

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Gordana Horvatić Herceg**

**Kliničko značenje urokinaznog  
aktivatora plazminogena i njegovog  
inhibitora PAI-1 u bolesnika s  
diferenciranim karcinomom štitnjače**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2010.**

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja  
Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljica rada: dr.sc. Zdenka Bence-Žigman, prim.dr.med.

Zahvaljujem mentorici dr.sc. Zdenki Bence-Žigman, prim.dr.med. na pruženoj podršci i stručnim savjetima tijekom izrade rada.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Dragi Prgometu, predstojniku Klinike za otorinolaringologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb na izvrsnoj suradnji u sakupljanju tumorskog materijala.

Hvala Marku Kraliku, dr.med. na pomoći u statističkoj obradi podataka, te mr.sc. Ani Kulić iz Laboratorija za eksperimentalnu patofiziologiju Katedre za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. na laboratorijskoj obradi tumorskog materijala.

Ovim putem želim zahvaliti i laboratorijskim tehničarkama iz Ultrazvučne dijagnostike Poliklinike za bolesti štitnjače koje su uvijek bile spremne pomoći u sakupljanju uzoraka tumora i njihovom pohranjivanju.

Zahvaljujem svima koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi rada.

*Luciji i Matiji*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Karcinomi štitnjače .....	1
1.1.1. Incidencija i prognoza diferenciranih karcinoma štitnjače .....	1
1.1.2. Patologija i klasifikacija karcinoma štitnjače .....	2
1.1.2.1. Diferencirani karcinomi štitnjače .....	3
1.1.2.2. Slabo diferencirani karcinomi štitnjače .....	6
1.1.2.3. Nediferencirani karcinomi štitnjače .....	7
1.1.2.4. Medularni karcinom štitnjače .....	7
1.1.3. Čimbenici koji predviđaju recidiv diferenciranih karcinoma štitnjače .....	8
1.1.3.1. Prognostički čimbenici .....	8
1.1.3.2. Prognostički bodovni sustavi .....	10
1.1.3.3. Molekulski prognostički čimbenici .....	12
1.1.4. Liječenje .....	15
1.2. Plazminogeni aktivacijski sustav .....	17
1.2.1. Sustav aktivacije plazminogena u tumorskom rastu i metastaziranju .....	17
1.2.1.1. Urokinazni aktivator plazminogena .....	17
1.2.1.2. Inhibitori aktivatora plazminogena .....	19
1.2.2. Sustav aktivatora plazminogena kao prognostički čimbenik u malignim tumorima .....	20
1.2.3. Sustav aktivatora plazminogena i karcinomi štitnjače .....	22
<b>2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	24
<b>3. BOLESNICI I METODE</b> .....	26
<b>4. REZULTATI</b> .....	29
4.1. Korelacija uPA i PAI-1 u citosolu tumorskog i normalnog tkiva štitnjače .....	35
4.2. Povezanost uPA i PAI-1 s prognostičkim čimbenicima .....	39

4.2.1. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu malignih tumora sa stupnjem diferencijacije tumora.....	39
4.2.2. Povezanost uPA i PAI-1 u citosolu malignih tumora s histološkim tipovima tumora .....	41
4.2.3. Povezanost uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s dobi bolesnika.....	43
4.2.4. Povezanost uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s veličinom tumora .....	47
4.2.5. Povezanost uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s multicentričnosti tumora.....	49
4.2.6. Povezanost uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s ekstratireoidnom invazijom .....	51
4.2.7. Povezanost uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s metastazama u regionalne limfne čvorove .....	53
4.2.8. Povezanost uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s udaljenim metastazama.....	55
4.3. Povezanost uPA i PAI-1 iz citosola diferenciranih karcinoma štitnjače s tumorskom progresijom .....	57
4.4. Određivanje neovisnih varijabli koje imaju utjecaj na preživljenje bez progresije (PFS) diferenciranih karcinoma štitnjače .....	59
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>63</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>71</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>72</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>74</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>76</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>90</b>

