraženost estrogenskih receptora beta u papilarnom karcinomu štitnjače

---

**Bobuš Kelčec, Iva**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:547701>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



*Repository / Repozitorij:*

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





**Središnja medicinska knjižnica**

**Bobuš Kelčec, Iva (2017) *Imunohistokemijska izraženost estrogenskih receptora beta u papilarnom karcinomu štitnjače [Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in papillary thyroid carcinoma].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/3076>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Iva Bobuš Kelčec**

**Imunohistokemijska izraženost  
estrogenskih receptora beta u  
papilarnom karcinomu štitnjače**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2018.**

Disertacija je izrađena na Odjelu za onkološku patologiju i kliničku citologiju-  
lokacija Ilica, Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ – KBC „Sestre  
milosrdnice“ Zagreb

Voditelj rada: prof. dr. sc. Božena Šarčević

Ovaj rad je posvećen mojoj obitelji. Hvala vam na svemu!

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ANATOMSKA, EMBRIOLOŠKA I HISTOLOŠKA OBILJEŽJA ŠTITNJAČE .....	1
1.2. FUNKCIJA ŠTITNJAČE .....	2
1.3. UTJECAJ HORMONA ŠTITNJAČE NA ORGANSKE SUSTAVE.....	3
1.4. ULOGA ESTROGENA U FUNKCIJI I RASTU ŠTITNJAČE .....	4
1.5. LEZIJE ŠTITNJAČE.....	5
1.5.1. UPALE .....	5
1.5.1.1. Kronična limfocitna upala (Hashimotov tireoiditis).....	6
1.5.1.2. Riedlov tireoiditis .....	7
1.5.2. HIPERPLAZIJE I NODOZNE STRUME .....	7
1.6. KLASIFIKACIJA TUMORA ŠTITNJAČE PREMA SVJETSKOJ ZDRAVSTVENOJ ORGANIZACIJI (SZO) IZ 2014. GODINE .....	9
1.6.1. ADENOMI ŠTITNJAČE .....	10
1.6.2. PAPILARNI KARCINOM ŠTITNJAČE.....	11
1.6.2.1. Epidemiologija i incidencija papilarnog karcinoma.....	11
1.6.2.2. Etiološki čimbenici u nastanku papilarnog karcinoma.....	11
1.6.2.3. Genetske promjene u papilarnom karcinomu.....	13
1.6.2.4. Lokalizacija i klinički simptomi papilarnog karcinoma.....	15
1.6.2.5. Histopatologija i imunohistokemijska obilježja papilarnog karcinoma .....	16
1.6.2.6. Podtipovi papilarnog karcinoma.....	17
1.6.2.7. Liječenje papilarnog karcinoma .....	19
1.6.2.8. Prognoza papilarnog karcinoma .....	20
1.6.2.9. Papilarni mikrokarcinom .....	22
1.7. ESTROGENI I KARCINOM ŠTITNJAČE .....	25

1.8. HORMONI U ETIOLOGIJI KARCINOMA .....	27
1.9. ESTROGENSKI RECEPTORI - MEHANIZAM DJELOVANJA.....	30
1.10. ESTROGENSKI RECEPTORI (ER) BETA .....	33
1.10.1. Struktura ER beta .....	33
1.10.2. Prisutnost ER beta u normalnim i neoplastičnim tkivima .....	33
2. HIPOTEZA.....	37
3. CILJEVI RADA .....	38
4. MATERIJALI I METODE.....	39
5. REZULTATI .....	41
6. RASPRAVA.....	70
7. ZAKLJUČCI .....	80
8. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU .....	81
9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU .....	82
10. POPIS LITERATURE.....	83
11. ŽIVOTOPIS .....	100

## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

AF – prema eng. activation function

AJCC – Američko društvo za rak (eng. American Joint Committee on Cancer)

AMP – adenzin monofosfat

ARNT – prema eng. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

BERKo – prema eng. beta estrogen receptor knockout mice

BRAF- eng. B-raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

CK – citokeratin

COMT – katehol-0-metiltransferaza

CRP – C- reaktivni protein

CYP 17 – citokrom P450 17 alfa hidroksilaza /17,20 liaza

DBD – DNK vezujuća domena

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

DPN – diatrilpropionitril

E2 – estradiol

EGF – epidermalni faktor rasta

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta

EORTC – Europska organizacija za istraživanje i liječenje karcinoma

ER – estrogenski receptor

ERE – prema eng. estrogen response elements

FTRL-5 – kultura folikularnih stanica štitnjače

HBME 1 – Hector Battifora mesothelial-1

HIF – hipoksijom inducirani čimbenik

HSD 17 B1 – hidroksisteroid 17-beta dehidrogenaza 1

IGF-1 – prema eng. insulin- like growth factor

IHC – imunohistokemija

LBD – ligand-vezujuća domena

MNG – multinodozna struma

NTD – N-terminalna domena

NTRK 1 - prema eng. Neurotrophic tyrosine kinase, receptor type

PAX/PPAR – prema eng. paired box gene 8/ peroxisome proliferator-activator protein

PEO14 – stanična linija karcinoma jajnika

PMC – papilarni mikrokarcinom

PTC – papilarni karcinom

RET – ret protoonkogen

RNK – ribonukleinska kiselina

SE – sedimentacija

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

T3 – trijodtironin

T4 – tetrajodtironin ili tiroksin

TBG- tiroksin vezujući globulin

TG – tireoglobulin

TG-AT – antitireoglobulinska antitijela

TNM – T-tumor- N-čvor- M -metastaza

TPO – tiroid - peroksidaza

TRE – prema eng. thyroid response element

TREG – regulatorni limfociti T

TRH – prema eng. thyroid releasing hormone

TSH – tiroid stimulirajući hormon

TTF-1 – prema eng. thyroid transcription factor 1

UICC – Međunarodna unija za borbu protiv raka



# 1. UVOD

## 1.1. ANATOMSKA, EMBRIOLOŠKA I HISTOLOŠKA OBILJEŽJA ŠTITNJAČE

Štitnjača je endokrini žlijezda smještena na vratu. Sastoji se od desnog i lijevog režnja koji su povezani tankim mostom (istmusom) lokaliziranim ispod i ispred larinksa. U odrasle osobe teži od 15 do 25 grama. Opskrba krvlju odvija se putem gornje i donje tireoidne arterije, a inervacija potječe iz cervikalnog simpatičkog ganglija. Režnjevi štitnjače se fibroznim septama dijele na male režnjiće ili folikule obložene epitelom i ispunjene koloidom (1). Epitelne stanice koje oblažu folikule dijele se na glavne i na parafolikularne ili C stanice (2). Glavne stanice mogu poprimiti kubični ili cilindrični izgled, koji ovisi o funkcionalnom stanju štitnjače. Koloid, koji ispunjava lumen folikula, građen je od mukoproteina, proteolitičkih enzima i tireoglobulina a sintetiziraju ga glavne stanice. Štitnjača time predstavlja jedinu endokrinu žlijezdu u kojoj se njen sekretorni produkt, tj. koloid, nalazi pohranjen ekstracelularno. Parafolikularne ili C stanice su smještene između folikularnih stanica te leže neposredno vezane uz bazalnu membranu (2). Čine otprilike 0,1% ukupne mase tkiva štitnjače (3).

Štitnjača se embriološki razvija iz evaginacije faringealnog epitela koji se kao dio tireoglosalnog duktusa spušta od foramena cekuma na bazi jezika do svoje normalne pozicije na prednjem dijelu vrata. Moguće je stoga prisustvo ektopičnog tkiva štitnjače u tom dijelu, najčešće u bazi jezika (jezična štitnjača), ili na drugim mjestima visoko na vratu. Normalne strukturne varijacije obuhvaćaju prisustvo tzv. piramidnog režnja koji predstavlja ostatak tireoglosalnog duktusa iznad istmusa (1). Poznavanje anatomskih varijacija važno je radi razlikovanja od metastaza karcinoma štitnjače, no i unutar ektopičnog tkiva, doduše rijetko, može doći do razvoja malignih tumora.

## 1.2. FUNKCIJA ŠTITNJAČE

Folikularne ili glavne stanice imaju svojstvo preuzimanja i koncentracije joda iz cirkulacije, te proizvodnje tireoglobulina. Tironini i tireoglobulin pohranjuju se u lumenu folikula, dok ne nastane potreba za njima. Tironini - trijod tironin (T3) i tetrajod tironin (T4) predstavljaju jedine hormonski aktivne oblike (2). Pri potrebi organizma za hormonima štitnjače, kapljice koloida se sekvstriraju iz lumena i ulaze endocitozom u citoplazmu folikularnih stanica gdje dolazi do pretvorbe tireoglobulina u T4 i T3. Oni se zatim otpuštaju u sistemsku cirkulaciju gdje su većinom reverzibilno vezani za cirkulirajuće proteine plazme, npr. tiroksin vezujući globulin (TBG) i transretinin. Proteini plazme omogućavaju transport hormona u periferna tkiva koji se od njih oslobađaju samo u odgovoru na metaboličke zahtjeve organizma, sprečavajući time prebrzu fluktuaciju razina hormona (1, 2, 4).

Aktivnost štitnjače regulirana je putem tireotropina (TSH). TSH je po sastavu glikoprotein a proizvode ga tireotropne stanice u prednjem režnju hipofize kao odgovor na stimulaciju hipotalamičkim tripeptidom (TRH) (2, 4). U odgovoru na trofičke čimbenike iz hipotalamusa, TSH se otpušta u cirkulaciju gdje se veže na svoje receptore u folikularnom epitelu štitnjače. Vezanje TSH dovodi do strukturne promjene receptora te povezivanja sa stimulacijskim G-proteinom. Aktivacija G proteina dovodi do povećanja intracelularnih razina adenozin monofosfata, koji stimulira rast štitnjače i sintezu hormona te otpuštanje kinaza. Disocijacija sinteze hormona i otpuštanje od kontroliranog utjecaja TSH-signalnih puteva rezultira autonomnom funkcijom štitnjače (1).

Interakcija hormona štitnjače sa svojim jezgrinim receptorom rezultira formiranjem multiproteinskog receptor-hormonskog kompleksa koji se veže za TRE (prema eng. thyroid response element) u ciljnim genima, i time regulira njihovu transkripciju (1).

U primarnoj hipertireozii, pri visokim koncentracijama T3 i T4 u plazmi, sekrecija TSH je suprimirana, dok je u hipotireozii razina TSH visoka a razine T3 i T4 niske.

Lučenje TSH u hipofizi je vrlo osjetljivo na promjene u razinama T3 i T4, pa postoji i stanje tzv. subkličičke hipotireoze u kojem je razina TSH povišena, dok su vrijednosti T3 i T4 normalne (4).

Parafolikularne ili C stanice luče kalcitonin, polipeptidni hormon koji regulira razinu kalcija u krvi. Kalcitonin snižava razinu kalcija djelujući na osteocite i osteoklaste koji suprimiraju resorpciju kalcija iz kosti, te njegovo otpuštanje u krv. Kalcitonin ima učinke suprotne od paratiroidnog hormona, a sudjeluje i u kontroli njegove aktivnosti. Na taj način pridonosi regulaciji gornjih razina koncentracije kalcija u krvi (2).

### **1.3. UTJECAJ HORMONA ŠTITNJAČE NA ORGANSKE SUSTAVE**

Hormoni štitnjače, kao i poremećaj u njenom radu utječu na metabolizam brojnih organskih sustava, npr. srčano-žilnog i središnjeg živčanog sustava (5).

U hipertireozi je kao rezultat hipermetabolizma povećana srčana eejkcija, udarni volumen i frekvencija srca, te potreba perifernih organa za kisikom. U hipotireozi su srčana eejkcija, frekvencija srca, te minutni volumen i protok krvi kroz tkiva smanjeni (4,5).

U hipertireozi je smanjen vitalni kapacitet pluća te je moguća zaduha, dok u hipotireozi susrećemo pojavu pleuralnog izljeva. Slabost dišnih mišića i dijelom depresije centra za disanje dovode do alveolarne hipoventilacije i retencije ugljičnog dioksida.

U hipertireozi je povećana potreba za oksigenacijom tkiva, povećava se ukupna masa eritrocita i volumen plazme, a blago se smanjuje hematokrit i hemoglobin. U hipotireozi je smanjena ukupna masa eritrocita te je kod nekih pacijenata prisutna normocitna normokromna anemija.

U hipertireozi je kod odraslih povišena srednja vrijednost hormona rasta u 24-satnom izlučivanju, povišena je razina luterotropnog hormona, folikul stimulirajućeg hormona, te estrogena. Česte su oligomenoreja, amenoreja, a kod muškaraca su prisutni gubitak libida i ginekomastija. U hipotireozi je lučenje hormona rasta smanjeno, te je snižen ukupni metabolizam, a bolesnice imaju obilnije menstruacije (5).

#### 1.4. ULOGA ESTROGENA U FUNKCIJI I RASTU ŠTITNJAČE

Abdel-Dayem i sur. (6) su proučavali utjecaj terapije estrogenima na funkciju i histološki izgled štitnjače kod ovariektomiranih štakora. Nalazi nakon dodavanja estrogena pokazivali su sniženu razinu T3 i T4, dok je razina TSH porasla. Također je došlo do stanjenja folikularnog epitela, te pojave fibroze između folikula. Dakle, niže razine estrogena mogu voditi ka hipofunkciji, dok estrogenska nadomjesna terapija može rezultirati hiperfunkcijom štitnjače.

Estrogeni pokazuju i indirektni učinak na funkciju štitnjače putem podizanja razine TBG. Terapija gonadotropinima također utječe na testove funkcije štitnjače kao i na vezujuće proteine spolnih hormona. U žena koje su dobivale gonadotropine povećala se razina estradiola (E2), stimulirana je sinteza TBG u jetri, što je rezultiralo povećanom koncentracijom T4 u serumu. Kako se razina TSH nije promjenila i dalje je bilo prisutno stanje eutiroze (7).

Arafah i sur. (8) zaključuju da kod žena u hipotireozu koje primaju estrogene i tiroksin, estrogen povećava potrebu za tiroksinom. Kod tih žena su promjene u razinama slobodnog tiroksina u serumu bile male ali potencijalno klinički važne u odnosu na skupinu eutireotičnih žena. Zahtjevi za jodom su veći i u trudnoći, a povećana razina estrogena u žena može imati direktan ili indirektan učinak na rast stanica štitnjače ili njihovu funkciju (9).

Furlanetto i sur. (9) su ispitivali izravni učinak estrogena na rast epitela štitnjače te prisustvo estrogenskih receptora (ER) alfa u staničnoj kulturi FTRL-5. Došli su do zaključka da se dodavanjem estrogena povećava stanični rast bez obzira na koncentraciju TSH, te da su antagonisti ER u potpunosti inhibirali taj efekt. To zapravo znači da se taj proces odvija neovisno o TSH, no mehanizam kojim se stimulira rast stanica na celularnoj razini nije poznat.

## 1.5. LEZIJE ŠTITNJAČE

### 1.5.1. UPALE

Upale štitnjače ili tireoiditis obuhvaćaju širok raspon promjena uzrokovanih različitim čimbenicima kao što su infekcija, autoimuni procesi ili zračenje.

Akutna upala je rijetka, obzirom na relativnu otpornost tkiva štitnjače na upalu unatoč obilnoj limfovaskularnoj mreži. Smatra se da čahura štiti štitnjaču od direktnog širenja mikroorganizama iz okolnih struktura, a razina koncentracije joda ne pogoduje njihovom razmnožavanju. No upravo su komunikacija između ždrijela i štitnjače putem fistula te hematogeno širenje najčešći uzroci upale. Od uzročnika su najzastupljeniji stafilokoki, streptokoki i anaerobi, a rjeđe zastupljeni su gljivice i *Pneumocystis carinii*. Bolest počinje naglo s bolnošću i oteklinom štitnjače. U laboratorijskim nalazima povišena je sedimentacija (SE), leukociti i C-reaktivni protein (CRP), a u citološkim razmazima nalaze se infiltrati neutrofilnih granulocita te ponekad i žarišta nekroze (5).

Subakutna upala / granulomatozni ili De Quervainov tireoiditis je vrsta granulomatozne upale. Uzrok nije poznat, no najčešće ga vidamo u mlađih žena nakon preboljelih virusnih infekcija respiratornog trakta. Prezentira se bolnim uvećanjem štitnjače, a histološki se nalazi destrukcija folikularnog epitela s granulomatoznom reakcijom na koloid, uz prisustvo različito gustog limfocitnog infiltrata te fibroze (10). Patohistološki nalazi subakutnog tireoiditisa viđaju se relativno rijetko, jer u većini slučajeva nije indikacija za operativni zahvat. Dijagnoza se postavlja prvenstveno na temelju kliničke slike, ultrazvučnog i citološkog nalaza koji pokazuje prisustvo multinuklearnih orijaških stanica tipa stranog tijela, histiocite, limfocite, epiteloidne stanice, fibrocite i fibroblaste (11). Laboratorijski nalazi uključuju povišen CRP i SE, normalne ili lagano povišene leukocite. Kasnije se može javiti prolazna hipotireoza. Scintigrafija pokazuje “prazan” nalaz (5).

#### 1.5.1.1. Kronična limfocitna upala (Hashimotov tireoiditis)

Ovo je najčešći oblik kroničnog autoimunog tireoiditisa od kojeg pretežno obolijevaju žene između 30 i 50 godina, te ga se smatra uzrokom pojave više od 60% guša (5). Odnos žena i muškaraca doseže i do 10:1 (12). U žena je pojava učestalija u postporođajnom periodu, te općenito u područjima s većom konzumacijom joda u prehrani (13). Uzrok nije poznat, no smatra se da kompleksna interakcija genetskih i negenetskih čimbenika rezultira poremećenom prezentacijom tiroidnog antigena te smanjenom imunološkom tolerancijom (13). Dolazi do stvaranja patološkog klona pomoćničkih limfocita T, koji potiču stvaranje antitijela putem razvoja limfocita B i određenog tipa plazma stanica (5). U razvoj bolesti uključeni su brojni geni, no, specifični gen povezan s Hashimotom je gen za tireoglobulin (TG). Budući da upale štitnjače nisu indikacija za kirurški zahvat, metoda izbora za dijagnosticiranje i praćenje tijeka upale je citološka punkcija (11). U razmazima punktata se nalaze brojne limfatične stanice, stanice germinativnog centra, histiociti, centroblasti i plazma stanice. Prisutne su i nakupine onkocitnih stanica i tireocita sa reaktivnim promjenama (11).

Histološki je štitnjača infiltrirana limfocitima s germinativnim centrima, a prisutni su i limfoblasti te onkocitne stanice. Dijagnostika obuhvaća određivanje T3, T4, TSH i antitijela na tiroidnu peroksidazu (TPO) i tireoglobulin (TG) koja su pozitivna u 95% bolesnika (5).

Jedna od teorija dominacije žena što se tiče autoimunih poremećaja štitnjače bi mogla biti povezana s X kromosomom koji sadrži brojne spolne i imuno-vezane gene koji su od ključne važnosti za zadržavanje imunotolerancije. Stoga bi povećana imunoreaktivnost mogla biti povezana sa genetskim oštećenjima na X kromosomu (13). Tijekom trudnoće događa se imunotolerancija radi toleriranja fetalnog semi-alografta, a što je rezultat hormonskih promjena i trofoblastne ekspresije. Vrlo važnu ulogu u tom procesu imaju regulatorni limfociti T (TREG). Njihova se razina nakon poroda rapidno smanjuje, što može dovesti do pogoršanja autoimunih bolesti. Također povećano uzimanje joda može rezultirati povećanom razinom anti-TPO, pa je tako prevalencija antitijela u populaciji s deficijencijom joda 13% dok je u onih s previše joda 25% (13).

Kod žena oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa (HT), rizik za papilarni karcinom veći je za 30% (14).

#### 1.5.1.2. Riedelov tireoiditis

Radi se o rijetkoj bolesti u odraslih i starijih osoba. Štitnjača je povećana i bolna, a javlja se i otežano disanje. Žlijezda je čvrsta i tvrda na opip, te prirasla uz okolne strukture. Klinička slika upućuje na dijagnozu, no obzirom da diferencijalno dijagnostički u obzir dolazi i karcinom, potrebno ga je isključiti citološkom punkcijom koja obično rezultira oskudnim materijalom s rijetkim limfocitima, fibrocitima i fibroblastima te degenerativno promijenjenim tireocitima (1,5).

#### 1.5.2. HIPERPLAZIJE I NODOZNE STRUME

Najčešća manifestacija bolesti štitnjače je povećanje ili struma. Struma je odraz poremećene sinteze hormona štitnjače koja je najčešće uzrokovana nedostatkom joda. Poremećena sinteza hormona zatim dovodi do kompenzatornog rasta TSH, a što u konačnici uzrokuje hipertrofiju i hiperplaziju folikularnog epitela štitnjače. Kompenzatorno povećanje omogućuje stanje eutireoze u većine bolesnika, no ako kompenzatorni mehanizmi nisu dovoljno snažni, dolazi do hipotireoze. Povećanje štitnjače proporcionalno je duljini trajanja hormonske deficijencije (1).

Difuzna ili jednostavna struma difuzno zauzima cijelu štitnjaču bez stvaranja čvorova, a može biti sporadična ili endemska. Endemska struma javlja se u područjima s manjkom joda, dok se sporadična javlja manje učestalo (1,5). Kod sporadične strume postoji jasna ženska predominacija, te vrhunac incidencije u pubertetu i mlađoj odrasloj dobi. Etiologija nije do kraja poznata. Pacijenti su obično eutireotični, s blagim porastom TSH (1). Rekurentne epizode hiperplazije i involucije uzrokuju nepravilno povećanje ili multinodoznu strumu. Skoro sve perzistirajuće strume prerastu u multinodozne, koje se klinički mogu zamijeniti s malignitetom. Makroskopski su multilobulirane i asimetrično povećane, te mogu doseći masu od 2000 grama. Najčešće su eutiroidne, no manjina se prezentira i hiperfunkcionalnim čvorovima koji rezultiraju hipertireozom (1).

U posljednje se vrijeme pokazalo da u ovih pacijenata postoji povećan rizik za nastanak karcinoma. U studiji Gandolfija i sur. (15) gdje je analizirana incidencija karcinoma kod bolesnika operiranih zbog strume, utvrđeno je prisustvo karcinoma kod 13,7% bolesnika u definitivnoj patohistološkoj dijagnozi. Smatra se da multinodozna struma donosi povećani rizik u odnosu na jedan čvor. Pedamallu i sur.(16) navode da se incidencija okultnog karcinoma kreće od 4 do 17% u literaturi, dok je u njihovoj studiji najčešći bio papilarni karcinom s učestalošću od 10,2%. Preživljenje je bilo nešto niže kod onih s okultnim i malim papilarnim karcinomima nego u normalnoj populaciji.



## 1.6. KLASIFIKACIJA TUMORA ŠTITNJAČE PREMA SVJETSKOJ ZDRAVSTVENOJ ORGANIZACIJI (SZO) IZ 2014. GODINE

### 1.KARCINOMI

Papilarni karcinom,  
Folikularni karcinom,  
Slabo diferencirani karcinom,  
Nediferencirani (anaplastični) karcinom,  
Pločasti karcinom,  
Mukoepidermoidni karcinom,  
Skleroizirajući mukoepidermoidni karcinom s eozinofilijom,  
Mucinozni karcinom,  
Medularni karcinom,  
Miješani medularni i folikularni karcinom,  
Tumor vretenastih stanica sa timus-like diferencijacijom

### 2.ADENOMI ŠTITNJAČE I VEZANI TUMORI

Folikularni adenom i hijalinizirajući trabekularni tumor

### 3.DRUGI TUMORI ŠTITNJAČE

Teratom,  
Primarni limfom i plazmocitom,  
Ektopični timom,  
Angiosarkom,  
Tumori glatkih mišićnih stanica,  
Periferni tumor živčanih vlakana, paragangliom, solitarni fibrozni tumor,  
Tumor folikularnih dendritičnih stanica,  
Histiocitoza Langerhansovih stanica

### 4. SEKUNDARNI TUMORI

Na tumore štitnjače otpada otprilike 1% od ukupnog broja svih malignih tumora, dok njihov udio u smrtnosti od svih karcinoma iznosi oko 0,2% (17,18). Većinu karcinoma

štitnjače čine papilarni karcinomi koji predstavljaju i najčešće maligne neoplazme endokrinog sustava, dok su tumori podrijetla C stanica puno rjeđi. Pojavljuju se pretežno u mlađih i ljudi srednjih godina, a godišnje se u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) otkrije otprilike 122 000 novih slučajeva. (17).

#### 1.6.1. ADENOMI ŠTITNJAČE

SZO je podijelila adenome štitnjače u folikularne adenome i hijalinizirajuće trabekularne tumore (17). Folikularni adenom je benigni, inkapsulirani tumor koji pokazuje diferencijaciju prema folikularnom epitelu. Biološka osnova temeljem koje je moguće razlikovati adenome od hiperplastičnih čvorova je prvenstveno njihova klonalnost. U jednoj studiji se analizom čvorova pokazalo da je 60% lezija u multinodoznoj strumi klonalnog karaktera (19).