## POPIS KRATICA

Tg	tireoglobulin
PKŠ	papilarni karcinom štitnjače
FKŠ	folikularni karcinom štitnjače
MKŠ	medularni karcinom štitnjače
PCR	(engl. polimerase chain reaction)- lančana reakcija polimeraze
TSH	(engl. thyroid-stimulating hormone)- tireotropin
rhTSH	rekombinantni, humani TSH
ESMO	(European Society for Medical Oncology)
ASCO	(American Society of Clinical Oncology)
ETA	(European Thyroid Association)
ATA	(American Thyroid Association)
SEER	(Surveillance, Epidemiology and End Results)-program za statistiku karcinoma u SAD-u
TNM	(Tumor, Node, Metastasis)-klasifikacija tumora na temelju veličine tumora, zahvaćenosti limfnog čvora i prisustva udaljenih metastaza
AMES	(Age, Metastases, Extend, Size)-prognostički sustav koji se temelji na dobi bolesnika, udaljenim metastazama, proširenosti i veličini primarnog tumora.
AGES	(Age, Grade, Extend, Size)-prognostički sustav koji se temelji na dobi bolesnika, gradusu tumora, proširenosti, uključujući lokalnu invaziju i udaljene metastaze i veličini primarnog tumora.
MACIS	(Metastases, Age, Completeness of surgery, Invasion, Size)-prognostički sustav u koji su uključene metastaze, dob, kompletnost kirurškog postupka, ekstratireoidna invazija i veličina tumora
MMP	matriks metaloproteinaze
ECM	ekstracelularni matriks
PAS	plazminogeni aktivacijski sustav

uPA	urokinazni aktivator plazminogena
uPAR	receptor urokinaznog aktivatora plazminogena
tPA	tkivni aktivator plazminogena
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena tip 1
PAI-2	inhibitor aktivatora plazminogena tip 2
TGF	(engl. transforming growth factor ) - transformirajući faktor rasta
ELISA	(engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
PFS	(engl. progression-free survival)- preživljenje bez progresije
OS	(engl. overall survival)- sveukupno preživljenje
DFS	(engl. disease-free survival)- preživljenje bez bolesti
AJCC-UICC	(American Joint Commission on Cancer- International Union against Cancer)- Američka združena komisija za karcinome – Međunarodna unija za borbu protiv karcinoma
SEM	(engl. Standard error of the mean)-standardna pogreška srednje vrijednosti
HR	(engl. Hazard ratio)- omjer rizika
CI	(engl. Confidence interval)- interval pouzdanosti

## **1. UVOD**

### **1.1. Karcinomi štitnjače**

#### **1.1.1. Incidencija i prognoza diferenciranih karcinoma štitnjače**

Karcinom štitnjače nije jedinstveni klinički entitet već se radi o spektru različitih bolesti u smislu etiologije, patogeneze, terapijskog izbora i prognoze. Na jednoj strani su dobro diferencirani karcinomi štitnjače (papilarni i folikularni) s odličnom prognozom, a na drugoj su anaplastični karcinomi štitnjače sa smrtnim ishodom (1).

Karcinom štitnjače je najčešća maligna bolest endokrinog sustava s više od 90% učestalosti, a predstavlja svega 1% svih malignih bolesti (2,3).

Hundahl i sur. (4) izvjestili su o 53 856 bolesnika s karcinomom štitnjače u SAD od 1985. do 1995. Udio papilarnog karcinoma štitnjače u tom radu je 79,25%, folikularnog 12,5%, karcinoma Hürthleovih stanica i medularnog karcinoma oko 3%, dok je udio anaplastičnog karcinoma štitnjače 2%.