Solitarni čvorovi se pojavljuju u 4-7% odraslih u područjima s dostatnim jodom u prehrani, dok u područjima deficitarnim jodom pojava solitarnog čvora može doseći i do 50%. Žene su zahvaćene češće nego muškarci, no razina progresije u malignitet je češća kod muškaraca (4,17). Osim s razinom joda u prehrani, pojava solitarnih čvorova se povezuje i sa iradijacijom. Adenomi mogu biti dio nodozne strume, mogu se pojaviti u sklopu Cowdenovog sindroma kako u normalnoj tako i u ektopičnoj štitnjači (17). Klinički su uglavnom asimptomatski i najčešće se otkrivaju ultrazvučnim pregledom kojim se prikazuje solitarni čvor, dok scintigrafska pretraga ukazuje na hladni čvor. Manjina čvorova koja je "vruća" na scintigramu, povezana je s hipertireozom (5,17). Makroskopski su obično solitarni, okrugli do ovalni čvorovi okruženi tankom kapsulom. Najčešće mjere 1-3 cm, no mogu biti i veći (17).

Patohistološki se od folikularnog karcinoma razlikuju prema nedostatku vaskularne i kapsularne invazije (11). Najčešće morfološke karakteristike koje pokazuju su folikularna i trabekularna građa. Mogu biti normofolikularni, makrofolikularni i mikrofolikularni. Imunohistokemijski su pozitivni na citokeratin, tireoglobulin, TTF-1, no ne i na CK 19, kalcitonin i panneuroendokrine markere (17).

Povezanost s karcinomom i rizikom od nastanka karcinoma nije utvrđena, no Greenman i sur.(20) su u istraživanju u kojemu su dodavali dietilstilbestrol miševima,

ustanovili povećan rizik od nastanka adenoma, te zaključili da navedeni lijek ima uzročnu vezu s tiroidnom neoplazijom.

## **1.6.2. PAPILARNI KARCINOM ŠTITNJAČE**

Papilarni karcinom je maligni epitelni tumor koji pokazuje diferencijaciju prema folikularnom epitelu, te ima karakterističan izgled jezgre (21). Najčešće se nalazi u populacijama sa dovoljnim ili prekomjernim unosom joda u prehrani. Njegov udio u malignitetima štitnjače iznosi otprilike 80-85 %, a biološki je uglavnom indolentnog tijeka i ima izvrsnu prognozu (25-godišnje preživljenje u više od 95 % slučajeva) (17).

### **1.6.2.1. Epidemiologija i incidencija papilarnog karcinoma**

Papilarni karcinom štitnjače najčešće pogađa odrasle u dobi od 20-50 godina, s omjerom žena prema muškarcima oko 4:1 (18,21). Nakon 50-te godine predominacija žena je manje izražena. Dakle odnos žena i muškaraca kod papilarnog karcinoma ne ostaje statičan tijekom godina. Smanjenje odnosa žene : muškarci kontinuirano pada dok učestalost karcinoma u muškaraca ne dostigne svoj vrhunac između 65. i 69. godine života (22). Prema Nacionalnom institutu za rak u SAD odnos žena i muškaraca je viši od 5:1 u dobi od 20-24 godine, 3,4:1 od 35-44 godine, dok oko 80-te godine doseže odnos 1:1 (23).

Papilarni karcinomi predstavljaju i najčešći pedijatrijski tumor štitnjače, iako je rijedak. Češće pogađa tinejdžersku populaciju. Incidencija papilarnog karcinoma je širom svijeta u stalnom porastu, no mortalitet je u padu. Prevalencija papilarnog karcinoma kao slučajnog nalaza prilikom obdukcije varira između 5 i 35 % (17).

### **1.6.2.2. Etiološki čimbenici u nastanku papilarnog karcinoma**

Čimbenici okoliša mogu se podijeliti na genotoksične: radioaktivni jod i iradijacija i negenotoksične : nedostatak joda.

Prema Li Volsi (18) jednim od najvažnijih čimbenika okoliša smatra se iradijacija, bez obzira da li je ona eksterna ili interna. Na radioaktivne učinke su osobito osjetljiva mala djeca obzirom da štitnjača najviše raste u djetinjstvu, pa je tako u dekadi nakon černobilske tragedije u Bjelorusiji pojavnost karcinoma štitnjače bila 30 puta veća nego u ostatku svijeta (18). Mnoge studije ukazuju da tumori inducirani iradijacijom pokazuju agresivnije ponašanje, osobito u černobilskih pacijenata (24).

Povećana učestalost papilarnih karcinoma primjećena je kod onih koji su zračeni malim dozama zračenja radi benignih tvorbi, kod preživjelih u području eksplozije atomske bombe i onih koji žive u blizini mjesta odvijanja nuklearnih pokusa, te kod ljudi koji su zračeni radi malignih tumora (18). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) smatra da iradijacija uzrokuje prekide dvostrukog lanca deoksiribonukleinske kiseline (DNK), a što predstavlja prekursorski događaj u rearanžmanu određenih gena kod papilarnog karcinoma (17).

Iradijacija vrata uništava folikule štitnjače i uzrokuje relativnu hipotireozu što rezultira povišenom sekrecijom TSH. Moguće je da TSH stimulacija uništenog folikularnog epitela uzrokuje neoplastičnu transformaciju stanica štitnjače. Čini se da je iradijacijom inducirani karcinom štitnjače neovisan o spolu (25), no što se tiče djece, prema autorima Bhatti i sur. (26) čimbenici kao spol i godište u trenutku ekspozicije, te vrijeme koje je prošlo od ekspozicije značajno modificiraju rizik od karcinoma štitnjače povezanog s iradijacijom u djece, te da te čimbenike treba uzeti u obzir kod praćenja.

Papilarni karcinom je češći u eutireotičnih osoba, dok deficijencija joda donosi povećani rizik za razvoj folikularnog karcinoma (17,27). Stoga neki autori, kao Sakoda i sur. (28) smatraju da bi kronična deficijencija jodom mogla predstavljati i svojevrsni protektivni čimbenik kod papilarnog karcinoma, dok prema Li Volsi (18) koncentracije joda u prehrani mogu utjecati na incidenciju, pa čak i na morfologiju papilarnih karcinoma. Rahbari i sur. (27) ne uočavaju utjecaj nutritivskih navika i čimbenika na spolnu razliku u pojavnosti karcinoma štitnjače. Sukladno tome se razina TSH također smatra neovisnim prediktorom dijagnoze maligniteta štitnjače kod pacijenata s nodoznom bolešću. Preoperacijske koncentracije TSH u serumu su više u pacijenata s agresivnijim tumorima, sugerirajući potencijalnu ulogu TSH u progresiji diferenciranog karcinoma.

Mehanizam nije objašnjen, no ukazuje da kod koncentracija TSH manjih od 0,4 mikroU/ml dolazi do razvoja autonomne funkcije štitnjače te sniženog rizika od papilarnog karcinoma. Dakle, TSH su identificirali kao neovisni prediktor prisustva maligniteta, naravno u sklopu godišta i spola pacijenta (27). Najmanji rizik imaju pacijenti sa subkliničkim TSH (29).

Haymart i sur. (30) povezuju TSH i sa stadijem tumora, pa su tako srednje vrijednosti TSH u bolesnika sa 3. i 4. stadijem bolesti bile više od onih u stadiju 1 i 2. Primjećeno je da se TSH povisuje sa životnom dobi. Budući da je TSH glavni hormon u kontroli rasta i funkcije štitnjače, Preston-Martin i sur. (31) sugeriraju da povećana količina TSH vodi prema razvoju karcinoma. Hipotezu podržava činjenica da su neki karcinomi štitnjače ovisni i o sekreciji TSH te da supresija TSH može nekad biti korisna u liječenju karcinoma štitnjače (29).

Fiore i sur. (32) su analizirali vezu između serumskog TSH i papilarnog karcinoma na 10178 pacijenata s nodoznom bolešću štitnjače, a koji su bili podvrgnuti i citološkoj punkciji. Našli su značajno veću koncentraciju TSH u pacijenata kod kojih je nakon punkcije dijagnosticiran karcinom u usporedbi s onima s benignom bolešću. Pojava autonomnih čvorova je rijetko povezana s tumorima, te oni na neki način smanjuju rizik od papilarnog karcinoma, dok autoimunost ne igra značajnu ulogu. Nemjerljive koncentracije TSH su povezane s dužim periodom bez bolesti, što znači da bi razina TSH predstavljala neovisni prediktor povrata bolesti (33).

Što se tiče nasljeđivanja, postoji značajna povezanost između pojavnosti papilarnog karcinoma kod članova iste obitelji, no uzrok nije objašnjen. Potomci osobe koja je imala papilarni karcinom imaju 4 puta veću šansu da obole od iste bolesti u odnosu na normalnu populaciju. Poznata je i povezanost između papilarnog karcinoma i ostalih tumora, npr. karcinoma dojke i paraganglioma (17).

#### 1.6.2.3. Genetske promjene u papilarnom karcinomu

Najčešća tri tipa somatskih mutacija nađena u papilarnom karcinomu su: rearanžiran u transformaciji/papilarni tiroidni karcinom (RET/PTC) mutacija, rearanžirani tirozinkinaznih neurofin receptora 1 (NTRK1) i aktivacija mutacije u mitogenu

signalnog proteina BRAF (prema eng. murine sarcoma viral oncogene homolog). Navedene mutacije su prisutne u otprilike dvije trećine papilarnih karcinoma (17).

Rearanžman gena RET i NTRK1 je prvenstveno vezan za oštećenje dvostrukog lanca DNK, često induciranog iradijacijom. Navedeni se rearanžman uz mutaciju BRAF gena smatra ekskluzivnim za papilarni karcinom (34). Prisutan je u otprilike 20-40% papilarnih karcinoma te u 60-85% slučajeva papilarnih karcinoma povezanih sa zračenjem (35). RET/PTC mutacije su uglavnom stečene a povezanost sa spolom nije nađena u studiji Rahbari i sur. (27). Mutacija uključuje receptore za tirozin kinazu. Fuzionirani RET/PTC produkti su uniformno izraženi u papilarnom karcinomu koji nije podrijetla neuralnog grebena. 5' kraj novog fuzioniranog gena uvijek dolazi od gena koji su normalno izraženi u folikularnom epitelu dozvoljavajući time RET-u da se izrazi u „stranom“ okruženju (34).

BRAF mutacija predstavlja drugi put karcinogeneze. Uključuje serin/treonin kinazu koja posreduje u staničnom odgovoru na signalizaciju rasta i diferencijacije. Onkogeni BRAF može biti okidač za proupalni program u epitelnim stanicama štitnjače (23). Mutacija je prisutna u otprilike 40% do 78% papilarnih karcinoma (34, 35). Rjeđa je u djece, i onih koji su bili izloženi iradijaciji. Tumorigena uloga BRAF je dokazana na transgeničnim miševima i kulturama stanica štakora, te ga se smatra i inicijatorom tumorigeneze i nužnim čimbenikom progresije tumora u PTC. Povezan je i s agresivnim kliničkopatološkim tijekom i rekurencijom tumora, čak i u skupini mikrokarcinoma (36). Smatra se da BRAF mutacija sama za sebe ne predstavlja marker lošeg ishoda, nego u kombinaciji s alteracijom drugih gena, te je BRAF mutacija povezana s drugim genetskim događajima predstavljala neovisni čimbenik pojave udaljenih metastaza (36, 37). Povezuje ju se sa veličinom tumora, ekstratiroidnom invazijom, metastazama u limfne čvorove, odnosno višim TNM stadijem (23). U otprilike 97% slučajeva radi se o točkastoj BRAF V600 mutaciji čije se prisustvo povezuje s agresivnim tumorskim fenotipom. Nekoliko studija je pokazalo značajno veći broj BRAF mutacija u muškaraca, što bi moglo objasniti činjenicu da se muškarci već u početku prezentiraju s agresivnijom bolešću (27, 38).

O rearanžmanu NTRK1 gena postoji relativno malo studija. Gen NTRK1 koji enkodira TRK receptor lociran je na kromosomu 1q, a njegova je translokacija nađena u otprilike 5-13% papilarnih karcinoma (1, 27).

Na različiti molekularno-genetski profil sporadičnih i iradijacijom izazvanih papilarnih karcinoma ukazali su Nikiforova i sur. (39) uspoređujući učestalost BRAF i RET mutacija kod papilarnih karcinoma (PTC) u tzv. černobilske djece i sporadičnih papilarnih karcinoma. Kod iradijacijom induciranih karcinoma nađena je niska prevalencija BRAF (4%), visoka prevalencija RET/PTC (58%), dok je kod sporadičnih PTC-a BRAF mutacija nađena u 37%, a rearanžman RET/PTC u 20 % slučajeva.

Kod folikularnih se neoplazmi za razliku od papilarnog karcinoma nalaze pretežno RAS mutacije. RET mutacija je prisutna i u medularnom karcinomu, ali se radi o točkastoj mutaciji za razliku od RET rearanžmana u papilarnom karcinomu (17).

#### 1.6.2.4. Lokalizacija i klinički simptomi papilarnog karcinoma

Papilarni se karcinom štitnjače može pojaviti u normalno smještenom i u ektopičnom tkivu štitnjače. Najčešće se prezentira kao masa u štitnjači ili cervikalna limfadenopatija, a scintigrafski kao hladni čvor (1). U područjima s manjkom joda, može se prezentirati kao nešto uočljiviji čvor u multinodoznoj strumi, dok se u područjima s normalnom količinom joda u prehrani obično prezentira kao solitarni palpabilni čvor. Različite radiološke pretrage, kao što su kompjutorizirana tomografija ili ultrazvuk omogućuju otkrivanje brojnih nepalpabilnih čvorova za koje se dodatnim pretragama, prvenstveno citološkom punkcijom, ustanovi da su papilarni karcinomi. Oko 20 % papilarnih karcinoma je multicentrično, osobito u djece (5).

Papilarni karcinomi štitnjače rijetko interferiraju s funkcionalnim testovima te oni nisu od pomoći u dijagnosticiranju u karcinoma štitnjače. U dijagnosticiranju solitarnih čvorova te time i papilarnog karcinoma citološka punkcija može smanjiti čak 75% nepotrebnih operativnih zahvata. Kod mlađih pacijenata se karcinom u 25% slučajeva prezentira sa cervikalnim metastazama, čak i kada se radi o malim, nepalpabilnim tumorima (17).

#### 1.6.2.5. Histopatologija i imunohistokemijska obilježja papilarnog karcinoma

Makroskopski je papilarni karcinom obično veličine 2-3 cm, bijele boje i čvršće konzistencije. Zbog ekstenzivne skleroze, česti su kalcifikati, pa može makroskopski podsjećati na ožiljak, a može se prezentirati i kao cistična formacija. Mikroskopski se najčešće nalazi fibrovaskularno tkivo koje okružuje jedan ili više slojeva neoplastičnih stanica sa zgusnutim ovalnim jezgrama (18).

Tumori su najčešće sastavljeni od papilarnih, no mogu sadržavati i folikularna područja. Tumorske stanice su kubične ili cilindrične. Svjetle jezgre se nalaze u preko 80% takvih lezija, intranuklearne inkluzije u otprilike 80-85%, a urezi jezgre u gotovo svim slučajevima. Mitoze su rijetke. Nalaze se i psamomska tjelešca koja predstavljaju ostatke mrtvih papila. Najčešće se nalaze unutar jezgara papila, u tumorskoj stromi no ne i unutar neoplastičnih folikula. Rijetko se nalaze i u benignim stanjima (u manje od 1%) (18). Česta je pločasta metaplazija, a mogu biti cistično promijenjeni, pokazivati solidnu ili trabekularnu strukturu. Papile se moraju razlikovati od onih u benignim promjenama, kao što je nodозна ili Basedowljeva struma u kojoj je izgled jezgara drugačiji (1,17).

Papilarni karcinomi štitnjače su imunohistokemijski pozitivni na citokeratin (CK), tireoglobulin i tiroid transkripcijski faktor (TTF-1), a negativni na sinaptofizin i kromogranin. HBME 1 (Hector Battifora Mesothelial 1) i Galektin-3 se spominju kao markeri malignosti u papilarnom karcinomu. Kod tumora koji metastaziraju karakterističan je gubitak p27 ili pojačana regulacija ciklina D1, dok su nemetastatski karcinomi pozitivni na p27 i negativni na ciklin D1 (17).

Izraženost EGF-proteina i p29 se u radu Akslena i sur. (40) navode kao indikatori hormonski neovisnog rasta tumora, jer su bili povezani s rekurencijom tumora tijekom perioda praćenja.



#### 1.6.2.6. Podtipovi papilarnog karcinoma

Neki papilarni karcinomi pokazuju specifične značajke i kombinaciju određenih tipova rasta, stanica te stromalne reakcije. Prema tim karakteristikama, možemo ih podijeliti na slijedeće histološke podtipove (varijante): folikularna, makrofolikularna, onkocitna varijantna, varijanta svijetlih stanica, difuzna sklerozirajuća varijanta, varijanta visokih stanica, varijanta cilindričnih stanica, solidna, kribiformna varijanta, papilarni karcinom sa stromom nalik fasciitisu, papilarni karcinom s fokalnom inzularnom komponentnom, papilarni karcinom s pločastom i mukoepidermoidnom komponentom, papilarni karcinom s orijaškim i vretenastim stanicama, kombinirani papilarni i medularni karcinom, papilarni mikrokarcinom (17).

Izdvojene su varijante koje se najčešće pojavljuju u vlastitom istraživanju, te histološki agresivnije varijante:

<p>1.FOLIKULARNA VARIJANTA-makroskopski najčešće inkapsulirani, mali do srednje veliki, nepravilni folikuli, varijabilna količina koloida, svijetle jezgre s nuklearnim urezima i pseudoinkluzijama, često prisutne i multinuklearne orijaške stanice. Prognoza mu je jednaka kao i kod klasične varijante papilarnog karcinoma.</p>
<p>2.ONKOCITNA VARIJANTA- mogu imati papilarnu ili folikularnu građu. Stanice često imaju poligonalnu ili obilniju eozinofilnu i granularnu citoplazmu. Histološka podvrsta ove varijante je papilarni karcinom izgleda Warthinovog tumora.</p>
<p>3. DIFUZNA SKLEROZIRAJUĆA VARIJANTA- često kod mlađih osoba, zahvaća oba režnja bez jasno vidljivog čvora. Često se nalaze psamomska tjelešca, pločasta metaplazija, limfocitna infiltracija i skleroza. Histologija i imunohistokemija podležećeg tkiva štitnjače je identična s Hashimotom.</p>
<p>4.VARIJANTA VISOKIH STANICA- karakteriziraju ga citoplazme koje su barem dva puta duže nego šire. Češći u starijih osoba, prvenstveno muškaraca, te pokazuje agresivniji klinički tijek.U ovoj varijanti su češće BRAF mutacije.</p>
<p>5.VARIJANTA CILINDRIČNIH STANICA- ovu podvrstu papilarnog karcinoma štitnjače karakteriziraju pseudostratificirane cilindrične stanice čije citoplazme često sadrže vakuole. Pokazuju varijabilnu imunoreaktivnost na tireoglobulin, a pozitivne su na TTF-1. Agresivnijeg su tijeka od ostalih podvrsta papilarnog karcinoma štitnjače.</p>
<p>6. PAPILARNI MIKROKARCINOM - radi se o papilarnom karcinomu koji se otkrije slučajno, a promjera je <math>\leq 1</math> cm. To je najčešći oblik papilarnog karcinoma. (17).</p>

#### 1.6.2.7. Liječenje papilarnog karcinoma

S obzirom na klinički stadij liječenje papilarnog karcinoma obuhvaća kirurško odstranjenje jednog režnja (lobektomiju) ili totalnu tireoidektomiju, te limfadenektomiju. Nakon zahvata može se uključiti hormonska terapija, terapija radioaktivnim jodom, vanjsko zračenje ili kemoterapija (5,18).

Što se tiče papilarnog mikrokarcinoma (PMC), nema konsenzusa oko terapije, pa je raspon širok, od opservacije do totalne tireoidektomije, te dodatnog liječenja radioaktivnim jodom (41). Prema istraživanju Noguchi i sur. (42), a koje obuhvaća 12-godišnje iskustvo jedne ustanove u liječenju papilarnih karcinoma, provodi se lobektomija, a ako pacijent ima benignu tvorbu u drugom režnju onda se odstrani samo taj dio. Smatraju važnim održavanje niske razine TSH. Radioaktivni jod se daje samo u slučajevima evidentnih udaljenih metastaza. Pelizzo i sur. (43) imaju puno radikalniji pristup pa pristupaju totalnoj tireoidektomiji te terapiji radioaktivnim jodom. Mercante i sur. (44) zaključuju da bi totalna tireoidektomija bila preporučiva za PMC sa širenjem izvan štitnjače te pozitivnim limfnim čvorovima.

Kod liječenja diseminiranog karcinoma štitnjače je osim kirurškog odstranjenja štitnjače i lokalnih struktura korisno ukloniti i solitarne metastaze (ako su dostupne). Dobro je i ako su udaljene metastaze osjetljive na jod. Funkcionalne metastaze imaju puno bolju prognozu od nefunkcionalnih (10 godišnja smrtnost 75%).

Iradijacija vrata se primjenjuje kod bolesnika starijih od 45 godina s većim proširenjem bolesti izvan štitnjače te u bolesnika s većim ostatnim tumorom nakon liječenja radioaktivnim jodom (5).

#### 1.6.2.8. Prognoza papilarnog karcinoma

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) papilarni karcinom ima tendenciju širenja u limfne žile i stoga se u trenutku dijagnoze pronađe značajan postotak metastaza u cervikalne limfne čvorove (25-50%) (17). Vrlo često se nađu i mikroskopski fokusi tumorskog tkiva, topografski odvojeni od glavne tumorske mase, a kao rezultat intraglandularnog limfatičnog širenja i/ili rijetko multifokalnog porijekla. Udaljene metastaze su relativno rijetke (5-7%) jer se venska invazija rjeđe događa. Neki autori navode da pronalazak venske invazije ukazuje na agresivnije ponašanje tumora (18). Prognoza papilarnog karcinoma je općenito izvrsna. 10-godišnje preživljenje je preko 90%, dok je za mlađe pacijente i preko 95% (1,18).

Patohistološki čimbenici koji su se pokazali važnim za preživljenje i prognozu su: vaskularna invazija, nuklearna atipija, manje diferencirana i solidna područja, aneuploidna stanična populacija (18). Sklerozirajući podtip se pokazao značajnim prediktorom udaljenih metastaza u multivarijantnoj analizi u radu autora Pellegriti i sur (45).

Klinički važni prognostički čimbenici su: dob, spol, ekstratiroidno širenje, radikalnost kirurškog zahvata, te udaljene metastaze. U tom smislu se nepovoljnim prognostičkim čimbenicima smatraju: starija životna dob obično praćena većim tumorima te ekstratiroidno širenje tumora. Li Volsi dodaje još i veće tumore i muški spol (18). Pellegriti (45) navodi, doduše kod karcinoma manjih od 1,5 cm, da pacijentova dob, muški spol i pozitivna anamneza nisu imali prognostički značaj te da se osim histoloških karakteristika (sklerozirajući tip), mjerenje serumskog TSH kod prve postkirurške evaluacije pokazao kao najjači prognostički indikator. Što se rekurencije tiče, 10% papilarnih karcinoma invadira izvan štitnjače te raste izravno u okolna tkiva, povećavajući morbiditet i mortalitet. Stupanj rekurencije unutar lokalno invazivnih tumora je 2 puta veći te će 33% pacijenata s lokalno invazivnim tumorima umrijeti od karcinoma unutar jedne dekade (46).

Ekstratiroidna invazija te udaljene metastaze predstavljaju veći rizik od smrtnosti, kao i dob veća od 45 godina, te tumori veći od 3 cm (47). Papilarni karcinom je uglavnom

indolentnog tijeka i izlječiv nakon standardne tiroidektomije u kombinaciji s TSH supresivnom terapijom i radiojodnom ablacijom. Perzistencija ili rekurencija bolesti su povezane s povećanim mortalitetom (22). Navedeni parametri primjenjeni su u različitim sustavima stupnjevanja ili stageinga, te prognostičkim sustavima.

Postoje različiti sustavi stupnjevanja koji određuju prognozu i liječenje no najčešće korišteni sustav je tzv. TNM sustav (T-tumor-N-čvor-M-metastaza) koji se zasniva na veličini primarnog tumora, širenju izvan štitnjače, te prisustvu regionalnih i udaljenih metastaza. TNM sustav je kod diferenciranih karcinoma štitnjače podijeljen po dobi (mlađi od 45 i stariji od 45 godina). Prvi prognostički sustav, sastavljen da bi odredio rizične grupe pacijenata, je izrađen od strane EORTC-a (Europske Organizacije za istraživanje i liječenje karcinoma). Zasniva se na određivanju rizičnih grupa prema dobi, spolu, tipu tumora, ekstratiroidnom širenju i udaljenim metastazama. TNM klasifikacija, koja se kao što je rečeno najviše koristi, prihvaćena je i od Međunarodne unije za borbu protiv raka (UICC), te Američkog društva za rak (AJCC). Zadnjih je godina u TNM klasifikaciji došlo do nekih promjena i revizija, pa sadašnja TNM klasifikacija iz 2002. godine uvodi promjenu u smislu T, te se T1 smatra svakim tumorom manjim od 2 cm. Time se T1 više ne podudara s definicijom mikrokarcinoma. Također, pacijenti mlađi od 45 godina, bilo kojeg T i bilo kojeg N, a bez udaljenih metastaza se smatraju stadijem 1, dok se pacijenti stariji od 45 godina, klasificiraju u stadije I, II, III i IV (17). TNM sustav se koristi uglavnom za diferencirane tumore štitnjače, dok kod anaplastičnog karcinoma ne postoji opće prihvaćen sustav stupnjevanja, te se neovisno o kategoriji T svaki anaplastični karcinom stavlja u IV. stadij (17).

Kliničko stupnjevanje tumora nam omogućuje: 1. Prognozu pojedinog bolesnika s diferenciranim karcinomom, 2. Planiranje postoperativnog dodatnog liječenja, 3. Planiranje razine intenziteta i učestalosti postoperativnih kontrola., 4. Usporedbu različitih terapijskih postupaka u usporedivim skupinama bolesnika (5).

#### 1.6.2.9. Papilarni mikrokarcinom

Papilarni mikrokarcinom je papilarni karcinom koji mjeri 1 ili manje od 1 centimetra (cm), a otkrije se slučajno. Najčešći je oblik papilarnog karcinoma. U nekim slučajevima, naročito kod djece, može se ponašati agresivnije a rijetko se u odraslih može prezentirati metastazama u limfne čvorove (17).

Najčešće je smješten blizu čahure štitnjače, a često je nekapsuliran i sklerozirajući. Najmanji tumori, oni manji od 1 mm, često pokazuju folikularnu histološku sliku bez stromalne skleroze, dok veći, prosječne veličine od 2 mm imaju prominentniju dezmodoplastičnu stromu. Mikrokarcinomi s klasičnom papilarnom slikom su obično veći od 5 mm ali su najrjeđi (17). U literaturi ih se nalazi pod različitim nazivima kao što su okultni, latentni, mali, nekapsulirani, itd. Rjeđe se prezentiraju s metastazama u limfne čvorove, no smatra se da takvi slučajevi mikrokarcinoma imaju drugačije imunohistokemijske karakteristike što podrazumijeva gubitak p27 i pojačanu regulaciju ciklina D1 (17). Autori Kim i sur. (48) proučavali su povezanost kliničkopatoloških parametara kod mikrokarcinoma u odnosu na subkliničke metastaze u limfne čvorove. Subkliničke metastaze su otkrivene u otprilike 38,1% pacijenata, a kao neovisni prognostički čimbenik su se istaknuli muški spol te veličina tumora (veći od 5 mm).

Hay i sur. (49) su na Mayo klinici ispitivali uzorak od 900 pacijenata liječenih od papilarnog mikrokarcinoma u razdoblju od 1945 do 2004. Praćenjem pacijenata u razdoblju oko 17,2 godine nakon zahvata zaključili su da radioterapija nakon kirurškog zahvata (totalne tiroidektomije) nije imala utjecaj na rekurenciju tumora.

Karatzas i sur. (50) su u usporedbi papilarnih mikrokarcinoma u odnosu na ostale PTC otkrili da su incidentalni mikrokarcinomi imali značajnije manje agresivne značajke, dok su se neincidentalni mikrokarcinomi prezentirali s jednakom agresivnošću kao i obični papilarni karcinom, te su stoga zahtijevali i jednaku terapiju. Navedena grupa autora predlaže totalnu tiroidektomiju praćenu ekploracijom centralnih limfnih čvorova kao optimalnu terapiju.

Na uzorku od 321 mikrokarcinoma Džepina i sur. (51) su našli veći broj mikrokarcinoma u starijoj dobi (63,3%), dok se multicentričnost u oba režnja istaknula se kao neovisni rizični čimbenik za lokoregionalno metastatsko širenje. Zaključuju da mikrokarcinomi pokazuju kliničkopatološke karakteristike koje ih ne razlikuju od

ostalnih tipova papilarnog karcinoma, te se također na mnogo načina agresivno ponašaju, posebice u odnosu na tumore do 3 cm.

Prema Cheemi i sur. (52) mikrokarcinomi imaju odličnu prognozu s niskom stopom rekurencije (8%) te 100%-tnim preživljenjem. Histološko gradiranje tumora te parametri kao nuklearna atipija, tumorska nekroza i limfovaskularna invazija su se pokazali kao važni čimbenici u evaluaciji tumorske agresivnosti, rizika od rekurencije i metastatske diseminacije. Multicentričnost sugerira veći rizik od lokoregionalnog širenja i povećan rizik od rekurencije.

Papilarni mikrokarcinom se zadnjih godina dijagnosticira sa povećanom učestalošću, no s minimalnim rizikom mortaliteta (0%). S druge strane postoji značajan rizik od rekurentne ili perzistirajuće bolesti nakon subtotalne tireoidektomije, te se slažu da totalna tireoidektomija predstavlja metodu izbora u liječenju (51,53).

U analizi 535 slučajeva papilarnih mikrokarcinoma utvrđena je povezanost između inicijalno pozitivnih (metastatskih) limfnih čvorova i širine inicijalog operativnog zahvata s lokalnim relapsom. Istraživanje potvrđuje tezu da mikrokarcinom ima izvrsnu prognozu ako se inicijalno tretira bilateralnom lobektomijom, dok rutinska ablacija radiofrekventnim jodom nije indicirana (49).

Ghossein i sur. (54) su utvrdili važnost slijedećih prognostičkih čimbenika kod papilarnih mikrokarcinoma: veličina i histološki tip tumora te metastaza u limfne čvorove, koji su se pokazali kao prediktori ishoda papilarnog mikrokarcinoma, te bi se trebali objaviti u patohistološkom nalazu. Naime, rijetki pacijenti koji dobiju rekurentni tumor ili čak umru od karcinoma su imali histopatološki agresivnije tumore u trenutku postavljanja dijagnoze, a pacijenti s nezahvaćenim limfnim čvorovima koji su mali u vrijeme dijagnoze imaju vrlo mali rizik rekurencije, te bi mogli biti i pošteđeni radioaktivne jodne terapije.

U studiji provedenoj na papilarnim mikrokarcinomima, a koja je promatrala povezanost sa zahvaćenošću centralnih limfnih čvorova, utvrdili su da su samo veličina tumora (veći od 5 mm) te muški spol bili neovisni prediktivni čimbenici (55), dok su se u studiji Mercante i sur. (44) kapsularna invazija, ekstratiroidna ekstenzija tumora, te metastaze u limfne čvorove u trenutku dijagnoze pokazali kao neovisni čimbenici rizika za rekurenciju tumora i razvoj distalnih metastaza. Stoga zaključuju da bi totalna

tireoidektomija bila preporučiva za PMC s ekstratiroidnom ekstenzijom te pozitivnim limfnim čvorovima.

Pelizzo i sur. (43) su pratili grupu od 403 pacijenta s papilarnim mikrokarcinomom (PMC) te izdvojili prognostičke čimbenike tijekom perioda praćenja od 8,5 godina. U njihovom uzorku su pacijenti s tumorima većim od 5 mm koji su liječeni samo parcijalnom tireoidektomijom imali veću stopu rekurencije nego grupa liječena totalnom tireoidektomijom.



## 1.7. ESTROGENI I KARCINOM ŠTITNJAČE

Već prethodno je naglašeno da su sva oboljenja štitnjače, pa tako i tumori znatno češći u žena i to mlađe životne dobi nego u muškaraca. U mlađoj prerodukcijskoj dobi, kao i nakon menopauze, spolna razlika nije toliko izražena (27). Razlika u odnosu žena prema muškarcima je raširena širom svijeta, počevši od 1,44:1 u Australiji, do skoro 7:1 u Španjolskoj (22). Oko 65-te godine, odnos žena i muškaraca je otprilike 1,5:1 (27). Dakle incidencija papilarnog karcinoma doseže svoj vrhunac tijekom reprodukcije dobi u žena, dok se kod muškaraca ona povećava s dobi. Što je tumor histološki agresivniji to je pojava ujednačenija u žena i muškaraca, dok su diferenciraniji tumori folikularnog porijekla češći u žena (27). Kod muškaraca se također češće prezentiraju s uznapredovalim stadijem i gorom prognozom (22). Brojne eksperimentalne studije ukazuju da bi spolni hormoni i njihovi receptori mogli igrati ulogu u tumorigenezi i tumorskoj progresiji, dok vanjski čimbenici kao prehrana te genetske mutacije ne igraju ulogu u spolnoj razlici (21). Razina TBG je u žena za 10 do 20% veća nego u muškaraca, a u trudnoći veća magnituda u razini TBG rezultira i povećanjem razine TSH (22, 27).

Jedan od jačih dokaza da bi estrogen mogao biti čimbenik rizika za diferencirani karcinom štitnjače dolazi iz eksperimentalne studije koja je jasno pokazala da estradiol (E2) kao glavni spolni hormon stimulira rast benignih i malignih stanica štitnjače. Također je ustanovljeno da je učinak promocije rasta istraživani na uzorcima štitnjače muških i ženskih pacijenata isti, dakle važniji je hormon nego drugi spolno specifični čimbenici (55). U tom se radu također istražuje i prisutnost estrogenskih receptora ER alfa i ER beta1 u stanicama štitnjače (normalne, gušave te u staničnoj liniji karcinoma). Nije bilo razlike u izraženosti ER alfa i ER beta u muškaraca i žena, no značajan rast u izraženosti receptora se dogodio u odgovoru na 17-beta estradiol. Stimulacija benignih i malignih stanica štitnjače estradiolom rezultirala je proliferacijom stanica, povećanom izraženosti D1 ciklina, te modulacijom aktivnosti MAP kinaze. Ti podaci ukazuju da je estradiol potentni mitogen za benigne i maligne stanice štitnjače, te da izražava

promovirajući efekt ne samo preko estrogenskih receptora, nego i preko aktivacije MAP kinaze (55).

Rossing i sur. (56) su proveli studiju na 410 žena starih između 18 i 64 godine kod kojih je dijagnosticiran papilarni karcinom, te 574 zdravih žena. Analizirani su različiti reproduktivni čimbenici te je nešto veći rizik za papilarni karcinom uočen kod žena mlađih od 45 godina koje su nedavno bile trudne (zadnjih 5 god), i to veći kod onih koje su u tom periodu imale dvije i više trudnoća. Povećan rizik je također uočen u žena koje su doжилe zadnjih 5 godina. Dobiveni rezultati sugeriraju da stimulacija štitnjače tijekom trudnoće i dojenja može rezultirati povećanim rizikom od papilarnog karcinoma. Vanucchi i sur. (57) zaključuju da su karcinomi štitnjače dijagnosticirani tijekom trudnoće povezani s lošijom prognozom u usporedbi sa tumorima koji se razvijaju tijekom negravidnog perioda, no druga skupina autora smatra da otkriće papilarnog karcinoma štitnjače u trudnoći nema značajnog utjecaja na prognozu (58).

Udio karcinoma u trudnoći i prvoj godini nakon poroda je značajan i iznosi 10% karcinoma štitnjače koji se dijagnosticiraju tijekom reproduktivne dobi (57). U studiji autora Sakoda i sur. (28) na bolesnicama iz San Francisca i okolice žene koje su imale papilarni karcinom češće su od kontrola imale člana obitelji s proliferativnom bolešću štitnjače, te su češće same imale strumu ili drugi čvor u štitnjači. Bjelkinje su imale veći rizik za PTC kod ranih menarha dok je za Azijatkinje veći rizik bio kod kasnih menarha i dobi starije od 45 godina. Menopauzalni status i godište pri menopauzi nisu bili povezani s povećanim rizikom od karcinoma štitnjače. Prema studiji Negri i sur. (59) najveći rizik za PTC donosile su menarhe kasnije od 15 godina.

Kod žena koje su uzimale oralne kontraceptive, uočen je za 25 % manji rizik od pojave karcinoma štitnjače, dok duljina uzimanja nije utjecala na rizik. Levi i sur.(60) su pronašli nešto veći rizik za razvoj papilarnog karcinoma kod žena koje su imali spontani pobačaj tijekom prve trudnoće, te kod žena koje su ušle u artefijelnu menopauzu u odnosu na premenopauzalne žene. Postoje i hipoteze da se brojni učinci menstrualnih i reproduktivskih faktora događaju u mlađoj dobi te da se ti učinci polagano gase nakon prestanka hormonskih fluktuacija (27, 59).

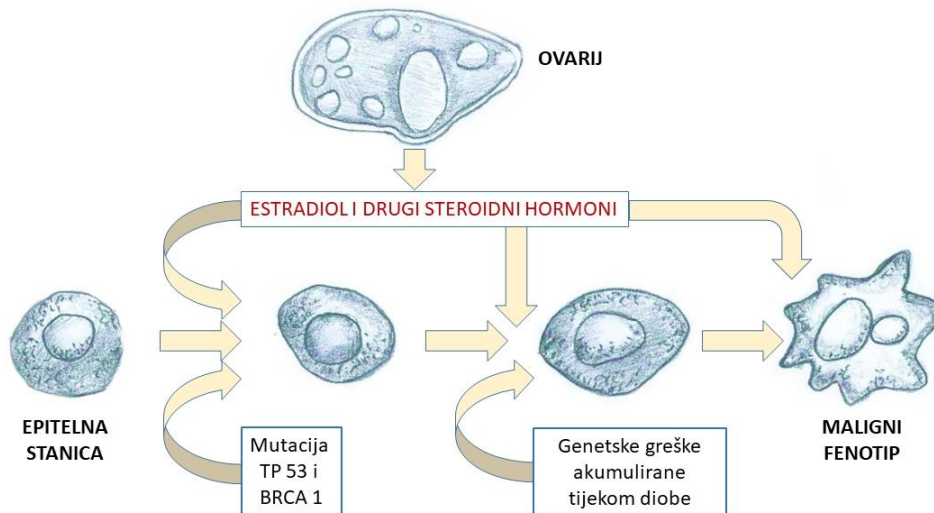
Shindo i sur. (61) su proučavali 9 slučajeva trudnih bolesnica s papilarnim mikrokarcinomom i uspoređivali ih s kontrolnom skupinom bolesnica oboljelih od PMC koje nisu bile trudne. U skupini trudnica imali su povećanje veličine tumora u 44,4% slučajeva u odnosu na 11% u kontrolnoj skupini, no nije nađena povezanost sa razinom tireoglobulina i serumskog tireotropina. Također nisu nađeni estrogenski receptori u uzorcima tkiva pacijentica koje su nakon poroda bile podvrgnute operacijskom zahvatu. Veća kohortna studija iz 2012. godine na postmenopauzalnim ženama nije ustanovila povezanost s rizikom od karcinoma štitnjače, te hormonskih i reprodukcijских čimbenika kao što su godine, prva menstruacija ili menopauza, plodnost ili bilateralna ooforektomija. Samo žene koje su rodile između 20. i 24. godine, su imale povećani rizik od papilarnog karcinoma (62). Persson i sur. (63) su utvrdili da kombinirana estrogensko-progesteronska terapija povećava rizik od razvoja neoplazmi štitnjače.

## **1.8. HORMONI U ETIOLOGIJI KARCINOMA**

Hormonski povezani karcinomi čine otprilike 30% karcinoma u SAD. Model hormonski ovisne karcinogeneze podupiru rezultati brojnih eksperimentalnih i epidemioloških studija u kojima pojedini hormoni koji kontroliraju normalni rast ciljnih organa mogu stvoriti i uvjete za neoplastičnu transformaciju (64). Takav model prvi su objavili Henderson i sur. (64) 1982. godine, a govori o postojanju niza karcinoma koji dijele jedinstveni mehanizam karcinogeneze. To su: karcinom dojke, endometrija, ovarija, prostate, testisa, štitnjače, te osteosarkom. Počiva na paradigmi da endogeni ili egzogeni hormoni, potičući stanično dijeljenje, povećavaju broj dioba stanica te time mogućnost randomiziranih genetskih grešaka, mutacija, te razvoja malignog fenotipa. Hormonski stimulans se nastavlja i tijekom diobe malignih stanica, dakle cijelim progresijskim putem, a njegovo prekidanje kroz anti-hormonsku terapiju može rezultirati usporavanjem malignog procesa, sve do trenutka kada tumor postaje hormonski neovisan.

Henderson i sur. (65) nadalje koriste epidemiologiju karcinoma dojke i endometrija da bi ilustrirali paradigmu hormonske karcinogeneze. Naveli su određene gene kao moguće

kandidate u karcinogenezi, pa su tako za karcinome štitnjače izdvojili TSH, CYP17, HSD17B1.



Slika 1. Shematski prikaz djelovanja estradiola i steroidnih hormona u karcinogenezi (prema Henderson i sur. iz časopisa Carcinogenesis 2000) (65).

Kumulativna izloženost većim dozama estrogena povećava rizik od razvoja karcinoma dojke u žena, što je dokazano i na eksperimentalnim životinjama gdje je moguće povećati incidenciju neoplazije putem ekscesivne hormonske stimulacije ciljnih organa. U takvim slučajevima obično postoji progresivna veza između normalnog rasta prema hiperplaziji i prema neoplaziji, a neoplazme su prvo hormonski ovisne i odgovaraju na hormonsku terapiju, no kasnije postaju autonomne. U navedenom modelu hormoni povećavaju incidenciju neoplazije čak i bez prisustva vanjskih inicijatora, kao što su kemikalije ili ionizirajuće zračenje. Tijekom diobe stanica, DNK greške mogu voditi ka genetskim i epigenetskim promjenama, kao što su mutacije i druge kromosomske greške, neophodne za neoplastičnu transformaciju (65).

Yager i sur. (66) idu korak dalje i predlažu proširenu paradigmu, baveći se prvenstveno ulogom oksidativnih metabolita estrogena u razvoju estrogenske karcinogeneze. Proučavaju katehol estrogene, metabolite estrogena i signalne molekule koje djeluju putem estrogenskih receptora. U daljnjem procesu oksidacije kateholi se mogu manifestirati kao reaktivni kvinoni te uzrokovati oksidativna oštećenja formirajući izravne veze sa glutationima i purinima u DNK.

Nova saznanja ukazuju i na komplementarni put koji uključuje indirektnu genotoksičnost (oksidativno oštećenje DNK) i direktnu genotoksičnost (kroz estrogen-kvinonske DNK veze), što bi značilo da oksidativni metaboliti pridonose estrogenskoj karcinogenezi. Smanjena aktivnost katehol-O-metiltransferaze (COMT), enzima koji je uključen u metabolizam katehol estrogena je povezana s povišenim rizikom od karcinoma dojke. Tijekom estrogenske biotransformacije formiraju se metaboliti od kojih neki imaju estrogensko djelovanje, dok neki djeluju protektivno kroz inhibiciju angiogeneze (66).

To se vidi na modelu sirijskog zlatnog hrčka gdje se pokazalo da su E2 i 4-hidroksi-estradiol kancerogeni kod karcinoma bubrega (67). Dakle, nova paradigma se temelji uglavnom na in vitro istraživanjima te na istraživanjima in vivo na glodavcima. Pretpostavlja se da bi razina i balans između roditeljskog hormona (u ovom slučaju estrogena) i kateholskih metabolita trebala biti određena razinom ekspresije i aktivnosti određenih ključnih enzima uključujući aromataze, citokrome, te protektivne enzime kao što je COMT. Izraženost tih enzima je tkivno specifična, i specifična ovisno o stadiju razvoja te je pod utjecajem čimbenika okoliša te endogenih čimbenika (67).

Na ljudskim tkivima još nije usaglašeno proučavanje estrogenskih metabolita, te još nije u potpunosti proučeno njihovo međudjelovanje kod važnih prijelomnih točaka kao što je oštećenje DNK, CYP17 genotip i ekspresija, COMT genotip i ekspresija (67).

Nedavne epidemiološke studije ukazuju na to da bi estrogen mogao biti odgovoran za tumorsku progresiju kod karcinoma ovarija u postmenopauzalnih žena. Velike prospektivne studije su dokazale značajno povećani rizik od karcinoma ovarija kod žena koje su uzimale hormonsku nadomjesnu terapiju (68). Još je u 19. stoljeću George Beatson uočio da nakon odstranjenja ovarija u premenopauzalnih žena s uznapredovalim karcinomom dojke dolazi do smanjenja tumorske mase te poboljšanja prognoze (69).

## 1.9. ESTROGENSKI RECEPTORI - MEHANIZAM DJELOVANJA

U drugoj polovici prošlog stoljeća identificiran je receptorski protein (estrogenski receptor) koji posreduje različitim akcijama estrogena bez metaboličke alteracije samog hormona. To je omogućilo proučavanje specifične estrogenske aktivnosti na ciljnim mjestima, kao što su uterus, vagina, hipofiza, kao i u karcinomu dojke (70).

Estrogenski receptori (ER) pripadaju superobitelji jezgrinih receptora i predstavljaju ligandom-aktivirane transkripcijske čimbenike. ER se ponašaju kao dimeri kako bi regulirali transkripcijsku aktivaciju (71). Danas su poznata dva podtipa receptora: estrogenski receptor alfa (ER alfa) i estrogenski receptor beta (ER beta). Produkti su različitih gena: ESR1 i ESR2 (72).

Kao i ostali članovi obitelji jezgrinih hormonskih receptora sastavljeni su od nekoliko funkcionalnih domena sa specifičnim ulogama: 1. N-terminalne domene (NTD), 2. DNK-vezujuće domene (DBD), 3. Ligand-vezujuće domene (LBD), te dvije aktivacijski funkcionalne domene (AF1) i (AF2), koje su lokalizirane unutar NTD i LBD, a odgovorne su za regulaciju transkripcijske aktivnosti ER. AF1 je hormonski neovisna, dok je AF2 hormonski ovisna, tj. za njenu funkciju je neophodno prisustvo steroidnog receptora. Homolognost između ER alfa i ER beta je 36% (73). Najveći stupanj podudarnosti pokazuju u DNK-vezujućoj domeni: 97%, dok podudarnost u ligand-vezujućoj domeni iznosi 56%, a u u N-terminalnoj domeni 24% (72). ER beta, čini se, ima slabiju AF1 funkciju, te u svojoj transkripcijskoj aktivnosti više ovisi o ligand-ovisnoj AF2 domeni (74).

Postoji nekoliko različitih molekularnih puteva u regulatornoj aktivnosti ER. Tzv. klasični put uključuje aktivaciju liganda i direktno vezanje na DNK preko ERE (prema eng. estrogen response elements) prije modulacije genske regulacije. Kompleks estrogena i ER se veže za ERE sekvencu direktno ili indirektno kroz proteinsko-proteinske interakcije s aktivatorskim proteinom sa sjedištem u promotorskoj regiji ERE gena, a što rezultira povećanjem ili smanjenjem ribonukleinske kiseline (RNK), te promjenom produkcije proteina (75).

Drugi poznati put djelovanja uključuje protein-protein interakciju s drugim transkripcijskim čimbenicima nakon aktivacije liganda, te je stoga genska regulacija zahvaćena indirektnim vezanjem na DNK (75).

Treći mehanizam, zvan ne-genomski, s brzim učincima, još nije do kraja poznat, ali je primjećen u brojnim tkivima. Ligand aktivira receptor, moguće vezan na membranu. Signalne kaskade se tada aktiviraju putem sekundarnih glasnika koji utječu na ionske kanale i povećavaju razinu dušikovog oksida u citoplazmi, a što vodi do brzog fiziološkog odgovora, bez genske regulacije..

Ligand-neovisni put uključuje aktivaciju signalnih puteva kao što su faktori rasta. U tom slučaju, aktivirane kinaze fosforiliraju ER i time ih aktiviraju da se dimeriziraju, vežu na DNK i reguliraju gene (75).

Klasični, negenomski put se događa u satima, dok se tzv ne-genomski put odvija u sekundama i minutama (76). Modulacija razina endogenih liganada i koregulatora, koja uključuje i hipermetilaciju mogući su uzroci promijenjene aktivnosti receptora u malignom tkivu (77). Mikroerejna analiza endogenih gena u mišjem tkivu i stanicama karcinoma dojke u studiji Fox i sur. (78) pokazala je da ER reguliraju zajednički i odvojeni geni te da ER mogu različito regulirati ekspresiju istih gena. Različiti transkripcijski odgovori ER alfa i ER beta se manifestiraju u njihovom različitom afinitetu za vezanje liganda, različitom odgovoru koji slijedi nakon vezivanja istog liganda, te odvojene membranske i citoplazmatske signalne kaskade koje aktiviraju receptori .