Podaci iz SAD-a kroz program SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), te europski podaci iz projekta GLOBOCAN 2002 Internacionalne agencije za istraživanje raka pokazuju progresivnu stabilizaciju incidencije i pad smrtnosti većine karcinoma (3, 5). S druge strane, incidencija karcinoma štitnjače raste (6), a neke studije izvješćuju i o porastu mortaliteta od karcinoma štitnjače, kako u Europi tako i u SAD (7).

Incidencija diferenciranih karcinoma štitnjače u 2003. godini u SAD je 20 000 novih slučajeva, odnosno 7 novih slučajeva na 100 000 ljudi kroz godinu. Incidencija je tri puta viša u žena, nego u muškaraca. Vrh incidencije se pojavljuje u žena u dobi od 40-44 godine, odnosno u muškaraca u 60-65 godina. Frekvencija recidiva karcinoma štitnjače kroz 30 godina je 30%, ukoliko se recidiv temelji na pozitivnoj morfološkoj metodi ili biopsiji. Frekvencija recidiva bila bi i viša u slučaju da se i samo povišeni tireoglobulin (Tg) uzme u obzir. Oko 4000 ljudi je umrlo u SAD od papilarnog ili folikularnog karcinoma štitnjače kroz 10-to godišnje razdoblje, do 1995. godine (8).

Razlog porasta incidencije diferenciranih karcinoma štitnjače je subjekt brojnih istraživanja. Moguće objašnjenje porasta učestalosti papilarnih karcinoma štitnjače posljednjih godina je izloženost pučanstva ionizirajućem zračenju, dodatak joda u prehrambene proizvode, promjene u histološkim kriterijima za dijagnozu karcinoma štitnjače, te široka upotreba slikovnih studija u bolesnika s polivalentnim smetnjama, najčešće upotreba ultrazvuka štitnjače. Smatra se da je slučajan nalaz glavni razlog porasta incidencije diferenciranih karcinoma štitnjače (9).

Prognoza karcinoma štitnjače je općenito dobra i petogodišnje preživljenje je preko 90% (10).

Prema tome sveukupno preživljenje kao pokazatelj ishoda bolesti je manje korišten u odnosu na udio povrata bolesti u procjeni morbiditeta od karcinoma štitnjače. U 53% slučajeva recidiv karcinoma štitnjače se prezentira unutar 5 godina od postavljanja dijagnoze, 77% unutar 15 godina, a u 16% slučajeva u više od 15 godina (8).

Međutim u nekih bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače tijekom bolesti je progresivan i nerijetko završava smrtnim ishodom. Mnogi autori tijekom proteklih godina pokušali su pronaći tumorski biljeg koji bi prognozirao tijek bolesti te time odredio ekstenzivnost kirurške terapije, primjenu radioaktivnog joda, ostale modalitete liječenja kao i način daljnjeg praćenja. Dosada niti jedan tumorski biljeg nije ušao u redovitu kliničku upotrebu.

### **1.1.2. Patologija i klasifikacija karcinoma štitnjače**

Patologija karcinoma štitnjače ima temeljno značenje u kliničkom postupku i ishodu bolesti. Osnovna podjela se zasniva na porijeklu stanica tumora i stupnju diferenciranosti tumora. Treća histološka klasifikacija tumora štitnjače Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) objavljena je 2004.godine. Prethodna klasifikacija tumora štitnjače koja se sastojala od 7 glavnih kategorija je napuštena i zamijenjena je s 3 glavne kategorije 1. karcinomi štitnjače, 2. adenom i s njim povezani tumori štitnjače, 3. drugi tumori štitnjače (11).



### 1.1.2.1. Diferencirani karcinomi štitnjače

Diferencirani karcinomi štitnjače opisuju sve dobro diferencirane karcinome štitnjače folikularnog porijekla. Dvije velike podgrupe su papilarni i folikularni karcinomi.

**Papilarni karcinom štitnjače (PKŠ)** je najčešći karcinom štitnjače (oko 85%) i njegova incidencija raste u posljednja dva desetljeća (12). Čimbenici rizika su izloženost radijaciji, što je i dokazano nakon akcidenta u Černobilu (13), a spekulira se i o prehrambenim faktorima, prvenstveno unosu joda.