Upravo razlike u relativnom afinitetu za vezanje liganda te različita tkivna distribucija mogu pridonijeti selektivnoj aktivnosti ER agonista i antagonista u različitim tkivima (79). Estrogen je esencijalan za normalni rast i diferencijaciju dojke. Podržava rast oko 50% primarnih karcinoma dojke. Čini se da proliferirajuće stanice karcinoma dojke nisu one koje izražavaju ER alfa, te da se u stanicama koje izražavaju ER alfa, ne izražavaju markeri proliferacije kao Ki 67 i ciklin A (80).

Estrogenski receptori imaju različite učinke u organizmu koji uključuju proliferaciju, apoptozu, i migraciju te različito utječu na razvoj i progresiju karcinoma. Kod hormonski ovisnih karcinoma terapijski pristup se temelji na promjenama u biodostupnosti ER. ER izražavaju različite celularne funkcije koje uključuju aktivacijski

odgovor na ligand-vezujući i ligand-nevezujući način. Dok je aktivacija domena ER alfa dobro znana, nije još do kraja jasno kako homologne regije ER beta pridonose transkripcijskoj aktivnosti receptora (77).

U nekim istraživanjima je predloženo da bi kod stanica koje imaju oba receptora generalni receptorski odgovor mogao biti određen odnosom između ER alfa i ER beta. Nova istraživanja ER beta izoformi ukazuju i na modulatornu ulogu ER beta, te stoga pojačani odgovor na E2 u uterusu BERKO miša (prema eng. ER beta knockout mice) sugerira da ER beta modulira ER alfa posredovanu transkripcijsku aktivnost koju čak može i inhibirati (76,81). Postoje dvije hipoteze koje objašnjavaju ulogu ER u hormonski ovisnim karcinomima. Po jednoj vezanje estrogena za ER stimulira proliferaciju stanica dojke povećavajući tako broj stanica unutar tkiva, broj staničnih dioba i DNK sinteze, što onda rezultira povećanim brojem replikacijskih grešaka i stečenih mutacija, te disrupcijom normalnih staničnih procesa kao što su apoptoza, stanična proliferacija i DNK reparacija. Po drugoj hipotezi estrogenski metabolizam dovodi do produkcije genotoksičnih nus-produkata koji mogu izravno oštetiti DNK, opet rezultirajući u točkastim mutacijama. Postoje dokazi da bi u karcinomu dojke estrogen mogao djelovati putem oba mehanizma (77, 82).

Određivanje ER statusa u tkivima definirano je imunohistokemijskom izraženošću ER alfa u jezgrama, što je posebno vidljivo kod karcinoma dojke, gdje je više od 70% primarnih karcinoma pozitivno na ER (83). No, pronalazak ER beta te izvješća o membranskom i citoplazmatskom pozitivitetu donose potrebu preispitivanja te paradigme (83).



## 1.10. ESTROGENSKI RECEPTORI (ER) BETA

### 1.10.1. STRUKTURA ER BETA

Estrogenski receptor beta je jezgrin receptor novijeg datuma. Otkriven je 1996. godine. Gen za ER beta lociran je na kromosomu 14q23.2. Sam receptor je protein koji se sastoji od 530 aminokiselina (84). Dijeli strukturne karakteristike s ostalim članovima obitelji jezgrinih receptora, uključujući prije navedenih 5 domena. Do sada su poznate 4 izoforme ER beta: 1, 2, 4 i 5, no njihove funkcionalne uloge su još nejasne. Samo ER beta 1 ima heliks pune dužine 11 i 12 koji podrazumijeva poziciju usmjerenu ka agonistu, te je jedina potpuno funkcionalna izoforma. ER beta 1 je obavezni partner u heterodimerima, dok su ostale izoforme varijabilne (85).

### 1.10.2. PRISUTNOST ER BETA U NORMALNIM I NEOPLASTIČNIM TKIVIMA

U imunohistokemijskom istraživanju, koristeći komercijalno poliklonalno antitijelo protiv peptida specifičnih za humani ER beta, autori Taylor i sur. (86) utvrđivali su lokalizaciju ER beta u organizmu. Dokazali su njegovo prisustvo u jezgrama mnogih tkiva, najizraženije u jezgrama granulosa stanica ovarijalnih folikula, te ovarijalnoj stromi. Nije bio prisutan u žljezdanom epitelu uterusa i hipokampusu.

Temeljem istraživanja takozvanih BERKO miševa smatra se da ER beta igra važnu ulogu u ovariju, uterusu, dojci, mozgu, imunološkom sustavu i prostati, no temeljem svih istraživanja učinjenih na knockout i transgeničnim miševima te na prekliničkim istraživanjima ER beta agonista još uvijek nedostaje tzv. mehanicistička hipoteza o njegovoj ulozi u organizmu (77,87). Gubitak ER beta kod knockout miša je rezultirao razvojem abnormalne strukture pluća i sistemske hipoksije (73). Možda najviše proučavan organ je dojka u kojoj je ER alfa prisutan u duktalnom i lobularnom epitelu, a ne u stromi, dok su ER beta prisutni u duktalnom i lobularnom epitelu, te stromi. U prostati su također prisutna oba receptora no u različitim staničnim tipovima (71).

U ovariju, plućima, muškim reproduktivnim organima, kolonu, mozgu, bubregu regulira većinu estrogenskog signala (88). Moguće je i da je jedini receptor u mitohondrijima (77). U štitnjači je ER beta prisutan već u fetalnom razvoju, od 11. gestacijskog tjedna. Stoga autori Kawabata i sur. (89) smatraju da bi estrogen mogao biti uključen u embrionalni razvoj štitnjače, i to upravo posredovanjem ER beta.

Na istraživanjima na miševima nije pronađen niti jedan gen koji je ovisan o ER beta, te postoji hipoteza da funkcija ER beta dolazi do izražaja samo u stresu, bolesti ili kad je organizam kompromitiran na drugi način. Iz toga proizlazi da aktivacija ER beta u normalnim tkivima neće producirati nikakav odgovor (88). Kod miša u nedostatku ER beta dolazi do hiperplazije prostate (81).

Prvi ER beta selektivni agonist diarylpropionitrile (DPN) predstavljen je 2001. godine, a od tada su pronađene i fitoestrogenske komponente koje su proučavane in vitro. Potrebna su daljnja testiranja, obzirom da istraživanja na glodavcima upućuju na to da svaki ER beta agonist uzrokuje različite biološke efekte in vivo (76).

Nekoliko istraživanja se temeljilo na dokazima da je izraženost ER beta veća u normalnim tkivima nego u tumorima, a u benignim lezijama je manja u odnosu na tumore. U organima kao što je prostata, kolon, dojka, endometrijski i ovarij smanjena razina ER beta je dokazana u tumorima, u odnosu na benigno i normalno tkivo dok razina ER alfa perzistira. Stoga se nameće hipoteza da bi kritični korak u estrogen ovisnoj tumorskoj progresiji mogao biti upravo gubitak izraženosti ER beta u karcinomskim stanicama (90). Autori Taylor i sur. (86) su našli povišenu razinu ER beta u normalnom tkivu u odnosu na proliferirajuću dojku.

Predložene uloge ER beta su: antiproliferativna aktivnost, regulacija apoptoze, kontrola antioksidantne genske ekspresije, modulacija imunološkog odgovora (91). No neki znanstvenici sugeriraju da ER beta pridonosi inicijaciji i progresiji kemijski kancerogen-induciranoj neoplastičnoj transformaciji (80).

U karcinomima dojke je nađena smanjena izraženost ER beta u odnosu na normalno tkivo, a izraženost u više od 10% stanica povezana je s boljim preživljenjem i odgovorom na tamoksifen (92). Veća izraženost ER beta povezana je s negativnim statusom limfnih čvorova i niskim tumorskim gradusom (93). Što se tiče podtipova karcinoma dojke, ER beta je bio ravnomjerno distribuiran u 55,5% karcinoma, bez obzira na tip. No u pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima, pozitivitet ER beta je bio povezan s agresivnijim kliničkim tijekom (94).

U medularnom karcinomu štitnjače koji potječe od parafolikularnih ili C stanica, ER beta je bio pozitivan u 72,7% slučajeva, no nije ovisio o TNM ili kliničkim parametrima, dok je u kulturi stanica karcinoma zamijećen anitumorski učinak (95). Podtip ER beta 1 (divlji tip) pokazao se neovisnim prognostičkim čimbenikom povrata bolesti i mortaliteta kod karcinoma dojke. U postmenopausalnih žena sa ER alfa /PR negativnim i trostruko negativnim tumorima je pozitivnost ER beta1 bila povezana sa značajno boljim preživljenjem (96).

Moguća supresorska uloga ER beta najvjerojatnije uključuje promotorsku hipermetilaciju. Naime, reverzija metilacije inhibitorima DNK metiltransferaze dovela je do ponovnog pohranjivanja ER beta u stanicama karcinoma dojke (68).

Autori Bardin i sur. (90) su proučavali staničnu liniju karcinoma jajnika PEO14 koja je izražavala vrlo male razine ER alfa i ER beta, uvodeći ER preko adenovirusa. Ustanovili su da je egzogena ekspresija ER alfa imala minimalne efekte na proliferaciju stanica dok je egzogeno uključivanje ER beta rezultiralo redukcijom proliferacije stanica za 50% na ligand-neovisan način. ER beta je također mogao blokirati E2 induciranu proliferaciju ER alfa pozitivnih stanica. Egzogena stimulacija ER beta pospješila je i apoptozu.

Foley i sur. (82) su pokazali da je izraženost ER beta proteina značajno snižena kod karcinoma kolona u odnosu na zdravo tkivo. Radi nepostojanja razlike u izraženosti ER beta mRNK između normalnog i neoplastičnog tkiva, podupiru tezu o postranskripcijskom mehanizmu koji upravlja sniženjem ER beta proteina kod karcinoma kolona.

U karcinomima prostate izraženost ER beta je bila prisutna u 11,3% stanica u odnosu na prisutnost u 95% stanica normalnog i 24,2 % hiperplastičnog epitela. Gubitak izraženosti ER beta je bio povezan sa progresijom od normalnog epitela prostate do

karcinoma, no paradoksalno je da je kod onih karcinoma koji su zadržali ER beta, izraženost bila povezana s kraćim periodom bez relapsa (97).

Hipoksija utječe na brojne stanične funkcije, a adaptivni odgovori na hipoksiju su primarno regulirani hipoksija-induciranim čimbenicima (HIF), ključnim regulatorima hipoksične genske ekspresije i homeostaze kisika. Dokazano je da ER beta suprimira HIF-1 posredovanu transkripciju (98). Supresija HIF-1 putem ER beta bi dakle mogla predstavljati i potencijalni terapijski agens. Također, prisustvo ER beta u stanicama karcinoma dojke povećava njihovu osjetljivost na anti-estrogene efekte endoksifena (99).

U istraživanju karcinoma pluća nuklearni pozitivitet ER beta je bio prisutan u 61% tumorskih uzoraka (70,3% muškaraca i 58,3% žena), dok je bio prisutan u svega 20 % normalnih tkivnih uzoraka. Muškarci s ER beta pozitivnim tumorima imali su značajno niži mortalitet u odnosu na one s ER beta negativnim tumorima. (72).

Sareddy i sur. (100) su na ksenograft modelu dokazali da ER beta agonisti značajno utječu na smanjenje proliferacije glioma, te da je izraženost ER beta bila veća u normalnom tkivu mozga i tumorima niskog gradusa a značajno niža u tumorima visokog gradusa.

## **2. HIPOTEZA**

Smanjena izraženost estrogenskih receptora beta u papilarnom karcinomu kao i papilarnom mikrokarcinomu štitnjače pokazatelj je biološki agresivnijih tumora.

### **3. CILJEVI RADA**

**OPĆI CILJ:** U skupini od najmanje 100 bolesnika s papilarnim karcinomom iz povijesti bolesti izdvojiti podatke o dobi (žene će biti podjeljene u dvije skupine:mlađe i starije od 50 godina) i spolu, a iz patohistoloških nalaza izdvojiti podatke o veličini tumora (uzevši u obzir mikrokarcinome) te: A) histološkom podtipu tumora, B) prisutnosti limfocitnog upalnog infiltrata, C) prisutnosti intraglandularne diseminacije, D) prisutnosti ostalih benignih promjena u štitnjači, E) prisutnosti metastaza u limfne čvorove.

**SPECIFIČNI CILJEVI:** Na učinjenom dodatnom rezu primarnog tumora odrediti imunohistokemijsku izraženost ER  $\beta$  korištenjem monoklonskog protutijela, te dobivene podatke usporediti s podacima o dobi, spolu, veličini tumora, te parametrima A-E.

## 4. MATERIJALI I METODE

Provedeno je retrospektivno istraživanje na uzorcima tkiva (parafinskim kockama) 104 bolesnika operiranih od papilarnog karcinoma štitnjače u Klinici za tumore (od 2010. KBC „Sestre milosrdnice“) u razdoblju od 2000. do 2008. godine. Podaci o bolesnicima prikupljeni su iz povijesti bolesti, te iz patohistoloških nalaza.

Od svakog uzorka načinjen je jedan mikrozec debljine 2-3 mikrometra, montiran na predmetna stakalca te osušen u termostatu na 60°C oko 40 minuta. Dobiveni rezovi tumorskog tkiva su deparafinirani, rehidrirani, te je na njima učinjeno demaskiranje antigena. Imuhistokemijsko bojenje provedeno je u automatiziranom uređaju DAKO Autostainer na sobnoj temperaturi.

Imunohistokemijskoj reakciji prethodilo je tretiranje tkiva s Dual endogenous enzyme block (S2003, Dako Danska) u svrhu inhibicije endogenih fosfataza u trajanju od 5 minuta. Nakon ispiranja aplicirana su pripremljena protutijela. Nakon 45- minutne inkubacije s liofiliziranim mišjim monoklonskim protutijelom (ER beta:Product code:NCL-ER- beta, proizvođača Novocastra) razrijeđenog u omjeru 1:50 s Dako Real antibody diluentom, te njegova ispiranja, nastali antigen-protutijelo kompleks vizualiziran je s aplikacijom univerzalnog sekundarnog protutijela (30 min). Nakon ispiranja dodano je tercijarno protutijelo konjugirano s alkalnom fosfatazom (30 min) a sve sadržano u vizualizacijskom reagensu Dako (LSAB+System AP, No K0678). Konačno, 6-minutnom inkubacijom s Fast Red kromogenom te alkalna fosfataza-fast red reakcijom omogućena je vizualizacija specifične reakcije pri čemu je nastala vidljivo crvena/ružičasta reakcija. Kako bi bila vidljiva i ostala morfologija, imunohistokemijsko bojenje završilo je pozadinskim obojenjem inkubacijom 2'5 min. u hematoksilinu dajući kontrastno obojenje.

Dobiveni rezultati imunohistokemijske reakcije analizirani su na svjetlosnom mikroskopu Olympus BX50 pod povećanjem 400x na najmanje 100 stanica, uzimajući u obzir postotak stanica pozitivnih na ER beta. Reakcija je prikazana kao: 0 - negativna reakcija, + slabo pozitivna reakcija (manje od 10% stanica ima pozitivnu reakciju), ++ umjereno pozitivna reakcija (10-50% stanica ima pozitivnu reakciju), te : +++ jako pozitivna reakcija (>50% stanica ima pozitivnu reakciju).

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijske i nominalne vrijednosti su se prikazale kroz odgovarajuće frekvencije i udjele, dok su se kvantitativne vrijednosti prikazale kroz medijane i interkvartilne raspone. Međuodnosi pojedinih kliničkih varijabli (histološki podtip tumora, prisutnost limfocitnog upalnog infiltrata, prisutnost intraglandularne diseminacije, prisutnost ostalih benignih promjena u štitnjači, prisutnost metastaza u limfne čvorove) s imunohistokemijskom izraženostima ER  $\beta$  receptora u jezgri i citoplazmi, dobi, spolu, i veličini tumora analizirani su  $X^2$  testom. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima. U statističkoj analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 21 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).



## 5. REZULTATI

Tablica 1. Opća deskriptivna statistika kliničkih i sociodemografskih varijabli

		N	%
Spol	Muški	17	16,3%
	Ženski	87	83,7%
Dobne skupine	<50 godina	50	48,1%
	≥50 godina	54	51,9%
Lokalizacija	Lijevo	37	35,6%
	Desno	53	51,0%
	Istmus	8	7,7%
	Obostrano	6	5,8%
Histološki podtip tumora	Klasični	54	51,9%
	Folikularni	14	13,5%
	Sklerozirajući	11	10,6%
	Onkocitni	8	7,7%
	Ostalo	17	16,3%
Veličina tumora (mm): skupine	≤10mm	43	41,3%
	>10mm	61	58,7%
Intraglandularna diseminacija	Ne	71	68,3%
	Da	33	31,7%
Metastaze*	Ne	81	78,6%
	Da	22	21,4%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	54	51,9%
	Adenom	8	7,7%
	Hashimoto	19	18,3%
	Ostalo	23	22,1%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	74	71,2%
	Da	30	28,8%
ER BETA U CITOPLAZMI %	Negativna reakcija	19	18,3%
	<10%	9	8,7%
	10-50%	13	12,5%
	>50%	63	60,6%
ER BETA U JEZGRI %	Negativna reakcija	47	45,2%
	<10%	14	13,5%
	10-50%	25	24,0%
	>50%	18	17,3%

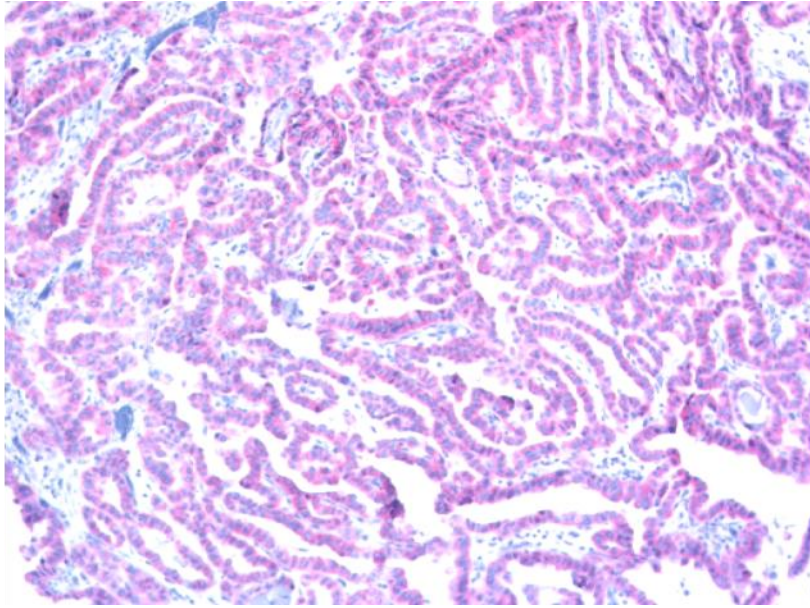
\*S obzirom da u jednog bolesnika nije učinjena disekcija regionalnih vratnih limfnih čvorova, već samo totalna tireoidektomija, podaci o metastazama nisu bili dostupni a niti ne postoji dostupna medicinska dokumentacija o daljnjem praćenju bolesnika. Stoga je sva statistička obrada u svezi statusa metastaza rađena na 103 bolesnika.

Tablica 2. Opća deskriptivna statistika kvantitativnih varijabli

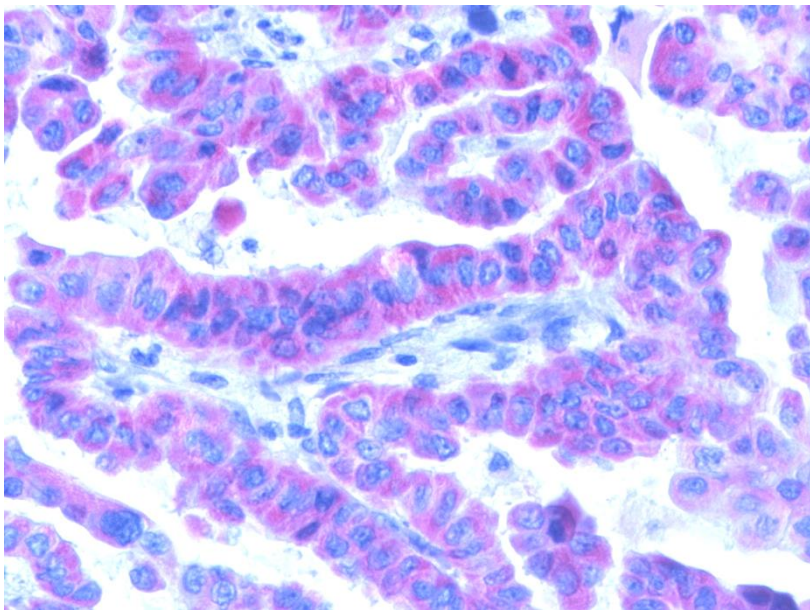
N=104	Aritmetička sredina	SD	Minimum	Maximum	Percentile		
					25.	Medijan	75.
Dob	50,43	14,64	20	80	39,25	50,00	61,75
Veličina tumora (mm)	16,14	10,71	3	65	8,25	12,50	22,00
ER CITO %	2,15	1,19	0	3	1,00	3,00	3,00
ER JEZGRA %	1,13	1,17	0	3	0,00	1,00	2,00

Tablice 1. i 2. prikazuju opću deskriptivnu statistiku kliničkih i sociodemografskih varijabli u ispitivanih bolesnika. Od ukupnog broja od 104 ispitanika, njih 87 (83,7%) bile su žene. Medijan dobi svih bolesnika bio je 50 godina (interkvartilni raspon od 39,25 do 61,75 godina). U nešto više od 50% tumor je bio lokaliziran na desnoj strani, dok je kao histološki podtip tumora prevladavao klasičan oblik: 54 (51,9%). Kod 61 bolesnika (58,7%) tumor je bio veći od 10 mm. Intraglandularna diseminacija bila je prisutna u 33 (31,7%) bolesnika, a limfocitni upalni infiltrat u 30 (28,8%). Od ostalih benignih promjena u štitnjači, Hashimotov tireoiditis bio je prisutan u 19 (18,3%) ispitanika, dok je više od 50% bilo bez ostalih promjena. Metastaze su bile prisutne u 22/103 (21,4%) bolesnika.

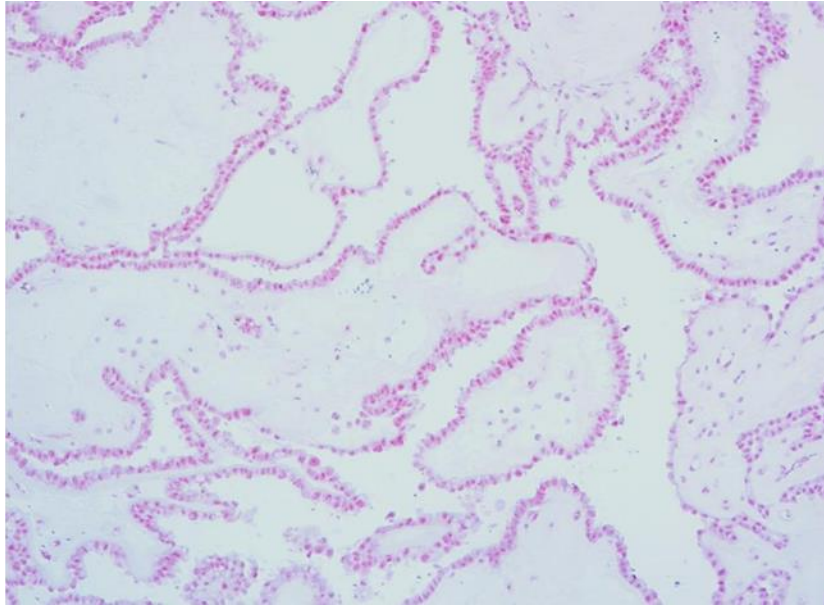
Izraženost estrogenskih receptora beta u citoplazmi i u >50% stanica bila je pozitivna u 63 (60,6%) bolesnika, dok je u jezgri zabilježena negativna reakcija u 47 (45,2%) bolesnika.



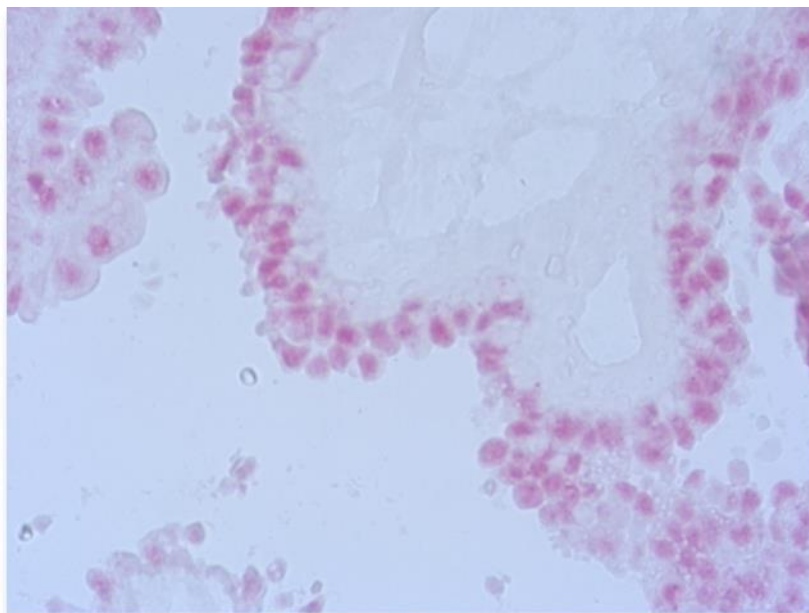
Slika 2. Pozitivna reakcija ER beta u citoplazmama stanica papilarnog karcinoma (x 100)



Slika 3. Pozitivna reakcija ER beta u citoplazmama stanica papilarnog karcinoma (x 400)



Slika 4. Pozitivna reakcija ER beta u jezgrama stanica papilarnog karcinoma (x100)



Slika 5. Pozitivna reakcija ER beta u jezgrama stanica papilarnog karcinoma (x 400)

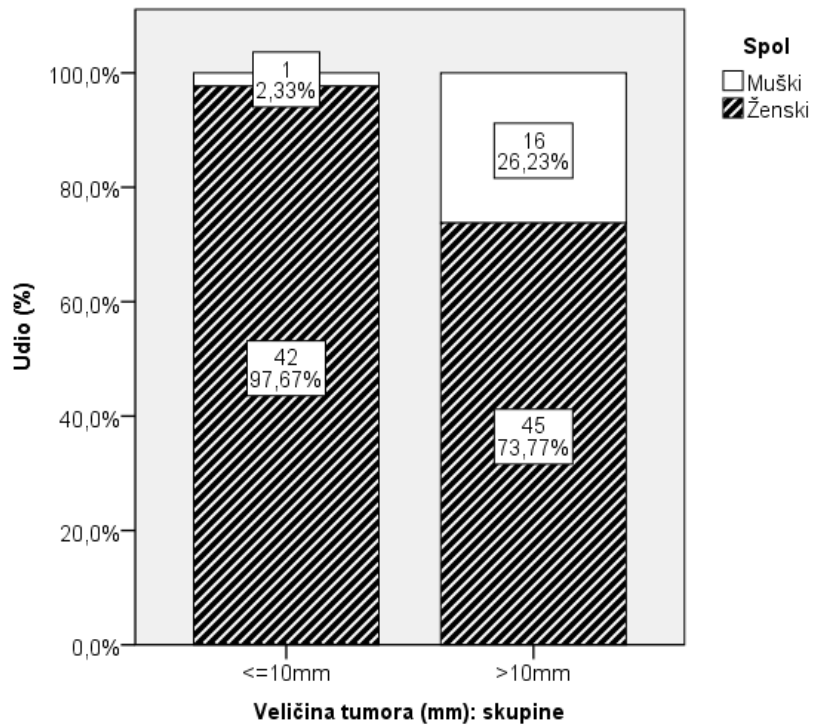
Tablica 3. Usporedba pojedinih kliničkih varijabli u odnosu na veličinu tumora (manji i veći od 10 mm):  $X^2$  test

		Veličina tumora (mm): skupine			
		≤10mm		>10mm	
		N	%	N	%
Spol*	Muški	1	2,30%	16	26,20%
	Ženski	42	97,70%	45	73,80%
Dobne skupine	<50 godina	20	46,50%	30	49,20%
	≥50 godina	23	53,50%	31	50,80%
Lokalizacija	Lijevo	16	37,20%	21	34,40%
	Desno	20	46,50%	33	54,10%
	Istmus	4	9,30%	4	6,60%
	Obostrano	3	7,00%	3	4,90%
Histološki podtip tumora	Klasični	24	55,80%	30	49,20%
	Folikularni	5	11,60%	9	14,80%
	Sklerozirajući	5	11,60%	6	9,80%
	Onkocitni	4	9,30%	4	6,60%
	Ostalo	5	11,60%	12	19,70%
Intraglandularna diseminacija	Ne	32	74,40%	39	63,90%
	Da	11	25,60%	22	36,10%
Metastaze	Ne	36	83,70%	45	75,00%
	Da	7	16,30%	15	25,00%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	18	41,90%	36	59,00%
	Adenom	4	9,30%	4	6,60%
	Hashimoto	10	23,30%	9	14,80%
	Ostalo	11	25,60%	12	19,70%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	28	65,10%	46	75,40%
	Da	15	34,90%	15	24,60%
ER β U CITOPLAZMI %	Negativna reakcija	8	18,60%	11	18,00%
	<10%	2	4,70%	7	11,50%
	10-50%	4	9,30%	9	14,80%
	>50%	29	67,40%	34	55,70%
ER β U JEZGRI %	Negativna reakcija	20	46,50%	27	44,30%
	<10%	8	18,60%	6	9,80%
	10-50%	9	20,90%	16	26,20%
	>50%	6	14,00%	12	19,70%

\*P<0,05

Tablica 4. Istaknute vrijednosti testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 3.

		<b>Veličina tumora (mm): skupine</b>
<b>Spol</b>	$X^2$ test	10,539
	Df	1
	P	<b>0,001</b>
Dobne skupine	$X^2$ test	0,072
	Df	1
	P	0,789
Lokalizacija	$X^2$ test	,772
	Df	3
	P	0,856
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	1,719
	Df	4
	P	0,787
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	1,280
	Df	1
	P	0,258
Metastaze	$X^2$ test	1,134
	Df	1
	P	0,287
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	3,073
	Df	3
	P	0,381
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	1,302
	Df	1
	P	0,254
ER $\beta$ U CITOPLAZMI %	$X^2$ test	2,532
	Df	3
	P	0,470
ER $\beta$ U JEZGRI %	$X^2$ test	2,240
	Df	3
	P	0,524



Slika 6. Razlike u veličini tumora u odnosu na spol

Tablice 3. i 4. prikazuju usporedbu pojedinih kliničkih varijabli u odnosu na veličinu tumora (manji i veći od 10 mm). Jedina značajna razlika je zabilježena u spolu: veći tumori su zastupljeniji u muškaraca. Značajne razlike su prikazane na Slici 1.

Tablica 5. Usporedba pojedinih kliničkih varijabli u odnosu na spol: X<sup>2</sup> test

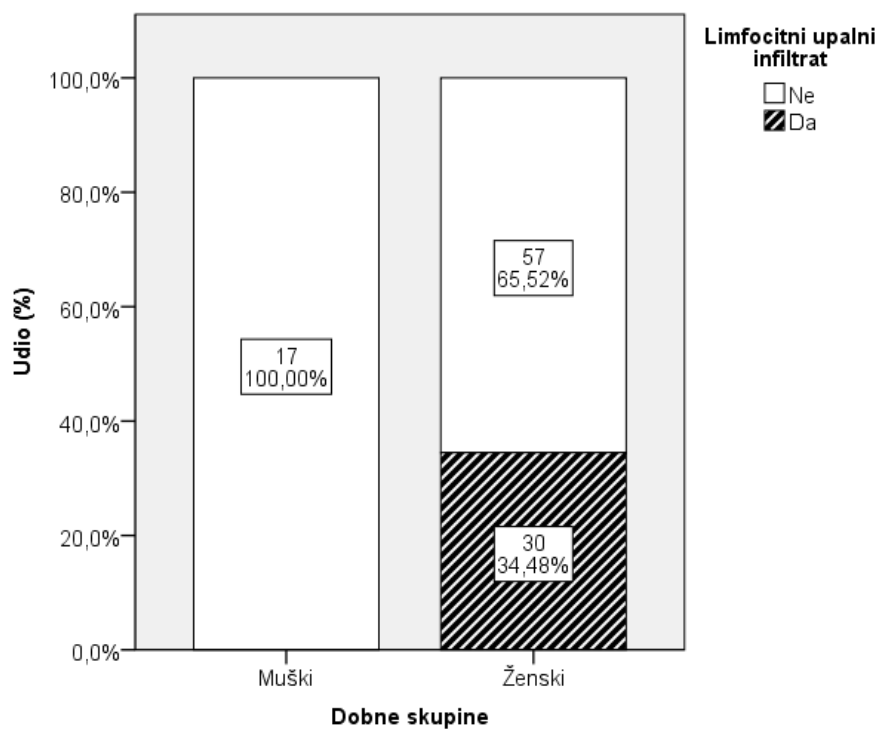
		Spol			
		Muški		Ženski	
		N	%	N	%
Dobne skupine	<50 godina	7	41,2%	43	49,4%
	≥50 godina	10	58,8%	44	50,6%
Lokalizacija	Lijevo	8	47,1%	29	33,3%
	Desno	7	41,2%	46	52,9%
	Istmus	2	11,8%	6	6,9%
	Obostrano	0	0,0%	6	6,9%
Histološki podtip tumora	Klasični	7	41,2%	47	54,0%
	Folikularni	2	11,8%	12	13,8%
	Sklerozirajući	3	17,6%	8	9,2%
	Onkocitni	1	5,9%	7	8,0%
	Ostalo	4	23,5%	13	14,9%
<b>Veličina tumora (mm): skupine*</b>	≤10mm	1	5,9%	42	48,3%
	>10mm	16	94,1%	45	51,7%
Intraglandularna diseminacija	Ne	11	64,7%	60	69,0%
	Da	6	35,3%	27	31,0%
Metastaze	Ne	14	82,4%	67	77,9%
	Da	3	17,6%	19	22,1%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	10	58,8%	44	50,6%
	Adenom	2	11,8%	6	6,9%
	Hashimoto	1	5,9%	18	20,7%
	Ostalo	4	23,5%	19	21,8%
<b>Limfocitni upalni infiltrat*</b>	Ne	17	100,0%	57	65,5%
	Da	0	0,0%	30	34,5%
ER BETA U CITOPLAZMI %	Negativna reakcija	4	23,5%	15	17,2%
	<10%	1	5,9%	8	9,2%
	10-50%	2	11,8%	11	12,6%
	>50%	10	58,8%	53	60,9%
ER BETA U JEZGRI %	Negativna reakcija	9	52,9%	38	43,7%
	<10%	0	0,0%	14	16,1%
	10-50%	4	23,5%	21	24,1%
	>50%	4	23,5%	14	16,1%

\*P<0,05



Tablica 6. Istaknute vrijednosti testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 5.

		<b>Spol</b>
Dobne skupine	$X^2$ test	0,388
	Df	1
	P	0,534
Lokalizacija	$X^2$ test	2,745
	Df	3
	P	0,433
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	2,184
	Df	4
	P	0,702
<b>Veličina tumora (mm): skupine</b>	$X^2$ test	10,539
	Df	1
	P	<b>0,001</b>
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	,119
	Df	1
	P	,730
Metastaze	$X^2$ test	,167
	Df	1
	P	0,683
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	2,350
	Df	3
	P	0,503
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	8,239
	Df	1
	P	<b>0,004</b>
ER BETA U CITOPLAZMI %	$X^2$ test	,507
	Df	3
	P	0,917
ER BETA U JEZGRI %	$X^2$ test	3,462
	Df	3
	P	0,326



Slika 7. Razlike u zastupljenosti limfocitnog upalnog infiltrata u odnosu na spol

Tablice 5. i 6. prikazuju usporedbu pojedinih kliničkih varijabli u odnosu na spol. Značajne razlike su zabilježene u veličini tumora ( $p < 0,001$ ) (shodno tablicama 3 i 4) te limfocitnom infiltratu ( $p < 0,004$ ) koji je bio značajno češći u žena (u muškaraca nije bilo ni jednog pozitivnog limfocitnog infiltrata). Značajne razlike su prikazane na Slici 2.

Tablica 7. Usporedba pojedinih kliničkih parametara između žena starijih i mlađih od 50 godina: X<sup>2</sup> test

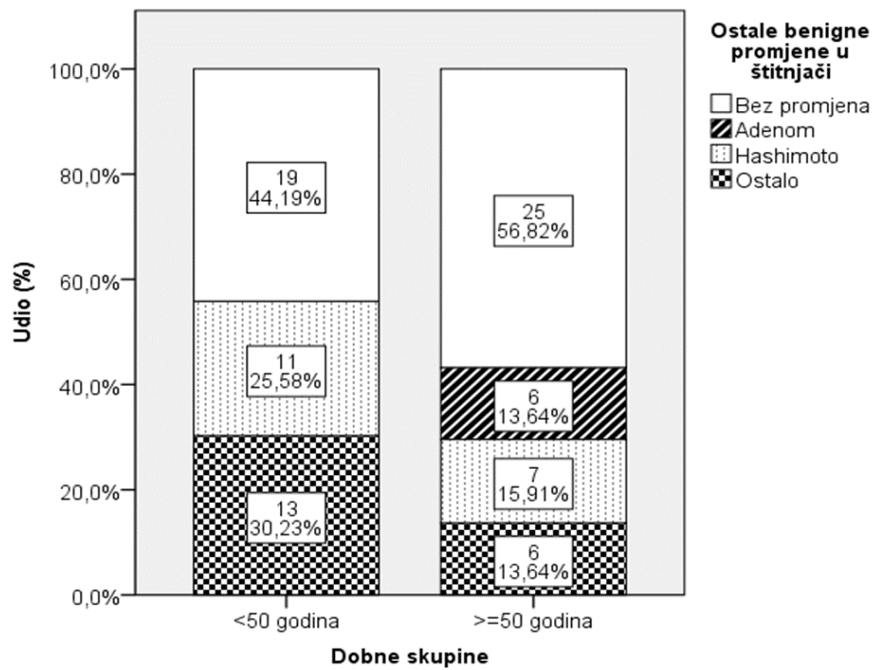
SAMO ŽENE		Dobne skupine			
		<50 godina		≥50 godina	
		N	%	N	%
Lokalizacija	Lijevo	17	39,5%	12	27,3%
	Desno	22	51,2%	24	54,5%
	Istmus	2	4,7%	4	9,1%
	Obostrano	2	4,7%	4	9,1%
Histološki podtip tumora	Klasični	26	60,5%	21	47,7%
	Folikularni	8	18,6%	4	9,1%
	Sklerozirajući	4	9,3%	4	9,1%
	Onkocitni	1	2,3%	6	13,6%
	Ostalo	4	9,3%	9	20,5%
Veličina tumora (mm): skupine	≤10mm	20	46,5%	22	50,0%
	>10mm	23	53,5%	22	50,0%
Intraglandularna diseminacija	Ne	30	69,8%	30	68,2%
	Da	13	30,2%	14	31,8%
Metastaze	Ne	32	74,4%	35	81,4%
	Da	11	25,6%	8	18,6%
<b>Ostale benigne promjene u štitnjači*</b>	Bez promjena	19	44,2%	25	56,8%
	Adenom	0	0,0%	6	13,6%
	Hashimoto	11	25,6%	7	15,9%
	Ostalo	13	30,2%	6	13,6%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	29	67,4%	28	63,6%
	Da	14	32,6%	16	36,4%
ER BETA U CITOPLAZMI %	Negativna reakcija	12	27,9%	3	6,8%
	<10%	4	9,3%	4	9,1%
	10-50%	6	14,0%	5	11,4%
	>50%	21	48,8%	32	72,7%
<b>ER BETA U JEZGRI %*</b>	Negativna reakcija	18	41,9%	20	45,5%
	<10%	5	11,6%	9	20,5%
	10-50%	8	18,6%	13	29,5%
	>50%	12	27,9%	2	4,5%

\*P<0,05

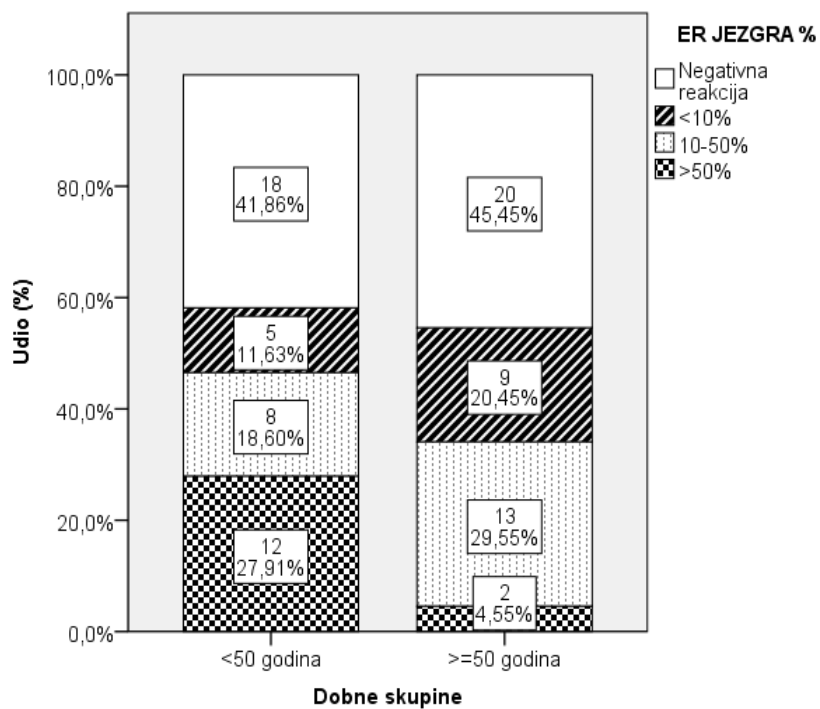
Tablica 8. Istaknute vrijednosti testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 7.

		<b>Dobne skupine</b>
Lokalizacija	$X^2$ test	2,271
	Df	3
	P	0,518
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	7,349
	Df	4
	P	0,119
Veličina tumora (mm): skupine	$X^2$ test	0,106
	Df	1
	P	0,745
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	0,026
	Df	1
	P	0,873
Metastaze	$X^2$ test	0,608
	Df	1
	P	0,436
<b>Ostale benigne promjene u štitnjači</b>	$X^2$ test	10,276
	Df	3
	P	<b>0,016</b>
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	0,139
	Df	1
	P	0,709
ER CITO %	$X^2$ test	7,763
	Df	3
	P	0,051
<b>ER JEZGRA %</b>	$X^2$ test	9,571
	Df	3
	P	<b>0,023</b>

Tablica 7. i 8. prikazuju usporedbu pojedinih kliničkih parametara između žena starijih i mladih od 50 godina. Značajne su razlike u raspodjeli ostalih benignih promjena u štitnjači (u mlađih žena su češći Hashimoto i ostale benigne promjene) te izraženosti ER  $\beta$  receptora u jezgri: u mlađih žena značajno češća je bila izraženost u >50% stanica. Značajne razlike su prikazane na Slikama 3 i 4.



Slika 8. Razlike u raspodjeli ostalih benignih bolesti štitnjače obzirom na dob žena



Slika 9. Razlike u izraženostima ER  $\beta$  receptora u jezgri obzirom na dob žena

Tablica 9. Razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u citoplazmi između pojedinih kliničkih varijabli:  $X^2$  test

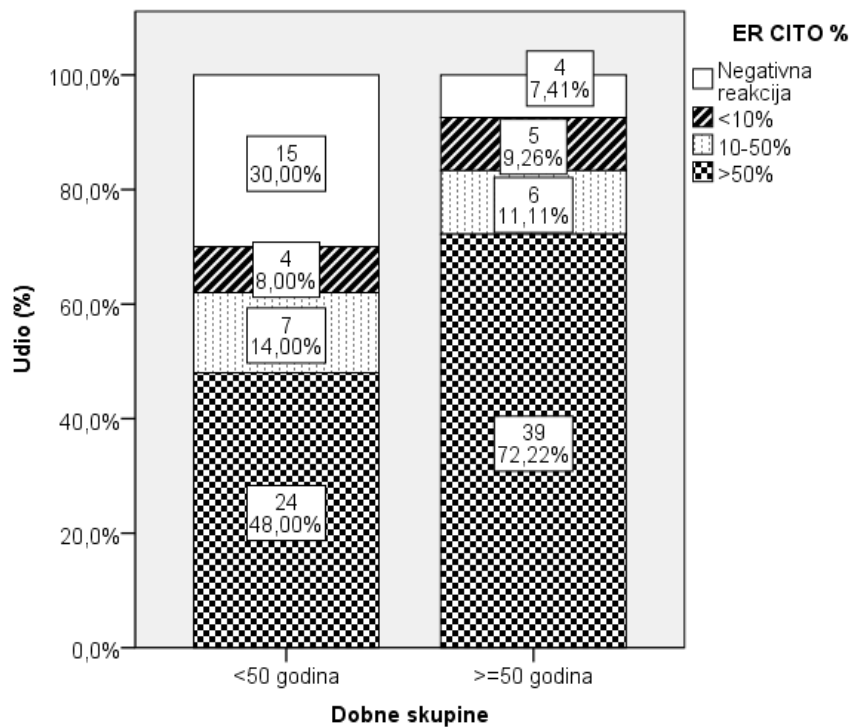
		ER CITO %							
		Negativna reakcija		<10%		10-50%		>50%	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Spol	Muški	4	23,5%	1	5,9%	2	11,8%	10	58,8%
	Ženski	15	17,2%	8	9,2%	11	12,6%	53	60,9%
Dobne skupine*	<50 godina	15	30,0%	4	8,0%	7	14,0%	24	48,0%
	$\geq$ 50 godina	4	7,4%	5	9,3%	6	11,1%	39	72,2%
Lokalizacija	Lijevo	5	13,5%	5	13,5%	2	5,4%	25	67,6%
	Desno	13	24,5%	2	3,8%	8	15,1%	30	56,6%
	Istmus	1	12,5%	0	0,0%	1	12,5%	6	75,0%
	Obostrano	0	0,0%	2	33,3%	2	33,3%	2	33,3%
Histološki podtip tumora	Klasični	8	14,8%	4	7,4%	7	13,0%	35	64,8%
	Folikularni	6	42,9%	2	14,3%	2	14,3%	4	28,6%
	Sklerozirajući	1	9,1%	1	9,1%	1	9,1%	8	72,7%
	Onkocitni	2	25,0%	0	0,0%	0	0,0%	6	75,0%
	Ostalo	2	11,8%	2	11,8%	3	17,6%	10	58,8%
Veličina tumora (mm): skupine	$\leq$ 10mm	8	18,6%	2	4,7%	4	9,3%	29	67,4%
	>10mm	11	18,0%	7	11,5%	9	14,8%	34	55,7%
Intraglandularna diseminacija	Ne	13	18,3%	4	5,6%	6	8,5%	48	67,6%
	Da	6	18,2%	5	15,2%	7	21,2%	15	45,5%
Metastaze	Ne	14	17,3%	7	8,6%	8	9,9%	52	64,2%
	Da	5	22,7%	2	9,1%	4	18,2%	11	50,0%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	11	20,4%	5	9,3%	9	16,7%	29	53,7%
	Adenom	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	8	100,0%
	Hashimoto	3	15,8%	2	10,5%	2	10,5%	12	63,2%
	Ostalo	5	21,7%	2	8,7%	2	8,7%	14	60,9%
Limfocitni upalni infiltrate	Ne	15	20,3%	6	8,1%	10	13,5%	43	58,1%
	Da	4	13,3%	3	10,0%	3	10,0%	20	66,7%

\* $P < 0,05$

Tablica 10. Istaknute vrijednosti testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 9.

		<b>ER <math>\beta</math> U CITOPLAZMI %</b>
Spol	$X^2$ test	0,507
	Df	3
	P	0,917
<b>Dobne skupine</b>	$X^2$ test	9,989
	Df	3
	P	<b>0,019</b>
Lokalizacija	$X^2$ test	15,525
	Df	9
	P	0,077
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	12,166
	Df	12
	P	0,432
Veličina tumora (mm): skupine	$X^2$ test	2,532
	Df	3
	P	0,470
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	7,118
	Df	3
	P	0,068
Metastaze	$X^2$ test	1,876
	Df	3
	P	0,598
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	7,170
	Df	9
	P	0,619
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	1,119
	Df	3
	P	0,772

Tablice 9 i 10. prikazuju razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  receptora u citoplazmi između pojedinih kliničkih varijabli. Jedine značajne povezanosti bile su s dobi bolesnika: negativna izraženost je češća u dobi ispod 50 godina, a izrazita pozitivnost u starijoj dobi dok je kod ER jezgre situacija obrnuta, odnosno kod mlađih ispitanika je izraženost veća. Značajne razlike prikazane su na Slici 5.