Razlikovne značajke papilarnog karcinoma su maligne promjene stanice i jezgre.

Karakteristične promjene jezgre uključuju povećanje, hipokromaziju, intranuklearne inkluzije i jasne nukleole. Psamomska tjelešca mogu biti prisutna, ali nisu uvijek specifična za papilarni karcinom štitnjače.

Podvrste papilarnog karcinoma štitnjače su klasični papilarni, folikularni, onkocitni, te agresivnije varijante: difuzno sklerozirajući tip, tip visokih stanica, te tip cilindričnih stanica. Mikrokarinom štitnjače definira se kao papilarni karcinom štitnjače manji od 10 mm u promjeru, bez znakova širenja.

U **klasičnom obliku** papilarnog karcinoma arhitektura tumora se sastoji od papila s fibrovaskularnom stromom (14).

**Očahurena varijanta** papilarnog karcinoma štitnjače javlja se u 10% slučajeva i tumor je okružen dobro definiranom fibroznom kapsulom. Ima bolju prognozu od ostalih oblika papilarnog karcinoma štitnjače.

**Folikularnoj varijanti** PKŠ nedostaje papilarna arhitektura koja je uobičajena u drugih oblika. Stanice formiraju folikularnu formaciju, koja se vidi u drugih folikularnih lezija, a tumor se definira citološkim (nuklearnim) promjenama koje su tipične za klasični oblik (14).

Ishod papilarnog karcinoma štitnjače ovisi većinom o dobi bolesnika, veličini tumora, patohistološkoj klasifikaciji i prisustvu udaljenih metastaza (15, 16,17). Zahvaćanje paraglandularnih i paratrahealnih limfnih čvorova tumorskim procesom je često (18), a invazija krvnih žila te udaljene metastaze se javljaju u manje od 10% slučajeva (19).

Agresivnije varijante PKŠ su: difuzno sklerozirajući tip, tip visokih stanica, te tip cilindričnih stanica.

**Difuzno sklerozirajući** tip je rijedak oblik PKŠ-e, karakteriziran ekstenzivnom sklerozom, limfocitnom infiltracijom i psamomskim tjelešcima. Tumor obično zahvaća cijeli režanj. Većina autora izvještava da se tumor javlja u mlađih s oko 20% slučajeva u pedijatrijskoj dobi. Ova varijanta koncentrira I-131 i proizvodi Tg. Mnogi izvještaji klasificiraju difuzno sklerozirajuću varijantu u agresivnije tumore, budući da se često prezentiraju s ekstratireoidnom ekstenzijom i/ili metastazama. Međutim, ukoliko se tumor odgovarajuće liječi, prognoza bolesnika s difuzno sklerozirajućim tipom je slična kao i u bolesnika s klasičnim oblikom (20).

**Tip visokih stanica** održava papilarnu arhitekturu i citološka obilježja uobičajenog tipa PKŠ-e, ali stanice imaju obilnu citoplazmu što ih čini dva puta višima u odnosu na širinu stanica. Tumor bi trebao imati oko 70% visokih stanica da bi se označio visokostaničnim tipom. Za razliku od klasičnog oblika, mitoze su obično prisutne. Visokostanični tip se može javiti u bilo kojoj dobi, ali je srednja dob javljanja viša od klasičnog oblika (srednja dob je 52 godine za visokostanični tip; 36 godina za klasični oblik). Tip visokih stanica obično dovoljno koncentrira I-131 da se vidi na radiojodnom scintigramu, te stvara tireoglobulin u dovoljnoj mjeri da služi u praćenju tumora. Većina serija pokazuje da visokostanični tip ima lošiju prognozu od klasičnog oblika PKŠ (20). Nedavno objavljeni rad na 278 visokostaničnih tipova PKŠ-e pokazuje da se tip visokih stanica javlja češće u starijoj dobi, te ima češće ekstratireoidnu ekstenziju i slabije 5-godišnje preživljenje u odnosu na klasični oblik. Ukoliko su važni prognostički parametri (dob, ekstratireoidna invazija) kontrolirani, histologija visokih stanica ostaje značajan prognostički čimbenik za specifično preživljenje (21).