Slika 10. Razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u citoplazmi u odnosu na dobne skupine



Tablica 11. Razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u jezgri između pojedinih kliničkih varijabli: X<sup>2</sup> test

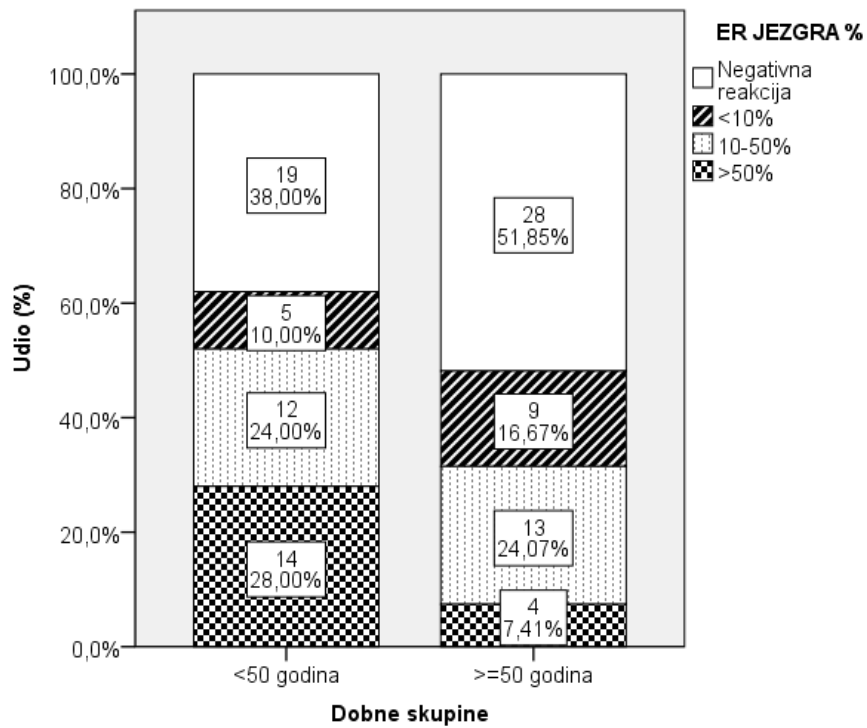
		ER $\beta$ U JEZGRI %							
		Negativna reakcija		<10%		10-50%		>50%	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Spol	Muški	9	52,9%	0	0,0%	4	23,5%	4	23,5%
	Ženski	38	43,7%	14	16,1%	21	24,1%	14	16,1%
Dobne skupine*	<50 godina	19	38,0%	5	10,0%	12	24,0%	14	28,0%
	≥50 godina	28	51,9%	9	16,7%	13	24,1%	4	7,4%
Lokalizacija	Lijevo	19	51,4%	7	18,9%	4	10,8%	7	18,9%
	Desno	22	41,5%	5	9,4%	15	28,3%	11	20,8%
	Istmus	5	62,5%	1	12,5%	2	25,0%	0	0,0%
	Obostrano	1	16,7%	1	16,7%	4	66,7%	0	0,0%
Histološki podtip tumora	Klasični	24	44,4%	9	16,7%	12	22,2%	9	16,7%
	Folikularni	5	35,7%	1	7,1%	5	35,7%	3	21,4%
	Sklerozirajući	5	45,5%	1	9,1%	3	27,3%	2	18,2%
	Onkocitni	5	62,5%	1	12,5%	1	12,5%	1	12,5%
	Ostalo	8	47,1%	2	11,8%	4	23,5%	3	17,6%
Veličina tumora (mm): skupine	≤10mm	20	46,5%	8	18,6%	9	20,9%	6	14,0%
	>10mm	27	44,3%	6	9,8%	16	26,2%	12	19,7%
Intraglandularna diseminacija	Ne	36	50,7%	9	12,7%	15	21,1%	11	15,5%
	Da	11	33,3%	5	15,2%	10	30,3%	7	21,2%
Metastaze	Ne	40	49,4%	9	11,1%	19	23,5%	13	16,0%
	Da	7	31,8%	4	18,2%	6	27,3%	5	22,7%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	22	40,7%	5	9,3%	16	29,6%	11	20,4%
	Adenom	5	62,5%	2	25,0%	1	12,5%	0	0,0%
	Hashimoto	8	42,1%	5	26,3%	4	21,1%	2	10,5%
	Ostalo	12	52,2%	2	8,7%	4	17,4%	5	21,7%
Limfocitni upalni infiltrate	Ne	36	48,6%	7	9,5%	16	21,6%	15	20,3%
	Da	11	36,7%	7	23,3%	9	30,0%	3	10,0%

\*P<0,05

Tablice 11 i 12. prikazuju razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u jezgri između pojedinih kliničkih varijabli. Za razliku od izraženosti ER  $\beta$  receptora u citoplazmi, izraženost u jezgri je značajno veća u mlađoj dobnoj skupini. Značajne razlike prikazane su na Slici 6.

Tablica 12. Rezultati testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 11.

		<b>ER <math>\beta</math> U JEZGRI %</b>
Spol	$X^2$ test	3,462
	Df	3
	P	0,326
<b>Dobne skupine</b>	$X^2$ test	8,320
	Df	3
	P	<b>0,040</b>
Lokalizacija	$X^2$ test	14,064
	Df	9
	P	0,120
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	3,478
	Df	12
	P	0,991
Veličina tumora (mm): skupine	$X^2$ test	2,240
	Df	3
	P	0,524
Intraglandulama diseminacija	$X^2$ test	2,822
	Df	3
	P	0,420
Metastaze	$X^2$ test	2,400
	Df	3
	P	0,494
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	9,357
	Df	9
	P	0,405
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	5,655
	Df	3
	P	0,130



Slika 11. Razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u jezgri u odnosu na dobne skupine

Tablica 13. Razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u citoplazmi (više i manje od 50%) između pojedinih kliničkih varijabli: X<sup>2</sup> test

		ER $\beta$ U CITOPLAZMI % skupine			
		<50%		>50%	
		N	%	N	%
Spol	Muški	7	17,1%	10	15,9%
	Ženski	34	82,9%	53	84,1%
<b>Dobne skupine*</b>	<50 godina	26	63,4%	24	38,1%
	$\geq$ 50 godina	15	36,6%	39	61,9%
Lokalizacija	Lijevo	12	29,3%	25	39,7%
	Desno	23	56,1%	30	47,6%
	Istmus	2	4,9%	6	9,5%
	Obostrano	4	9,8%	2	3,2%
Histološki podtip tumora	Klasični	19	46,3%	35	55,6%
	Folikularni	10	24,4%	4	6,3%
	Sklerozirajući	3	7,3%	8	12,7%
	Onkocitni	2	4,9%	6	9,5%
	Ostalo	7	17,1%	10	15,9%
Veličina tumora (mm): skupine	$\leq$ 10mm	14	34,1%	29	46,0%
	>10mm	27	65,9%	34	54,0%
Intraglandularna diseminacija*	Ne	23	56,1%	48	76,2%
	Da	18	43,9%	15	23,8%
Metastaze	Ne	29	72,5%	52	82,5%
	Da	11	27,5%	11	17,5%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	25	61,0%	29	46,0%
	Adenom	0	0,0%	8	12,7%
	Hashimoto	7	17,1%	12	19,0%
	Ostalo	9	22,0%	14	22,2%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	31	75,6%	43	68,3%
	Da	10	24,4%	20	31,7%

\*P<0,05

Tablica 14. Rezultati testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 13.

		<b>ER <math>\beta</math> U CITO % skupine</b>
Spol	$X^2$ test	0,026
	Df	1
	P	0,872
<b>Dobne skupine</b>	$X^2$ test	6,378
	Df	1
	P	<b>0,012</b>
Lokalizacija	$X^2$ test	3,669
	Df	3
	P	0,299
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	7,810
	Df	4
	P	0,099
Veličina tumora (mm): skupine	$X^2$ test	1,447
	Df	1
	P	0,229
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	4,629
	Df	1
	P	<b>0,031</b>
Metastaze	$X^2$ test	1,468
	Df	1
	P	0,226
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	6,328
	Df	3
	P	0,097
Limfocitni upalni infiltrate	$X^2$ test	0,655
	Df	1
	P	0,418

Tablica 13. i 14. prikazuju razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u citoplazmi (više i manje od 50%) između pojedinih kliničkih varijabli. Značajne su razlike u dobnim skupinama, ali i u intraglandularnoj diseminaciji (češća je u skupini ekspresije manje od 50%).

Tablica 15. Razlike imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u jezgri (više i manje od 50%) između pojedinih kliničkih varijabli:  $\chi^2$  test

		ER JEZGRA % skupine			
		<50%		>50%	
		N	%	N	%
Spol	Muški	13	15,1%	4	22,2%
	Ženski	73	84,9%	14	77,8%
<b>Dobne skupine*</b>	<50 godina	36	41,9%	14	77,8%
	$\geq$ 50 godina	50	58,1%	4	22,2%
Lokalizacija	Lijevo	30	34,9%	7	38,9%
	Desno	42	48,8%	11	61,1%
	Istmus	8	9,3%	0	0,0%
	Obostrano	6	7,0%	0	0,0%
Histološki podtip tumora	Klasični	45	52,3%	9	50,0%
	Folikularni	11	12,8%	3	16,7%
	Sklerozirajući	9	10,5%	2	11,1%
	Onkocitni	7	8,1%	1	5,6%
	Ostalo	14	16,3%	3	16,7%
Veličina tumora (mm): skupine	$\leq$ 10mm	37	43,0%	6	33,3%
	>10mm	49	57,0%	12	66,7%
Intraglandularna diseminacija	Ne	60	69,8%	11	61,1%
	Da	26	30,2%	7	38,9%
Metastaze	Ne	68	80,0%	13	72,2%
	Da	17	20,0%	5	27,8%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	43	50,0%	11	61,1%
	Adenom	8	9,3%	0	0,0%
	Hashimoto	17	19,8%	2	11,1%
	Ostalo	18	20,9%	5	27,8%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	59	68,6%	15	83,3%
	Da	27	31,4%	3	16,7%

\* $P < 0,05$

Tablica 16. Rezultati testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 15.

		<b>ER JEZGRA % skupine</b>
Spol	$X^2$ test	0,550
	Df	1
	P	0,458
<b>Dobne skupine</b>	$X^2$ test	7,692
	Df	1
	P	<b>0,006</b>
Lokalizacija	$X^2$ test	3,437
	Df	3
	P	0,329
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	,318
	Df	4
	P	0,989
Veličina tumora (mm): skupine	$X^2$ test	0,576
	Df	1
	P	0,448
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	0,515
	Df	1
	P	0,473
Metastaze	$X^2$ test	0,535
	Df	1
	P	0,465
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	2,954
	Df	3
	P	0,399
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	1,573
	Df	1
	P	0,210

Tablice 15. i 16. prikazuju razlike imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  receptora u jezgri (više i manje od 50%) između pojedinih kliničkih varijabli. Značajne su razlike u dobnim skupinama: veća izraženost u mlađih bolesnika.

Tablica 17. Razlike imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  receptora u citoplazmi (više i manje od 50%) između pojedinih kliničkih varijabli u žena:  $X^2$  test

		ER $\beta$ U CITOPLAZMI % ŽENE			
		<50%		>50%	
		N	%	N	%
Dobne skupine*	<50 godina	22	64,7%	21	39,6%
	$\geq$ 50 godina	12	35,3%	32	60,4%
Lokalizacija	Lijevo	9	26,5%	20	37,7%
	Desno	19	55,9%	27	50,9%
	Istmus	2	5,9%	4	7,5%
	Obostrano	4	11,8%	2	3,8%
Histološki podtip tumora	Klasični	17	50,0%	30	56,6%
	Folikularni	9	26,5%	3	5,7%
	Sklerozirajući	1	2,9%	7	13,2%
	Onkocitni	2	5,9%	5	9,4%
	Ostalo	5	14,7%	8	15,1%
Veličina tumora (mm): skupine	$\leq$ 10mm	14	41,2%	28	52,8%
	>10mm	20	58,8%	25	47,2%
Intraglandularna diseminacija	Ne	20	58,8%	40	75,5%
	Da	14	41,2%	13	24,5%
Metastaze	Ne	25	75,8%	42	79,2%
	Da	8	24,2%	11	20,8%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	21	61,8%	23	43,4%
	Adenom	0	0,0%	6	11,3%
	Hashimoto	6	17,6%	12	22,6%
	Ostalo	7	20,6%	12	22,6%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	24	70,6%	33	62,3%
	Da	10	29,4%	20	37,7%

\* $P < 0,05$

Tablice 17. do 20. prikazuju razlike u imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u jezgri i u citoplazmi (više i manje od 50%) između pojedinih kliničkih varijabli u žena. Jedine značajne razlike odnose se na dobne skupine.



Tablica 18. Rezultati testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 17.

		<b>ER <math>\beta</math> U CITOPLAZMI % skupine</b>
<b>Dobne skupine</b>	$X^2$ test	5,213
	Df	1
	P	<b>0,022</b>
Lokalizacija	$X^2$ test	2,885
	Df	3
	P	0,410
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	9,371
	Df	4
	P	0,052
Veličina tumora (mm): skupine	$X^2$ test	1,127
	Df	1
	P	0,289
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	2,682
	Df	1
	P	0,101
Metastaze	$X^2$ test	0,144
	Df	1
	P	0,705
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	5,521
	Df	3
	P	0,137
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	0,635
	Df	1
	P	0,425

Tablica 19. Razlike imunohistokemijskoj izraženosti ER  $\beta$  u jezgri (više i manje od 50%) između pojedinih kliničkih varijabli u žena:  $X^2$  test

		ER $\beta$ U JEZGRI % ŽENE			
		<50%		>50%	
		N	%	N	%
Dobne skupine*	<50 godina	31	42,5%	12	85,7%
	$\geq$ 50 godina	42	57,5%	2	14,3%
Lokalizacija	Lijevo	25	34,2%	4	28,6%
	Desno	36	49,3%	10	71,4%
	Istmus	6	8,2%	0	0,0%
	Obostrano	6	8,2%	0	0,0%
Histološki podtip tumora	Klasični	39	53,4%	8	57,1%
	Folikularni	10	13,7%	2	14,3%
	Sklerozirajući	7	9,6%	1	7,1%
	Onkocitni	6	8,2%	1	7,1%
	Ostalo	11	15,1%	2	14,3%
Veličina tumora (mm): skupine	$\leq$ 10mm	36	49,3%	6	42,9%
	>10mm	37	50,7%	8	57,1%
Intraglandularna diseminacija	Ne	51	69,9%	9	64,3%
	Da	22	30,1%	5	35,7%
Metastaze	Ne	56	77,8%	11	78,6%
	Da	16	22,2%	3	21,4%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	36	49,3%	8	57,1%
	Adenom	6	8,2%	0	0,0%
	Hashimoto	16	21,9%	2	14,3%
	Ostalo	15	20,5%	4	28,6%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	46	63,0%	11	78,6%
	Da	27	37,0%	3	21,4%

\* $P < 0,05$

Tablica 20. Rezultati testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 19.

		<b>ER BETA U JEZGRI % skupine</b>
<b>Dobne skupine</b>	$X^2$ test	8,790
	Df	1
	P	<b>0,003</b>
Lokalizacija	$X^2$ test	3,501
	Df	3
	P	0,321
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	0,131
	Df	4
	P	0,998
Veličina tumora (mm): skupine	$X^2$ test	0,196
	Df	1
	P	0,658
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	0,171
	Df	1
	P	0,679
Metastaze	$X^2$ test	0,004
	Df	1
	P	0,948
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	1,970
	Df	3
	P	0,579
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	1,259
	Df	1
	P	0,262

Tablica 21. Razlike između pojedinih kliničkih varijabli u odnosu na veličinu tumora u žena: X<sup>2</sup> test

		Veličina tumora (mm): skupine			
		<=10mm		>10mm	
		N	%	N	%
Dobne skupine	<50 godina	20	47,6%	23	51,1%
	≥50 godina	22	52,4%	22	48,9%
Lokalizacija	Lijevo	15	35,7%	14	31,1%
	Desno	20	47,6%	26	57,8%
	Istmus	4	9,5%	2	4,4%
	Obostrano	3	7,1%	3	6,7%
Histološki podtip tumora	Klasični	23	54,8%	24	53,3%
	Folikularni	5	11,9%	7	15,6%
	Sklerozirajući	5	11,9%	3	6,7%
	Onkocitni	4	9,5%	3	6,7%
	Ostalo	5	11,9%	8	17,8%
Intraglandularna diseminacija	Ne	32	76,2%	28	62,2%
	Da	10	23,8%	17	37,8%
Metastaze	Ne	35	83,3%	32	72,7%
	Da	7	16,7%	12	27,3%
Ostale benigne promjene u štitnjači	Bez promjena	17	40,5%	27	60,0%
	Adenom	4	9,5%	2	4,4%
	Hashimoto	10	23,8%	8	17,8%
	Ostalo	11	26,2%	8	17,8%
Limfocitni upalni infiltrat	Ne	27	64,3%	30	66,7%
	Da	15	35,7%	15	33,3%
ER β U CITOPLAZMI % skupine	<50%	14	33,3%	20	44,4%
	>50%	28	66,7%	25	55,6%
ER β U JEZGRI % skupine	<50%	36	85,7%	37	82,2%
	>50%	6	14,3%	8	17,8%

Tablica 22. Rezultati testiranja  $X^2$  testom za Tablicu 21.

		<b>Veličina tumora (mm): skupine</b>
Dobne skupine	$X^2$ test	0,106
	Df	1
	P	0,745
Lokalizacija	$X^2$ test	1,38 <sup>2</sup>
	Df	3
	P	0,710
Histološki podtip tumora	$X^2$ test	1,588
	Df	4
	P	0,811
Intraglandularna diseminacija	$X^2$ test	1,980
	Df	1
	P	0,159
Metastaze	$X^2$ test	1,404
	Df	1
	P	0,236
Ostale benigne promjene u štitnjači	$X^2$ test	3,536
	Df	3
	P	0,316
Limfocitni upalni infiltrat	$X^2$ test	0,055
	Df	1
	P	0,815
ER $\beta$ U CITOPLAZMI % skupine	$X^2$ test	1,1 <sup>27</sup>
	Df	1
	P	0,289
ER $\beta$ U JEZGRI % skupine	$X^2$ test	0,196
	Df	1
	P	0,658

Tablice 21. i 22. prikazuju razlike između pojedinih kliničkih varijabli u odnosu na veličinu tumora u žena. Nema značajnih razlika.

## 6. RASPRAVA

Žene u premenopauzi češće oboljevaju od papilarnog karcinoma, no imaju i bolju prognozu u odnosu na žene u postmenopauzi te muškarce (101). Ostala oboljenja štitnjače su također znatno češća u premenopauzalnih žena. U ovom radu je od 104 ispitivana bolesnika s papilarnim karcinomom, njih 87 bilo ženskog spola, a benigne promjene i Hashimotov tireoiditis su bile znatno češće zastupljene u žena ( $P < 0,001$ ).

Značajni prognostički parametri prema Passleru i sur. (102) su dob veća od 45 godina u trenutku dijagnosticiranja primarnog tumora, širenje tumora izvan kapsule, rastuća veličina tumora, udaljene metastaze, metastaze u cervikalne limfne čvorove, te „tall cell“ histološka varijanta. Navedeni parametri su bili statistički povezani s lošijom prognozom, dok spol, multifokalnost te folikularna i difuzna sklerozirajuća varijanta nisu značajno utjecali na prognozu. Pozitivni limfni čvorovi su bili važni u univarijantnoj analizi u pacijenata starijih od 45 godina, dok kod mlađih broj pozitivnih limfnih čvorova nije bio prognostički značajan. Dobna granica od 45 godina je presudna za prognozu i prema SZO, koja razdvaja TNM klasifikaciju za bolesnike mlađe i starije od 45 godina. Tumori veći od 2 cm (T1) donose povećani rizik od razvoja udaljenih metastaza (103). Frazell i sur. (104) su na uzorku od 441 bolesnika s papilarnim karcinomom primjetili veću prevalenciju velikih tumora u muškaraca, pa je tako tumore manje od 5 cm imalo manje od 60 % muškaraca, u odnosu na 80 % žena s tumorima manjim od 5cm. Time objašnjavaju i smanjenu stopu preživljenja kod muškaraca u odnosu na žene uz naravno i stariju dob. U vlastitom radu muškarci su češće imali velike tumore u odnosu na žene ( $P < 0,001$ ).

Intraglandularna diseminacija ili multifokalnost se u literaturi pojavljuje u otprilike 22% PTC. Njena prisutnost ne utječe na preživljenje pod uvjetom da je učinjena totalna tireoidektomija (105). Prema Kimu i sur. (48) multifokalnost se kod papilarnog karcinoma smatra agresivnijom patološkom značajkom te je povezana s povećanim rizikom od povrata ili perzistencije bolesti, a u multivarijantnoj analizi se pokazala neovisnim rizičnim čimbenikom za metastaze u limfne čvorove. Rezultati vlastitog istraživanja pokazali su da je od ukupno trideset i jednog bolesnika s intraglandularnom diseminacijom njih 10 imalo metastaze u limfne čvorove.

Visokostanična varijanta predstavlja biološki i klinički agresivniju formu PTC. Stoga je važno prezentirati bilo koji fokus te vrste stanica u patološkom izvješću, a radi kvalitetnijeg liječenja i praćenja pacijenta zbog rekurencije, distalnih metastaza i transformacije u anaplastični karcinom (106). U vlastitom uzorku samo je jedan pacijent od njih 104 imao tall cell varijantu papilarnog karcinoma, što nije bio značajan uzorak za analizu.

Difuzna sklerozirajuća varijanta papilarnog karcinoma je neuobičajena varijanta te se smatra po nekim autorima smatra prognostički nepovoljnijom. Pojavljuje se u mlađih bolesnika i ima veću incidenciju metastaza u limfne čvorove u usporedbi s klasičnim PTC (98). Prvi put je opisan od strane Vickerija i sur. 1985 (108). Predstavlja samo 1,8 % papilarnih karcinoma u velikim serijama, dok je u vlastitom materijalu čak 10.6 % pacijenata imalo difuzni sklerozirajući podtip.

U ovom istraživanju Hashimotov tireoiditis (HT) je bio prisutan u 19 (18,3%) bolesnika. Hashimoto tireoiditis i ostale benigne promjene su bile značajno zastupljenije u mlađih žena ( $P=0,016$ ). Yoon i sur.(109) su analizirali razlike u kliničkopatološkim čimbenicima, kao što su dob, spol, veličina primarnog tumora, peritireoidna invazija, limfovaskularna invazija, kapsularna invazija, metastaze u centralne limfne čvorove kod pacijenata s ili bez kroničnog limfocitnog tireoiditisa. U komparaciji s pacijentima s papilarnim karcinomom koji nisu imali HT (kronični limfocitni tireoiditis), oni s HT-om su bili mlađi s predominacijom ženskog spola, što su najvažniji i dobro znani prognostički čimbenici kod papilarnog karcinoma. U studiji koegzistencije Hashimotovog tireoiditisa i papilarnog karcinoma, Konturek i sur. (110) su utvrdili da je HT povezan s trostruko većom prevalencijom papilarnog karcinoma. Postoje mišljenja da HT ne determinira, nego odgađa razvoj karcinoma, te da cirkulirajuća antitijela predstavljaju značajni čimbenik u prevenciji razvoja tumora i nodalnih metastaza (111). Shields i sur. (112) su otkrili mutaciju RET/PTC1 gena u 95% slučajeva Hashimotovog tireoiditisa. U istraživanju Lee i sur. (113) bolesnici s papilarnim karcinomom i HT-om tijekom perioda praćenja su u manjem postotku imali rekurenciju tumora u usporedbi s grupom bolesnika koji nisu imali HT. Koegzistirajući Hashimotov tireoiditis smatra se negativnim neovisnim prognostičkim čimbenikom za centralne metastaze u limfne čvorove (114). Paulson i sur. (115) dokazuju manju incidenciju pozitivnih centralnih

limfnih čvorova kod pacijenata s HT-om što ukazuje na potencijalnu protektivnu ulogu u širenju tumora. U studiji Jara i sur.(116) dokazuju da je istovremeno postojanje kroničnog limfocitnog tireoiditisa i karcinoma štitnjače povezano sa boljom prognozom, uključujući i manji broj metastaza u limfnim čvorovima.

Davidson i sur.(117) su u svom uzorku imali incidenciju od 57,9%, dok su u vlastitom istraživanju regionalne metastaze bile prisutne u 22/103 (21,4%) bolesnika.

Limfocitni upalni infiltrat bio je prisutan u 30 (28,8%) bolesnika u vlastitom radu.