**Tip cilindričnih stanica** je izuzetno rijedak i javlja se u manje od 1% karcinoma štitnjače. Karakteriziran je s elongacijom tumorskih stanica s oskudnom citoplazmom, međutim, uobičajene nuklearne promjene mogu izostati. Pokazuje upadljivu stratifikaciju, obično s papilarnom arhitekturom. Mitoze su česte. Nekoliko radova izvještava o miješanom tipu visokih i cilindričnih stanica. Srednja dob javljanja varijante cilindričnih stanica je 47 godina s predominacijom žena. Nije zabilježeno javljanje ovog tipa tumora prije 16-te godine. Tip cilindričnih stanica obično koncentrira I-131 i stvara

Tg u dovoljnoj količini da bude koristan biljeg u praćenju tumora (14,20). Veći izvještaj o ishodu bolesnika s varijantom cilindričnih stanica je rad Weniga sa 16 bolesnika. U 14 bolesnika bolest je bila ograničena na štitnjaču, a preživljenje bez progresije bilo je 88% u praćenju od 6 godina (22). U pregledu Ringela, 9 od 24 bolesnika s varijantom cilindričnih stanica je umrlo od nekontroliranog rasta karcinoma (23).

**Folikularni karcinom štitnjače (FKŠ)** se javlja u 5-15% slučajeva, a definira se kao neoplazma porijekom iz folikularnih stanica s izostankom karakterističnih nuklearnih obilježja papilarnog karcinoma štitnjače. Obično se prikazuje kao solitarni čvor nepravilnih rubova s invazijom u okolno tkivo štitnjače. Za dijagnozu folikularnog karcinoma potrebna je prisutnost invazije čahure i krvnih žila, što se vidi jedino na patohistološkom preparatu. Citološki se ne može razlikovati folikularni adenom od folikularnog karcinoma. FKŠ uključuje dva podtipa: folikularni i karcinom Hürthleovih stanica. Ovaj posljednji pokazuje veći stupanj malignosti (24).

Prema stupnju invazije folikularni karcinom može biti minimalno ili opsežno invazivni tip. U minimalno invazivnom tipu FKŠ-e, lezija je dobro ograničena s fibroznom, tumorskom kapsulom. Dijagnoza minimalno invazivnog tipa se temelji na jednom od slijedećih svojstava: tumor invadira kapsulu ili tumor invadira krvne žile u kapsuli ili uz tumorsku kapsulu.

Opsežno invazivni tip FKŠ je invazivan tumor makroskopski i mikroskopski. Sastoji se od mikrofolikula ili solidnog tkiva tumora s malo koloida, a mitoze i nekroze mogu biti prisutne (14). Opsežno invazivni folikularni karcinomi pokazuju značajnu infiltraciju okolnog tkiva štitnjače i/ili krvnih žila. Kapsularna je invazija definirana prodorom tumora kroz čitavu debljinu kapsule. Vaskularna je invazija definirana nalazom tumorskih stanica koje su pokrivene endotelom ili povezane s trombom, u krvnim žilama smještenim u kapsuli ili izvan nje (11).

Ponašanje folikularnog karcinoma ovisi o dobi bolesnika, veličini tumora, proširenosti izvan štitnjače i udaljenim metastazama (25). Folikularni karcinom češće recidivira i metastazira, naročito u pluća i kosti. Općenito se može reći da je ishod bolesnika s folikularnim karcinomom lošiji u odnosu na papilarni.

**Karcinom Hürthleovih stanica** je podtip FKŠ-e, premda i PKŠ-e ima varijantu Hürthleovih stanica. Hürthleove stanice karakterizira obilna, eozinofilna citoplazma, a važno je napomenuti da se mogu vidjeti i u benignim procesima. Lezija se definira kao karcinom Hürthleovih stanica ukoliko je prisutno više od 70% takvih stanica.

Hürthle-cell varijanta folikularnog karcinoma se javlja u oko 3% karcinoma štitnjače, te oko 20% folikularnih karcinoma. Srednja dob javljanja je oko 55 godina. Brojni radovi izvještavaju o lošijoj prognozi varijante Hürthleovih stanica, temeljenoj na višem riziku udaljenih metastaza i višem specifičnom mortalitetu (35-40%) (20). U većoj studiji Lopeza-Penabad 2003. godine 8% od 89 slučajeva karcinoma Hürthleovih stanica bilo je komplicirano s konkurentnim anaplastičnim karcinomom. 40% bolesnika je umrlo od tumora tijekom praćenja (26).

Karcinom Hürthleovih stanica obilno stvara Tg, ali slabije nakuplja I-131 od folikularnog karcinoma.

Što se tiče Hürthle cell varijante papilarnog karcinoma pokazano je da je recidiv tri puta češći u odnosu na klasični oblik (28% prema 10%)(27).

#### **1.1.2.2. Slabo diferencirani karcinomi štitnjače**

Slabo diferencirani karcinomi štitnjače potječu od folikularnog epitela, a nalaze se između dobro diferenciranih i nediferenciranih u kontekstu patohistologije i biološkog ponašanja. Varijante slabo diferenciranih karcinoma su: solidni, trabekularni i inzularni karcinom.

**Inzularni karcinom** je najbolje definirani podtip slabo diferenciranog karcinoma u kojeg su tumorske stanice raspoređene u nakupine, odjeljene fibroznom stromom. Često se vide mitoze i nekroze (14). Inzularni karcinom se javlja u oko 2% karcinoma štitnjače, može se javiti u bilo kojoj životnoj dobi, te se javlja jednako u muškaraca i žena. Često nakuplja radioaktivni jod i obično stvara Tg (20).

Većina radova pokazuje da je prognoza inzularnog karcinoma lošija u odnosu na dobro diferencirane karcinome štitnjače (sveukupno preživljenje za inzularni karcinom 65% prema 95%-nom preživljenju za diferencirane karcinome). Mitotski index, nekroze i dob su glavni čimbenici koji određuju prognozu bolesnika sa slabo diferenciranim

karcinomima štitnjače (28, 29). Međutim, u radovima drugih autora nije nađeno slabije preživljenje bolesnika s inzularnim karcinomom štitnjače (30).

### **1.1.2.3. Nediferencirani karcinomi štitnjače**

Nediferencirani karcinomi štitnjače ne pokazuju papilarnu ili folikularnu sliku i ne zadržavaju folikularnu funkciju, a prezentiraju se kao anaplastični karcinomi. **Anaplastični karcinomi** se javljaju u 1% slučajeva karcinoma štitnjače, izrazito su agresivni i smatraju se jednim od najagresivnijih malignih tumora uopće sa smrtnim ishodom u gotovo 100% slučajeva. Medijan preživljenja u većini radova je 3-6 mjeseci. Karakteristično je za anaplastične karcinome da brzo rastu i metastaziraju i ne odgovaraju na radiojodnu terapiju. Anaplastični karcinomi pojavljuju se u nekoliko varijanti: vretenastih stanica, pločastih stanica, gigantskih stanica, te miješani, međutim biološko ponašanje za sve varijante je slično i prognoza je loša u svim slučajevima. Vretenasti uzorak pokazuje stanice oblikovane poput cigara, a odgovara visokom gradu nediferenciranih karcinoma. Pleomorfni oblik ili anaplastični karcinom gigantskih stanica se sastoji od pleomorfnih i bizarnih stanica. Prisutna je visoka mitotska aktivnost i nekroze. Budući da su ovi tumori nediferencirani, često je teško odrediti porijeklo iz folikularnih stanica. Anaplastični karcinom, također, može nastati dediferencijacijom već prisutnih dobro diferenciranih lezija (14, 20, 31).