Filipović i sur. (118) zaključuju da limfocitna infiltracija tkiva te fagocitoza neoplastičnih stanica od strane makrofaga, igra značajnu ulogu u sprječavanju razvoja udaljenih metastaza, te kao dio imunološkog odgovora ima povoljan učinak na veličinu, invazivnost i ekstrateiroidni rast tumora. Ozata i sur. (119) nalaze da tumori unutar kojih je prisutan limfocitni infiltrat imaju manji rizik od recidiva, te da bi se bolesnike operirane od PTC-a, a koji nisu imali limfocitne infiltrate, trebalo pažljivije pratiti. Prema Matsubayashi i sur. (120) limfocitni infiltrat u i oko papilarnog karcinoma predstavlja povoljan prognostički čimbenik. U njihovom su istraživanju bolesnici s pozitivnim limfnim čvorovima i tumorom proširenim izvan štitnjače koji nisu imali limfocitni infiltrat imali veću stopu rekurencije tumora.

Prema Bagnascu (121) radi se uglavnom o citotoksičnim limfocitima T. Autor je sa sur. radio fenotipsku i klonsku analizu limfocita T u tumoru, metastazi i perifernoj krvi kod 4 bolesnika oboljela od papilarnog karcinoma te ih je uspoređivao sa limfocitima T u perifernoj krvi bolesnika oboljelih od autoimunih bolesti (Graves, Hashimoto). U fenotipu nisu uočene razlike, no funkcijski je proporcija citolitičkih klonova sa znakovima natural killer (NK) –slične aktivnosti bila relativno velika u tumorskim infiltratima.

Također, prema autorici Fiore (32) frekvencija i stupanj limfocitnog infiltrata je veći u papilarnom karcinomu nego u nodoznoj strumi što ukazuje na različite vrste imunološkog odgovora u dva entiteta. Guarino i sur. (122) su utvrdili da papilarni karcinom često sadrži upalni infiltrat sastavljen od limfocita, makrofaga, dendritičnih stanica i mastocita. Njihova uloga nije do kraja shvaćena, no pretpostavlja se da limfocitna infiltracija predstavlja vid imunološke kontrole tumorskog rasta (123). U vlastitom uzorku kod svih 17 muških bolesnika nije bio prisutan limfocitni infiltrat, što



je statistički značajno u odnosu na prisutnost limfocitnog infiltrata kod ženskih bolesnika ( $p < 0,004$ ).

Uloga estrogena kao glavnog ženskog spolnog hormona važna je ne samo u ženskim spolnim organima nego i u brojnim drugim benignim i malignim tkivima gdje je poznato da sudjeluje u proliferaciji stanica. Štoviše dokazan je proliferacijski učinak estrogena na epitel štitnjače *in vitro*, kao i u kulturi stanica papilarnog karcinoma (9, 55). Dong i sur. (46) navode da estradiol (E2) čak promovira metastatsku aktivnost u karcinomima, no detaljni mehanizam djelovanja je i dalje nepoznat. Utvrđivali su prisustvo ER u staničnoj liniji papilarnog karcinoma nazvanoj BCPAP, te dobivene rezultate uspoređivali s izraženošću E-kadherina, vimentina i metal-matriks-proteinaze-9 te učincima E2, agonista ER alfa i agonista ER beta. Stanična linija je izražavala i ER alfa i ER beta. E2 i agonist ER alfa su pojačavali, dok je agonist ER beta inhibirao migraciju i invaziju BCPAP stanica *in vitro*. To indicira da E2 inducira metastatski potencijal stanica papilarnog karcinoma kroz ER alfa i ER beta, a oba receptora imaju različitu ulogu u modulaciji metastaza stanica papilarnog karcinoma.

Od otkrića ER receptora beta 1996. godine za izdvojiti je nekoliko važnijih radova gdje se analizirala izraženost ER u papilarnom karcinomu. Vainman i sur. (124) na patohistološkim uzorcima papilarnih karcinoma od 90 bolesnika ne nalaze niti jedan uzorak pozitivan na ER alfa, no nalaze pozitivitet ER beta u 66,6% tumora. Kod Ceresini i sur. (125) ER beta je bio prisutan u 100% endotelnih stanica i u folikularnom epitelu kao i u 83% papilarnih karcinoma. ER alfa je bio negativan u svim lezijama.

Kawabata i sur. (89) su ispitivali izraženost ER alfa i ER beta kod normalnih štitnjača od fetusa do odrasle dobi, te također u oboljelima od guša, adenoma i karcinoma (ukupno 159 karcinoma). Putem imunohistokemijske reakcije i određivanjem glasničke RNK ispitivali su izraženost ER alfa i beta i 17 beta hidroksteroid dehidrogenaze tip I i II enzima uključenih u interkonverziju između estrona i estradiola. ER beta je u papilarnom karcinomu bio prisutan u 60,3% žena i 58,1% muškaraca. Nije bilo značajne korelacije između ER beta indeksa, te godina, menopauzalnog statusa, benignih i malignih tumora, histološkog tipa. ER alfa nije detektiran u normalnoj štitnjači. Također ER beta je bio značajno jače izražen u folikularnim adenomima nego u folikularnom

karcinomu. Manja bi izraženost ER beta mogla biti povezana sa slabijim preživljenjem (126).

Santin i sur. (127) su u preglednom radu naveli sva značajnija istraživanja vezana uz ER u štitnjači zadnjih dekada, pa je promatrana izraženost i odnos ER koji posreduju genomske efekte estrogena u abnormalnom i normalnom tkivu kao i negenomske putevi. Analiziran je i učinak estrogena na folikularni epitel, uz zaključak da bi mogao promovirati apoptotičku aktivnost.

Obzirom da su ER jezgrini receptori, općeprihvaćeno je načelo po kojemu se njihova izraženost evaluira jezgrinim pozitivitetom. Jezgri pozitivitet ER se smatra jedinim klinički važnim kod karcinoma dojke. Prema autorima Tavangar i sur. (100) prisustvo ER u jezgrama stanica nužno je za njihovu biološku evaluaciju. Autori su analizirali prisustvo ER na velikom uzorku štitnjača, te su podijelili grupe prema menopauzalnom statusu (žene) te odvojili muškarce. Lezije su interpretirane kao pozitivne ako je bilo pozitivno najmanje 10% stanica. Imunoreaktivnost u svim lezijama je bila prisutna u jezgrama, kako se i očekivalo. Pozitivan nalaz je bio prisutan u 21 % neoplastičnih lezija, te u 31% papilarnih karcinoma, no autori ne navode da li se radi o ER alfa ili ER beta. Nije nađena povezanost sa spolom, vaskularnom, limfnom ili kapsularnom invazijom, no nađen je značajno veći udio papilarnih karcinoma s pozitivnim ER u odnosu na ostale neoplastične lezije. Time autori sugeriraju da ER reaktivnost raste s boljom diferenciranošću tumora.

Prijelomna (cut-off) točka kod imunohistokemijske analize je kontroverzna i u karcinomima dojke, te je pokazala da bolesnici koji pokazuju 1% ER alfa pozitivnih stanica karcinoma mogu imati dobrobit od endokrine terapije. Za razliku od ER alfa, kod ER beta nije utvrđena "cut off točka" koja bi definirala ER beta pozitivitet (128).

Jaklić i sur. (129) su analizirali izraženost ER na uzorku od 11 PTC. Uzimali su u obzir samo nuklearni pozitivitet, mada su povremeno primjetili i citoplazmatsko obojenje. Bilo koji postotak pozitiviteta je uzet kao signifikantan. Svih 11 uzoraka je bilo negativno na ER i progesteronske receptore. Također su utvrdili da je alkalna fosfataza senzitivnija od peroksidaze.

Vlastiti rezultati pokazali su da je negativna reakcija u jezgri bila prisutna kod 47/104 bolesnika, što iznosi 45,2%. Pozitivna reakcija ER beta u jezgrama bila je značajno češća u žena mlađih od 50 godina u odnosu na starije žene ( $p=0,023$ ). Također

pozitivitet ER beta u jezgrama  $> 50\%$  bio je značajno veći u bolesnika mlađih od 50 godina bez obzira na spol ( $P=0,006$ ).

Dobiveni vlastiti rezultati imunohistokemijske analize donose svojevrsno iznenađenje. Primjećeno je da je u velikom broju papilarnih karcinoma prisutan citoplazmatski pozitivitet ER beta, tj. u 85 slučajeva što iznosi 81,7 %. Citoplazmatska izraženost bila je statistički značajno veća kod dobne skupine starijih od 50 godina neovisno o spolu ( $P=0,019$ ). Primjetili smo također da je citoplazmatski pozitivitet u  $> 50\%$  stanica prisutan u većem broju uzoraka (60,6%), te je nađena statistički značajna razlika u izraženosti ER beta  $>50\%$  u citoplazmi kod žena starijih od 50 godina u odnosu na mlađe žene ( $P=0,022$ ).

Subcelularnu (ekstranuklearnu) lokalizaciju ER u papilarnom karcinomu među prvima spominju Huang i sur. (23) u čijem je istraživanju izvanjezrena izraženost ER beta bila prisutna u 85,4 % slučajeva PTC (žene) u usporedbi sa 17,9% pozitiviteta u nodoznoj strumi kod žena u reproduktivnoj dobi. U našem uzorku također je citoplazmatski pozitivitet bio prisutan u većini uzoraka. Razina VEGF je bila niža kod grupe bolesnica u reprodukcijskoj dobi s jezgrinim pozitivitetom, dok kod bolesnica u starijoj dobi nije utvđena povezanost izraženosti ER alfa niti ER beta sa Ki 67, VEGF, p53, veličinom tumora, TNM, ili metastazama u limfne čvorove. Zaključuju da se izraženost ER pojavljuje u tri oblika: jezgreni, citoplazmatski i kombinirani, te da bi konstitutivna izraženost jedne od izoformi ER beta, ER beta 1 mogla igrati supresivnu ulogu kroz jezgrine aktivnosti. Obzirom da je izraženost ER beta negativno korelirala i s prisustvom mutiranog p53, snižena razina receptora bi mogla biti povezana s progresijom PTC.

Izvanjezgreni pozitivitet ER je dosada najviše proučavan na tkivu dojke. Taylor i sur. (86) uočavaju određenu citoplazmatsku izraženost ER beta u normalnom epitelu, dok je izraženost jezgrinog i citoplazmatskog ER beta bila snižena u proliferativnoj dojci. ER beta je bio prisutan i u stromi mirujuće dojke, dok ga nije bilo u stromi proliferativne dojke.

I Inoue i sur. (130) su proučavajući ER na diferenciranim karcinomima štitnjače također došli do otkrića da su ER bili lokalizirani pretežno u citoplazmi stanica. Prema Leung i sur. (131) recentne studije na karcinomima dojke dokazuju prisustvo dodatnog bazena ER beta u citoplazmi, u mitohondrijima i na staničnoj membrani, a nuklearna ekspresija

ER beta 1 i 2 korelira s boljim preživljenjem i duljim periodom bez bolesti. No, citoplazmatski ER beta 2 u kombinaciji s nuklearnim ili sam je značio značajno gore preživljenje. Pacijenti sa samo citoplazmatskim pozitivitetom su imali značajnije lošiju prognozu, a ekspresija je bila povezana s tumorima visokog gradusa, udaljenim metastazama, rekurencijom i smrću. Jezgri pozitivitet ER beta je bio značajno prediktivan za bolji odgovor na endokrinu terapiju. Zaključak je da različite uloge ER beta izoformi na različitim celularnim lokalizacijama imaju jasno prognostičko značenje. Postoje dokazi da membranske i citoplazmatske populacije ER subtipova mogu posredovati brze (tzv. ne-genomske) efekte estrogena. Ne-genomski signal se može odvijati putem različitih mehanizama, uključujući aktivaciju epidermalnog faktora rasta (EGFR) i mitogen-aktiviranu protein kinazu 1 (MAPK 1). Postoje dokazi da su membranski i jezgri receptor zapravo isti proteini, a transportiraju se u citoplazmu preko još nejasnih mehanizama. Ideja se temelji na imunohistokemijkoj analizi endogenog membranskog ER, koristeći panel antitijela usmjerenih direktno na multiple epitope jezgrinih ER, gubitku endogene ER proteinske detekcije u membrani preko stanica transficiranih s „antisens“ oligonukleotidom na jezgri ER alfa, kodetekcijom membranskih i jezgrinih ER nakon jezgrene DNK ekspresije u ER „null“ mišu (132). U istraživanju Shaaban i sur. (133) ER beta 2 se pokazao kao bitan prognostički čimbenik u karcinomu dojke, a citoplazmatska je reakcija sama ili u kombinaciji s nuklearnom, značila lošije preživljenje. Analizirajući izraženost ER na karcinomima dojke Song i sur. (134) opisuju akciju E2 iniciranu preko ekstranuklearnog signalnog puta, koji uključuje insulin-like growth factor 1 (IGF-1R) i epidermal growth factor receptor (EGFR) te kao rezultat aktivaciju kinaza. Biološki rezultati uključuju povećanje stanične proliferacije i sprječavanje programirane smrti stanice (apoptoze). Mala frakcija ER alfa je povezana sa staničnom membranom te posreduje u rapidnim efektima (134). Klasični, genomski put djelovanja ER je posebno važan u razvoju i diferencijaciji stanica, tkiva i organa te za omogućavanje finalnih funkcijskih mogućnosti. S druge strane, ekstrajezgri signalni mehanizmi mogu predstavljati put rapidne aktivacije stanične funkcije potrebne za akomodaciju na dinamične promjene u okolnom miljeu (135). U istraživanju na beta stanicama pankreasa Liu i sur. (136) su pokazali da E2 pogoduje preživljavanju beta stanica pankreasa preko ER alfa u miša, te da aktivira ne-genomske signale preko ekstrajezgri formi ER alfa i ER u paru s G-

proteinom. Levin i sur. (132) u svom radu ukazuju da membranski ER moguće egzistira kao citoplazmatski povezan s unutarnjim slojem plazma membrane, te povezan s proteinima, kao što je kaveolin. Kolaboracija između jezgrinih i ekstranuklearnih receptora je neophodna za normalno funkcioniranje organa. Opisali su in vivo modele gdje je membranski ER bio dovoljan za prevenciju patologije srca i jetre, te bi taj model mogao biti primjenjiv i u drugim situacijama. Kod brze prilagodbe sisavaca na vanjske stimulse, signal iz membranskih receptora omogućava mehanizme rapidne adaptacije. To može uključivati prilagodbu krvnog tlaka, ionsku promjenu te nažalost pruža mogućnost nekim tipovima karcinoma da se adaptiraju na citotoksičnu terapiju. Time se donekle objašnjava razlog proširenosti ER u organizmu, i to na mjestima koja nemaju očitu vezu s reprodukcijom i plodnošću. Ekstranuklearni steroidni receptori mogu omogućiti organizirani signal za pravilno funkcioniranje stanica i organa (133). Rezultati studije Chakravarty i sur. (137) pokazuju da ekstranuklearna aktivnost ER ima ulogu u staničnoj mobilnosti i metastaziranju, te da endogeni PELP1 pri tome igra kritičnu ulogu. Kod već ranije spomenutog istraživanja Saredy i sur. (100) na gliomima mozga, ER beta je predominantno bio lokaliziran u jezgri kod tumora gradusa 2, dok je većina stanica u tumorima gradusa 3 imala izražen citoplazmatski pozitivitet. Navedeni rezultati ukazuju da je ekspresija ER beta smanjena tijekom progresije od glioma do glioma visokog gradusa, i da gliomi visokog gradusa izražavaju ER beta predominantno u citoplazmi. Kod karcinoma cerviksa uterusa, ER beta je bio prisutan u 70,6% slučajeva, i to gotovo isključivo u citoplazmama tumorskih stanica, dok je u normalnom epitelu bio prisutan i u jezgrama i citoplazmama. Promjena jezgrenog u citoplazmatski pozitivitet od zdravog tkiva do neoplastičnog, može ukazivati na dobro definiranu ulogu na razini genske aktivacije (138).

Chambliss i sur. (139) su identificirali endogene ER alfa i ER beta receptore od 67 i 54 kDa u kaveolama i staničnim membranama endotelnih stanica. U kontekstu genomske signalizacije, prihvaćeno je da ER alfa ima nenuklearne signalne funkcije koje koreliraju sa rezistencijom na tamoksifen u prekliničkim modelima. Stoga je saznanje o citoplazmatskoj lokalizaciji ER u humanim karcinomima dojke manje utvrđeno.

Kumar i sur. (140) su analizirali izraženost ER alfa i ER beta, učinke selektivnih modulatora ER, te agonista ER subtipova na kulturama stanica papilarnog karcinoma i karcinoma dojke. Sve tri stanične linije papilarnog karcinoma su izražavale cijelu

dužinu ER alfa i ER beta s lokalizacijom u citoplazmi i perinuklearnoj regiji, te u citoplazmi stanica. Nakon 45-minutnog tretmana staničnih linija s E2, kod PTC su ER ostali u citoplazmi, dok su se kod stanične linije karcinoma dojke premjestili u jezgru. Dakle, E2 nije stimulirao translokaciju ER alfa i ER beta u jezgru kod stanica karcinoma štitnjače, no stimulirao je proliferaciju staničnih linija karcinoma koja je bila blokirana dodavanjem fulvestranta. To znači da je odgovor na E2 posredovan putem estrogenskih receptora čija je genomski aktivnost reducirana u komparaciji sa karcinomom dojke.

ER beta je predominantno prisutan u papilarnom karcinomu štitnjače u odnosu na anaplastični, te je stoga moguće da igra određenu ulogu povezanu s diferenciranošću tumora (141). Također je uočena tendencija smanjenja jezgrenog i povećanja citoplazmatskog pozitiviteta kod papilarnog karcinoma u odnosu na multinodoznu strumu (132).

Di Vito i sur. (142) su analizirali prisustvo ER u papilarnim karcinomima imunohistokemijski, a zatim i uz pomoć laserske mikrodisekcije, lančane reakcije polimeraze (PCR) i Western blota. Autori nisu dokazali prisustvo ER beta glasničke RNK u tkivu karcinoma, te stoga sugeriraju da bi ER alfa mogao igrati važnu ulogu u genezi i progresiji PTC. Za razliku od polaganog procesa transaktivacije ciljnih gena, ne-genomska aktivnost estrogena, koja je posredovana preko ER povezanog s membranom je vrlo brza. I genomski i negenomski aktivnost estrogena su prisutne u benignim i malignim stanicama štitnjače (143).

Magri i sur. (144) su istraživali uzorak od 91-og bolesnika sa papilarnim karcinomom manjim ili jednako 2 cm (T1), te određivali ER alfa, ER beta i androgene receptore u tkivu tumora i ostalom tkivu. Imali su ukupno 52,7% pozitivnih uzoraka na ER beta, od toga 53,8% žena i 46% muškaraca. Beta negativitet je bio povezan sa češćom vaskularnom invazijom u tumorima. ER beta je u tumorima bio kompletno ili parcijalno smanjen u odnosu na okolno tkivo, što se podudara s hipotezom Foxa i sur. (78) da ER beta imaju protektivnu ulogu u onkogenetskom procesu. Za razliku od ER beta, ER alfa je bio povišen ili je bio pozitivan u odnosu na okolno tkivo te je kod bolesnika kod kojih je bio pozitivan bio viših razina Tg nakon operacije. ER alfa pozitivitet i ER beta negativitet je povezan s agresivnijim tumorima.

U Republici Hrvatskoj su se provodila istraživanja papilarnih karcinoma koja su ispitivala utjecaj brojnih patohistoloških čimbenika na prognozu (145). Međutim, do sada nije bilo radova koji direktno uspoređuju imunohistokemijsku izraženost ER beta u jezgri i citoplazmi i time se ova disertacija nadopunjuje na postojeće studije. Dosadašnji dostupni literaturni podaci ne sadrže niti jedan rad vezan uz istraživanje odnosa ER beta i papilarnog mikrokarcinoma. U vlastitom radu također nije nađena statistički značajna razlika u jezgrenoj i citoplazmatskoj izraženosti ER beta između papilarnih mikrokarcinoma i ostalih karcinoma. Kod 100% papilarnih mikrokarcinoma- difuzni sklerozirajući podtip citoplazmatski pozitivitet je bio prisutan u više od 50 % stanica, no obzirom da se radi o malom uzorku (5 bolesnika), rezultat nije dosegao statistički značajnu vrijednost. U radu Kuo i sur. (146) difuzna sklerozirajuća varijanta papilarnog mikrokarcinoma je imala veću stopu pozitivnih limfnih čvorova te ekstratiroidnog širenja, no nije bilo razlike u preživljenju. Zaključuju da agresivne varijante pokazuju klinički agresivnije ponašanje, no u konačnici je preživljenje isto.

Povezanost ER statusa sa tumorskom dediferencijacijom i evaluacija signalnih puteva pri kojima estrogen i drugi steroidni hormoni izražavaju svoje efekte na stanice karcinoma štitnjače, buduća su područja interesa, a steroidni receptori i njihov “downstream” predstavljaju moguće mete za liječenje karcinoma štitnjače (22).

## 7. ZAKLJUČCI

1. U papilarnom karcinomu štitnjače prisutan je i jezgri (u 54,8% bolesnika) i citoplazmatski pozitivitet ER beta (kod 81,7% bolesnika).
2. Izraženost ER beta kod papilarnog karcinoma štitnjače značajno je povezan sa dobi bolesnika i menopauzalnim statusom u žena.
3. Izraženost ER beta u citoplazmi veća je kod bolesnika starijih od 50 godina, bez obzira na spol ( $P=0,019$ ) a izraženost u  $>50\%$  stanica izraženija je u starijih u odnosu na mlađe žene ( $P=0,022$ ). Stariji bolesnici imaju lošiju prognozu u odnosu na mlađe, te bi izraženiji citoplazmatski pozitivitet ER beta mogao imati vrijednost kao indikator lošije prognoze,
4. Mlađe žene imaju izraženiji pozitivitet ER beta u jezgrama u odnosu na starije žene ( $P=0,023$ ). Time dokaz smanjene izraženosti ER beta u starijih žena podupire hipotezu da smanjena izraženost ER beta u jezgri također predstavlja indikator lošije prognoze.
5. Nije nađena razlika u izraženosti ER beta u mikrokarcinomima u odnosu na ostale papilarne karcinome, kao niti u papilarnim mikrokarcinomima agresivnije kliničke prezentacije, no na malom uzorku difuznog sklerozirajućeg podtipa papilarnog mikrokarcinoma koji nije dosegao statistički značaj, u 100% slučajeva bio je pozitivan citoplazmatski ER beta. Potrebna su daljnja istraživanja na većem uzorku navedenog histološkog podtipa mikrokarcinoma.



## 8. SAŽETAK

Papilarni karcinom štitnjače se učestalije pojavljuje u žena tijekom reproduktivne dobi, kod kojih ima i najbolju prognozu. Navedeni podaci ukazuju na povezanost estrogena s papilarnim karcinomom. Izravni proliferacijski učinak estrogena na stanicama papilarnog karcinoma je već dokazan in vitro, a najvjerojatnije se odvija posredstvom jezgrinih estrogenskih receptora (ER). Biološka uloga estrogenskog receptora  $\beta$  (ER  $\beta$ ) još uvijek nije jasna, no dosadašnja istraživanja ukazuju na prodiferencijacijsko i protuproliferacijsko djelovanje.

U ovom smo radu na uzorcima tkiva 104 bolesnika s papilarnim karcinomom iz patohistoloških nalaza i povijesti bolesti izdvojili dob, spol, veličinu i histološki podtip tumora, prisutnost benignih promjena u štitnjači, limfocitnog infiltrata, metastaza u limfne čvorove, te intraglandularne diseminacije. Navedene parametre smo usporedili s imunohistokemijskom reakcijom na ER  $\beta$  koju smo učinili na dodatnom rezu uzorka papilarnog karcinoma.

ER  $\beta$  bio je pozitivan i u jezgrama i u citoplazmama papilarnog karcinoma. Jezgri pozitivitet bio je češći u žena mlađih od 50 godina, dok je citoplazmatski pozitivitet bio češći u bolesnika starijih od 50 godina, bez obzira na spol.

Zaključak je da je izraženost ER  $\beta$  u papilarnom karcinomu povezana s dobi i menopauzalnim statusom u žena, što upućuje na njegovu moguću prognostičku ulogu. U tom smislu potrebna su daljnja istraživanja.

Ključne riječi: štitnjača, papilarni karcinom, estrogenski receptori beta

## 9. SUMMARY

### **Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in papillary thyroid carcinoma**

Iva Bobuš Kelčec, 2018.

Papillary thyroid carcinoma occurs more frequently among women of reproductive age, who additionally make up the best prognostic group. The obtained data suggest a relation between estrogen and papillary carcinoma. Direct proliferative effect of estrogen on papillary carcinoma cells has already been proven in vitro, and seems to be mediated by estrogen receptors (ER). The biological importance of ER beta (ER  $\beta$ ) remains unclear, but recent research point to its possible prodifferentiative and antiproliferative role.