### **1.2.2. 4. Medularni karcinom štitnjače**

Medularni karcinom štitnjače nastaje iz parafolikularnih C stanica štitnjače koje stvaraju kalcitonin. Predstavljaju oko 5% karcinoma štitnjače.

Medularni karcinom štitnjače pojavljuje se kao sporadični (75%) ili familijarni oblik (25%). Sporadični oblik je obično solitarni čvor u srednjoj trećini režnja štitnjače, dok se familijarni oblik javlja kao multicentrični i bilateralni tumor, udružen s hiperplazijom C stanica. Kalcitonin je specifični cirkulirajući biomarker i stvara se u tumorskim stanicama. Agresivnost medularnog karcinoma štitnjače ovisi o proliferaciji i brzini rasta tumora. Postoji nekoliko histoloških varijanta medularnog karcinoma štitnjače:

plazmocitoidni, malih stanica, fuziformni, velikostanični, ali je njihovo razlikovanje bez utjecaja u određivanju agresivnosti tumora. Karakteristično obilježje medularnog karcinoma štitnjače je prisustvo amiloida, koje je vidljivo u 80% slučajeva. Medularni karcinom štitnjače metastazira u regionalne limfne čvorove, ali i udaljene metastaze se javljaju u 20% slučajeva (32). MKŠ-e nikad ne koncentriraju I-131. Prognostički faktori uključuju dob, spol, veličinu tumora i inicijalnu proširenost bolesti (33). Nedavna istraživanja pokazala su da mutacije RET protoonkogeni mogu identificirati nasljedni oblik medularnog karcinoma štitnjače, bilo da se radi o izoliranom obliku ili multiploj endokrinoj neoplaziji (MEN)(34).

### **1.1.3. Čimbenici koji predviđaju recidiv diferenciranih karcinoma štitnjače**

#### **1.1.3.1. Prognostički čimbenici karcinoma štitnjače**

Razumijevanje biologije karcinoma štitnjače unaprijedilo se u zadnja dva desetljeća s razumijevanjem prognostičkih čimbenika i podjele bolesnika u rizične grupe. Dobro poznati prognostički čimbenici u diferenciranih karcinoma štitnjače su : dob, veličina primarnog tumora i gradus, ekstrakapsularna ekstenzija i udaljene metastaze. Temeljem tih prognostičkih faktora bolesnici se mogu podijeliti u 3 skupine: vrlo niskog rizika, niskog i visokog rizika.

**Dob bolesnika** ima veliki utjecaj na ishod karcinoma štitnjače. Karcinom štitnjače je jedini karcinom u humanoj patologiji za koji dob predstavlja neovisni prognostički čimbenik. Gotovo svi *staging* sustavi karcinoma štitnjače uključuju dob kao važnu prognostičku varijablu. Bolesnici mlađi od 45 godina imaju bolju prognozu od onih starijih od 45 godina. Također je pokazano da djeca mlađa od 15 godina imaju recidiv i udaljene metastaze karcinoma štitnjače slično kao bolesnici stariji od 60 godina. Djeca se često prezentiraju s više uznapredovalim stadijem bolesti nego odrasli i imaju više recidiva, ali žive još mnogo godina nakon recidiva (35).

Većina radova pokazuje da je prognoza diferenciranih karcinoma štitnjače lošija u muškaraca, nego u žena. U muškaraca se bolest dijagnosticira kasnije i u vrijeme dijagnosticiranja imaju više zahvaćenih limfnih čvorova u odnosu na žene.