This study has examined the immunohistochemical expression of ER beta in papillary thyroid carcinoma. Specimen from 104 patients with papillary carcinoma has been obtained. The data on age, sex, tumor size and histological subtype, presence of benign thyroid disease, lymphocytic infiltrate, lymph node metastases, and intraglandular dissemination were obtained from patient records and pathology reports. The aforementioned parameters were compared with immunohistochemical reaction to ER  $\beta$ .

The expression of ER  $\beta$  was present in both nuclei and cytoplasm of carcinoma cells. Nuclear positivity was more expressed in women younger than 50 years, and cytoplasmic positivity was more expressed in patients older than 50, irrespective of sex. The conclusion is that ER beta expression in papillary carcinoma is related with age and menopausal status in women, which suggests its possible prognostic relevance. Consequently, further investigations should be made.

Keywords: thyroid, papillary carcinoma, estrogen receptors beta

## 10. POPIS LITERATURE

1. Kumar V, Fausto N, Abbas A, ur. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. str.1177-8.
2. Krause W. Krause's essential human histology for medical students. 3. izd. Boca Raton: Universal Publishers; 2005. str.26- 8.
3. Damjanov I. Pathology secrets. Philadelphia: Hanley and Belfus inc.; 2002. str.116-22.
4. Edwards CRW, Bouchier IAD, Haslett C, ur. Davidson's principles and practice of Medicine. 17. izd. Edinburgh, etc.: Churchill Livingstone; 1995. str. 685-99.
5. Solter M. Bolesti štitnjače: klinička tireoidologija. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; 2007.
6. Abdel-Dayem MM, Elgendy MS. Effects of chronic estradiol treatment on the thyroid gland structure and function of ovariectomized rats. BMC Res Notes. 2009; 30(2):173-80.
7. Ben Rafael Z, Strauss JF, Arendash-Durand I, Mastroianni, Flickinger GI. Changes in thyroid function tests and sex hormone binding globulin associated with treatment by gonadotropin. Fertil Steril. 1987; 48(2): 318- 20.
8. Arafah BM. Increased need for thyroxine in women with hypothyroidism during estrogen therapy. N Engl J Med. 2001; 344(23): 1743- 9.

9. Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson JL. Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodine symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 1999; 140: 5705-11.
10. Kocjan G, ur. *Clinical cytopathology of the head and neck: a text and atlas*. London: Greenwich Medical Media ; 2001. str.79-112.
11. Halbauer M, Šarčević B, Tomić Brzac H. *Citološko-patohistološki atlas bolesti štitne žlijezde i doštitnih žlijezda s ultrazvučnim slikama*. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2000. str. 22-4.
12. Naib ZM. *Cytopathology*. 4. izd. Boston: Little, Brown and company ;1996. str.517-30.
13. Zaletel K, Gaberscek S. Hashimoto's thyroiditis: from genes to the disease. *Curr Genomics*. 2011; 12(8): 576-88.
14. Replinger D, Bargren A, Zhang YW, Adler JT, Haymart M, Chen H. Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *J Surg Res*. 2008; 150(1): 49-52.
15. Gandolfi PP, Frisina A, Raffa M, Renda F, Roccheti O, Ruggeri C i sur. The incidence of thyroid carcinoma in multinodular goiter: retrospective analysis. *Acta Biomed*. 2004; 75(2):114-7.
16. Pedomallu R, Pedomallu S, Rama Rao K, Pedomallu C. Incidence of occult carcinoma in multinodular goiter using histopathological findings. *The Internet Journal of Surgery (internet)*. 2007; 17 (1) (pristupljeno srpanj 2015).
17. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, ur. *World Health Organization classifications of tumours: pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. Lyon : IARC Press; 2004. str. 50-66.

18. LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol.* 2011; 24:51- 9.
19. Apel RL, Ezzat S, Bapat BV, Pan N, LiVolsi VA, Asa SL. Clonality of thyroid nodules in sporadic goiter. *Diagnostic Mol Pathol.* 1995; 4(2): 113-21.
20. Greenman DL, Highman B, Chen J, Sheldon W, Gass G. Estrogen-induced thyroid follicular cell adenomas in C57BL/6 mice. *J Toxicol Environ Health.* 1990; 29(3): 269-78.
21. Cibas ES, Ducatman BS. *Cytology. Diagnostic principles and clinical correlates.* 3.izd. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009, str. 255- 84.
22. Yao R, Chiu CG, Strugnell SS, Gill S, Wiseman SM. Gender differences in thyroid cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011; 6(2): 215- 43.
23. Huang TS, Lee JJ, Cheng SP. No evidence of association between human cytomegalovirus infection and papillary thyroid cancer. *World J Surgical Oncol.* 2014; 12:41- 7.
24. Hunt JL. Radiation induced thyroid disease. *Pathol Case Rev.* 2009; 14: 224-30.
25. Hempelman LW, Pifer E, Burke GJ, Terry R, Ames WR. Neoplasms in persons treated with X rays in infancy for thymic enlargement. *J Natl Cancer Institute.* 1967; 38: 317-41.
26. Bhatti P, Veiga LHS, Ronckers CM, Sigurdson AJ, Stuvall M, Smith SA. Risk of second primary thyroid cancer after radiotherapy for a childhood cancer in a large cohort study: an update from the childhood cancer survivor study. *Radiat Res.* 2010; 174 (6): 741-52.
27. Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncol.* 2010; 6(1):1771- 9.

28. Sakoda LC, Horn-Ross PL. Reproductive and menstrual history and papillary thyroid cancer risk: the San Francisco Bay area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11: 51-7.
29. Bolaert K. The Association between serum TSH concentration and thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009; 16(4):1065-72.
30. Haymart MR, Repplinger DJ, Leverston GE, Elson DF, Sippel RS, Carlos Jaime J. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with reater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 809-14.
31. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 1990; 50(23): 7415-21.
32. Fiore E, Rago T, Provenzale MA, Scutari M, Ugolini C, Basolo E. i sur. Lower levels of TSH are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer in patients with thyroid nodular disease: thyroid autonomy may play a protective role. *Endocr Relat Cancer.* 2009; 16(4): 1251- 60.
33. Pujol P , Duares JP, Nsakala N, Baldet L, Bringer L, Jaffiol C. Degree of thyrotropin suppression as a prognostic determinant in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81(12):4318- 23.
34. Charis E. RET Proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17 (1) : 380-1.
35. Shibru D, Chung KW, Kebebew E. Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Curr Opin Oncol.* 2008; 20:13–8.
36. Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *J Chin Med Assos.* 2010; 73(3): 113-28.

37. Costa AM , Herrero A, Fresno MF, Heyman J, Alvarez JA, Cameselli-Teijero J i sur. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2008; 68(4):618-34.
38. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G. i sur. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. Clin. Endocrinol (Oxf.). 2006; 65:364-8.
39. Nikiforova MN, Campi R, Salvatore G. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. Cancer Lett. 2004; 209(1): 1-6.
40. Akslen LA, Varhaug JE. Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma. Cancer. 1995; 76(9):1643- 52.
41. <https://www.cancer.gov/types/thyroid/hp>, pristupljeno: studeni 2014.
42. Noguchi S, Yamashita H, Uchino S, Watanabe S. Papillary microcarcinoma. World J Surg. 2008; 32(5):747- 53.
43. Pelizzo MR, Boschin IM, Toniato A, Pagetta C, Piotto A, Bernante P. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of papillary thyroid microcarcinoma (PTMC); a monoinstitutional 12-year experience. D Nucl Med Commun. 2004 ; 25(6):547- 52.
44. Mercante G, Frasoldati A, Pedroni C, Formisano D, Renna L, Piana S. Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients. Thyroid 2009; 19(7): 707-16.

45. Pellegriti G, Scollo C, Lumera G, Regalbuto C, Vigneri R, Belfiore A. Clinical behavior and outcome of papillary thyroid cancers smaller than 1,5 cm in diameter: study of 299. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(8): 3713- 20.
46. Dong W, Zhang H, Li J, Guan H, He L, Wang Z, Shan Z, Teng W. Estrogen Induces Metastatic Potential of Papillary Thyroid Cancer Cells through Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Int J Endocrinol.* 2013;2013:941568. doi: 10.1155/2013/941568
47. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1990; 71(2):414-24.
48. Kim BY, Jung CH, Kim JW, Le SW, Kim CH, Kang SK i sur. Impact of clinicopathologic factors on subclinical central lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. *Yonsei Med J.* 2012; 53 (5): 924-30.
49. Hay ID, Hutchinston ME, Gonzalez-Losada T, McIver B, Reinalda ME, Grant CS i sur. Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 900 cases observed in 60-year period. *Surgery.* 2008; 144(6): 980-7.
50. Karatzas T, Vasileiadis I, Kapetanakis S, Karakostas E, Chrousos G, Kouraklis G. Risk factors contributing to the difference in prognosis for papillary versus micropapillary thyroid carcinoma. *Am J Surg.* 2013; 206(4): 586-93.
51. Džepina D, Bedeković V, Čupić H, Krušlin B. Papillary thyroid microcarcinoma: clinical and pathological study of 321 cases. *Coll Antropol.* 2012; 36(2): 39-45.
52. Cheema Y, Olson S, Elson D , Chen D. What is the biology and optimal treatment for papillary microcarcinoma of the thyroid? *J Surg Res.* 2006; 134:160- 2.



53. Pearce EN, Braverman LE. Papillary Thyroid microcarcinoma outcomes and implications for treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 89(8): 3710- 2.
54. Ghossein R, Ganly I, Biagini A, Robenshtok E, Rivera M, Tuttle RM. Prognostic factors in papillary microcarcinoma with emphasis on histologic subtyping: a clinicopathologic study of 148 cases. *Thyroid.* 2014; 24(2): 245- 53.
55. Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E, Derwahl M. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2001; 86: 1072- 7.
56. Rossing MA, Voigt LF, Wicklund KG, Daling JR. Reproductive factors and risk of papillary thyroid cancer in women. *Am J Epidemiol.* 2000 ;151(8):765-72.
57. Vannucchi G, Perrino M, Rossi S, Colombo C, Vicentini L, Dazzi D. Clinical and molecular features of differentiated thyroid cancer diagnosed during pregnancy. *Eur J Endocrinol.* 2009; 162(1): 145- 51.
58. Yasmeeen S, Cress R, Romano PS, Xing G, Berger Chen B, Danielsen B i sur. Thyroid cancer in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005; 91(1): 15-20.
59. Negri E, Dal Maso L, Ron E, La Vecchia C, Mark SD, Preston-Martin S. A pooled analysis of case control studies of thyroid cancer. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes Control.* 1999; 10 (2):143-55.
60. Levi F, Franceschi S, Gulie C, Negri E, La Vecchia C. Female thyroid cancer: the role of reproductive and hormonal factors in Switzerland. *Oncology.* 1993; 50(4):309-15.

61. Shindo H, Nobuyuki A, Yasuhiro, Yasuhiro I, Minoru K, Kaoru K .i sur. Papillary thyroid microcarcinoma might progress during pregnancy. *Thyroid*. 2014; 24(5): 840- 4.
62. Kabat GC, Kim MY, Wactawski-Wende J, Lane D, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE. Menstrual and reproductive factors, exogenous hormone use, and risk of thyroid carcinoma in postmenopausal women. *Cancer Causes Control*. 2012; 23: 2031- 40.
63. Persson I, Yuen J, Bergkvist L, Schairer C. Cancer incidence and mortality in women receiving estrogen and estrogen-progestin replacement therapy-long term follow-up of a Swedish cohort. *Int J Cancer*. 1996; 67: 327- 32.
64. Henderson BE., Ross RK, Pike MC, Cassagrande JT. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res*. 1982 ; 24 :3232- 9.
65. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000;21: 427- 33.
66. Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000; 27: 67-73.
67. Liehr JG, Fang WF, Sirbasku DA, Ari-Ulebelen A. Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *J Steroid Biochem*. 1986; 24:353-6.
68. Lazanecc G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2006; 231(2): 151- 7.
69. Clarke MJ. Ovarian ablation in breast cancer, 1896 to 1998: milestones along hierarchy of evidence from case report to Cochrane review. *BM*. 1998; 317(7167):1246- 8.

70. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(6): 1980- 9.
71. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua VCJ, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS i sur. International union of pharmacology.LXIV: estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006 ; 58:773- 81.
72. Baik CS, Eaton KD. Estrogen signaling in lung cancer: an opportunity for novel therapy. *Cancers.* 2012; 4: 969- 88.
73. Kumar R, Zakharov MN, Khan SH , Miki R, Jang H, Toraldo G i sur. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids.* 2011; 2011: doi: 104061/2011/812540.
74. Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JA. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(3): 584- 90.
75. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J i sur. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007; 87:905- 31.
76. Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview:estrogen receptor-beta:mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinology.* 2010; 24: 1703- 14.
77. Thomas C, Gustaffson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(8) : 597- 07.
78. Fox SB, Brown P, Han C, Ashe S, Leek RD, Harris AL i sur. Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 3521- 7.

79. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S i sur. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alfa and beta. *Endocrinology*. 1997;138(3):863-86.
80. Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z i sur. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2002; 2: 1-13.
81. Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(11):3739- 46.
82. Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res*. 2000; 60(2): 245- 8.
83. Ford CHJ, Al-Bader M, Al-Ayadhi B, Francis I. Reassessment of estrogen receptor in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2011; 31: 521- 7.
84. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A; Hosoi T, Ouchi Y i sur. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(15): 3505- 12.
85. Leung YK, Lee MT, Lam HM, Tarapore P, Ho SM. Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice. *Steroids* 2012; 77(7): 727- 37.
86. Taylor AH, Al-Azzavi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol*. 2000; 24: 145- 55.
87. Harris HA. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol*. 2007; 21:1-13.

88. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, YU RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 2006; 126:789- 99.
89. Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S i sur. Estrogen receptors (alfa and beta) and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions. *Mod Pathol*. 2003; 16(5): 437- 44.
90. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ER beta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*. 2004 ; 11 : 537- 51.
91. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA. Reflection on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev*. 2005; 26(3): 465- 78.
92. Mann S, Lauricia R, Carlson N, Younes PS, Ali N, Younes A i sur. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2001; 32: 113- 8.
93. Jarvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K, Isola J. Estrogen receptor  $\beta$  is coexpressed with ER  $\alpha$  and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol*. 2000 ; 156 :291- 35.
94. Novelli F, Milella M, Melucci E. A divergent role for estrogen receptor-beta in node-positive and node-negative breast cancer classified according to molecular subtypes: an observational prospective study. *Breast Cancer Res*. 2008;10:74-86.
95. Cho MA, Lee MK, Nam KH. Expression and role of estrogen receptor alfa and beta in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis. *J Endocrinol*. 2007; 195:255- 63.

96. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Takubo K i sur. Clinical importance of estrogen receptor beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol*. 2008; 26(22): 3727- 34.
97. Horwath LG, Henshall SM, Lee CS. Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001; 61(14):5331-5.
98. Lim W, Park Y, Cho J, Park C, Park J, Park YK i sur. Estrogen receptor beta inhibits transcriptional activity of hypoxia inducible factor-1 through the downregulation of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(2): R32. doi:10.1186/bcr2854.
99. Wu X, Subramaniam M, Grygo SB, Sun Z, Negron V, Lingle NL i sur. Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(2): R27. doi:10.1186/bcr2844.
100. Sareddy GR, Nair BC, Gonugunta VK. Therapeutic significance of estrogen receptor beta agonists in gliomas. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11:1174- 84.
101. Tavangar SM, Monejemzadeh M, Larijani B, Haghpanah V. Immunohistochemical study of oestrogen receptors in 351 human thyroid glands. *Singapore Med J*. 2007; 48: 744- 7.
102. Passler C, Scheuba C, Prager G, Kaczirek K, Kaserer K. Prognostic factors of papillary and follicular thyroid cancer: differences in an iodine-replete endemic goiter region. *Endocrine Rel Cancer*. 2004; 11:131- 9.
103. Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. *Cancer*. 2005; 103(11): 2269- 73.
104. Frazell EL, Foote FW Jr. Papillary cancer of the thyroid; a review of 25 years of experience. *Cancer*. 1958; 11(5): 895- 922.

105. Papageorgiu MS, Liratzopoulos N, Efremidou EI, Karanikas M, Minipoulos G, Manolas KJ. Multifocality of thyroid carcinomas: a privilege of papillary tumors or not? *G Chir.* 2010; 31(1-2): 20-3.
106. Baloch Z, LiVolsi VA, Tondon R. Aggressive Variants of follicular cell derived thyroid carcinoma. *J Clin Pathol.* 2013; 66(9): 733- 43.
107. Lam AK, Lo CY. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid a 35-year comparative study at a single institution. *Am Surg Oncol.* 2006;13:176- 81.
108. Vickeri AL Jr, Carcangiu ML, Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M. Papillary carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 1985; 2(2): 90-100.
109. Yoon YH, Kim HJ, Lee JW, Koo BS. The clinicopathologic differences in papillary thyroid carcinoma with or without co-existing chronic lymphocytic thyroiditis. *Eu Arch Otorhinolaryngol.* 2012; 269(3): 1013- 7.
110. Konturek A, Barczynski M, Wierzchowski W, Stopa M, Nowak W. Coexistence of papillary thyroid cancer with Hashimoto thyroiditis. *Langenbecks Arch Surg.* 2013; 398(3): 389-94.
111. Segal K, Ben-Bassat M, Avraham A, Har-El G, Sidi J. Hashimoto's thyroiditis and carcinoma of the thyroid gland. *Int Surg.* 1985; 70(3):205- 9.
112. Shields BM, Freathy RM, Knight BA. Phosphodiesterase 8B gene polymorphism is associated with subclinical hypothyroidism in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 4608- 12.
113. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically-proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2013; 168: 343- 9.

114. Kim SS, Lee BJ, Lee JC, Kim SJ, Jeon YK, Kim MR i sur. Coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: the influence of lymph node metastasis. *Head Neck*. 2011; 33(9): 1272-7.
115. Paulson LM, Shindo ML, Schuff KG. Role of chronic lymphocytic thyroiditis in central node metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 147(3):444- 9.
116. Jara SM, Carson KA, Pai SI. The relationship between chronic lymphocytic thyroiditis and central neck lymph node metastasis. *Surgery*. 2013; 154(3): 1272- 80.
117. Davidson HC, Park BJ, Johnson JT. Papillary thyroid cancer: controversies in the management of neck metastasis. *Laryngoscope*. 2008; 118(12): 2161- 5.
118. Filipović A, Paunović I, Vučković LJ. Uticaj limfocitnog tiroiditisa na prognozu diferentovanog tiroidnog karcinoma. *Acta Chirurg Jugosl*. 2010; 57:85-94.
119. Özata M, Aksu A, Narin Y, Finci R, Bayhan H, Özdemir IC. The relationship between lymphocytic infiltration in the thyroid gland and tumor recurrence in papillary thyroid carcinoma. *Turkish J Endocrinol Metab*. 1999; 3:113- 7.
120. Matsubayashi S, Kawai K, Matsumoto Y, Makuta T, Morita T, Hirai K i sur. The correlationa between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 3421-4.
121. Bagnasco M, Venuti D, Paolieri F, Torre G, Ferrini S, Canonica GW. Phenotypic and functional analysis at the clonal level of infiltrating T lymphocytes in papillary carcinoma of the thyroid: prevalence of cytolytic T cells with natural killer-like or lymphokine-activated killer activity. *Endocrinol Metab*. 1989; 69(4): 832- 6.
122. Guarino V, Castellone MD, Avilla E, Melillo RM. Thyroid cancer and inflammation. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 321(1); 94-102.



123. Loh KC, Greenspan FS, Dong F, Miller TR, Yeo PP. Influence of lymphocytic thyroiditis on the prognostic outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(2): 458-63.
124. Vainman M, Olevson Y, Habler L, Kessler A, Zehavi S, Sandbank J. Diagnostic value of estrogen receptors in thyroid lesions. *Med Sci Monit.* 2010; 16: 203- 7.
125. Ceresini G, Morganti S, Graiani V. Estrogen Receptor (ER)-beta but not ER-alfa, is present in thyroid vessels: immunohistochemical evaluations in multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2006; 16(12):1215- 20.
126. Heikkila A, Hagstrom J, Maenpaa H, Louhimo J, Siironen P, Heiskanen I i sur. Loss of estrogen receptor Beta ekspression in follicular thyroid carcinoma predicts poor outcome. *Thyroid.* 2013; 23 (4):456-65.
127. Santin AP, Furlanetto TW. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J Thyroid Res.* 2011;2011:875125. doi: 10.4061/2011/875125
128. O'Neill PA, Davies MPA, Shaaban AM, Innes H, Torevell A, Sibson DR i sur. Wild-type oestrogen receptor beta (ER  $\beta$ 1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treted post-menopausal breast cancers. *Br J Cancer.* 2004; 91(9): 1694- 02.
129. Jaklic BR, Rushin J, Ghosh B. Estrogen and progesterone receptors in thyroid lesions. *Ann Surg Oncol.* 1994; 2(5): 429- 34.
130. Inoue H, Oshimo K, Miki H, Kawano M, Monden Y. Immunohistochemical study of estrogenreceptors and the responsiveness to estrogen in papillary thyroid carcinoma. *Cancer.* 1993;72:1364– 8.
131. Leung YK, Lee MT, Lam HM, Tarapore P, Ho SM. Estrogen receptor-beta and breast cancer: Translating biology into clinical practice. *Steroids.* 2012; 77(7): 727- 37.
132. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol.* 2005; 19(8): 1952- 9.

133. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes TA. Nuclear and cytoplasmic expression of ER beta1, ER beta2, ER beta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(16): 5228-35.
134. Song RX, Fan P, Yue W, Chen Y, Santen RJ. Role of receptor complexes in the extranuclear actions of estrogen receptor alpha in breast cancer. *Endocrine Rel Cancer.* 2006; 13 (1): 3-13.
135. Fu XD, Simoncini T. Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *Life.* 2008; 60(8): 502- 10.
136. Liu S, May CL, Wong WP, Ward RD, Clegg DJ, Marcelli M *et al.* Importance of extranuclear estrogen receptor- $\alpha$  and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. *Diabetes.* 2009; 58(10): 2292- 02.
137. Chakravarty D, Nair SS, Santhamma B, Nair BC, Wang L, Bandyo-Padhyay A *et al.* Extranuclear functions of ER impact invasive migration and metastasis by breast cancer cells. *Cancer Res.* 2010; 70(10):4092-01.
138. Lopez-Romero R, Garrido-Guerrero E, Rangel-Lopez A, Manuel-Apolinar L, Pina-Sanchez P, Lazos-Ochoa M *et al.* The cervical malignant cells display a down regulation of ER  $\alpha$  but retain the ER  $\beta$  expression. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013; 6(8): 1594- 02.
139. Chamblis KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. ER beta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol.* 2002; 16(5): 938- 46.
140. Kumar A, Klinge CM, Goldstein RE. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *Int J Oncol.* 2010; 36(5):1067- 80.

141. Kavanagh DO, Mellroy M, Myers E, Bane F, Crotty TB, McDermott E i sur. The role of oestrogen receptor alfa in human thyroid cancer: contributions from corregulatory proteins and the tyrosine kinase receptor HER2. *Endocrine Relat Canc* 2010; 17:255- 64.
142. DiVito M, De Santis E, Perrone GA. Overexpression of estrogen receptor alfa in human papillary thyroid carcinomas studied by laser-capture microdissection and molecular biology. *Cancer Sci.* 2011;102:1921- 7.
143. Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology.* 2006; 147: 5557- 63.
144. Magri F, Capelli V, Rotondi M, Leporati P, La Manna L, Ruggiero R i sur. Expression of estrogen and androgen receptors in differentiated thyroid cancer: an additional criterion to assess the patient's risk. *Endocrine Relat Canc.* 2012; 19: 463- 71.
145. Milković Periša M. Imunohistokemijska izraženost i prognostička vrijednost proteina nm23 H1 i COX 2 u papilarnom karcinomu (disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2011.
146. Kuo EJ, Goffredo P, Sosa JA, Roman SA. Aggressive variants of papillary thyroid microcarcinoma are associated with extrathyroidal spread and lymph node metastases. A population-level analysis. *Thyroid.* 2013; 23(10):1305- 11.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 1973. godine. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u Obrazovnom centru za jezike 1991. godine, upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojemu sam diplomirala 1997. godine.

Državni ispit položila sam u prosincu 1998. godine.

Od 1999. -2000. godine radim u Domu zdravlja istok - Ambulanta Vugrovec kao liječnik opće medicine.

Od 2000. do 2005. godine na specijalizaciji sam iz kliničke citologije kao zaposlenik Klinike za dječje bolesti.

2005. godine sam položila specijalistički ispit iz kliničke citologije.

Od 2006. godine do danas zaposlena sam u Zavodu za kliničku citologiju Klinike za tumore - KBC Sestre milosrdnice.

Član sam Hrvatskog citološkog društva i Hrvatskog liječničkog zbora.