Oko 10% bolesnika s PKŠ-e i do 25% s FKŠ-e razvija **udaljene metastaze**, a oko polovine su prisutne u vrijeme dijagnoze. Češće se javljaju (35%) u karcinomu Hütthleovih stanica i bolesnika starijih od 40 godina (26). U 49% slučajeva karcinomi štitnjače metastaziraju u pluća, u 25% u kosti, 15% u pluća i kosti i 10% u središnji živčani sustav (36). 5-godišnje preživljenje bolesnika s udaljenim metastazama iznosi 53%, a 10-godišnje 38% i 15-godišnje 30% (37). Preživljenje je bolje u slučaju difuznih, mikroskopskih metastaza pluća, vidljivih jedino na postterapijskom, radiojodnom scintigramu, a lošije ukoliko su plućne metastaze veće i ne nakupljaju I-131 (8).

Postoji linearna povezanost između **veličine primarnog tumora** i recidiva, odnosno mortaliteta za papilarni i folikularni karcinom štitnjače (38). Recidiv i mortalitet papilarnih karcinoma manjih od 1 cm su izrazito rijetki (39). Ipak, mikrokarcinomi su u 20% slučajeva multifokalni i do 60% imaju pozitivne cervikalne limfne čvorove, a u nekih se čak razvijaju i metastaze u pluća (40).

**Lokalna invazija tumora** javlja se u 5% do 10% slučajeva u papilarnih i folikularnih karcinoma štitnjače, povećavajući morbiditet i mortalitet. Najčešće invadirane strukture su mišići i krvne žile vrata, povratni laringealni živac, larinks, farinks, traheja, ezofagus, ali se tumor može proširiti i do medule spinalis i brahijalnog plexusa (8). Lokalna invazija prisutna je u 8% papilarnih i 12% folikularnih karcinoma (38). Mikroskopska tumorska invazija ima značajno bolju prognozu od makroskopske invazije okolnih struktura.

Multicentrični tumori se nađu rutinskim pregledom u 20% bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače, te čak u 80% bolesnika, ako se štitnjača pregledava s većom pažnjom. Oko polovine bolesnika upućenih na rutinsku tireoidektomiju zbog unilateralnog karcinoma štitnjače ima tumor u kontralateralnom režnju (10, 41). Koristeći gensku analizu, noviji radovi pokazuju da su multifokalni papilarni karcinomi štitnjače individualni tumori koji rastu neovisno (42). Prisustvo tumora u kontralateralnom režnju ne može se predvidjeti na temelju stratifikacije kliničkog rizika i često se tek vidi na patohistološkom preparatu (41).

Prognostički značaj **regionalnih limfnih čvorova** je proturječan. Do sada ima velik broj radova koji nalaze da su nodalne metastaze čimbenik rizika za lokalni recidiv tumora, udaljene metastaze i karcinom-specifični mortalitet, a posebno ukoliko se radi o bilateralnim ili medijastinalnim limfnim čvorovima (38, 40). Incidencija i smještaj metastatskih limfnih čvorova varira s tipom tumora, dobi bolesnika i ekstenzijom operativnog zahvata. Metastaze u limfne čvorove vide se u 36% odraslih bolesnika s PKŠ-e, te u 80% djece s PKŠ-e (36, 43). Mikrometastaze su i češće, te se nalaze u oko 60% slučajeva, a u polovini slučajeva bilateralno. Cistične metastaze nalaze se u trećini slučajeva bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače (44).

Neki sustavi uvrštavaju **kompletnost resekcije štitnjače**, kao prognostički čimbenik. Pokazano je da su recidivi češći u onih bolesnika u kojih je učinjena subtotalna tireoidektomija (45).

Utjecaj **histološkog nalaza** na ishod bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače ispitan je na 875 bolesnika s PKŠ-e i 350 bolesnika s FKŠ-e. Tumor-specifični mortalitet bio je isti za papilarni i folikularni karcinom štitnjače, u slučaju kad je analiza bila kontrolirana za ostale prognostičke čimbenike. Multivarijatnom analizom identificirane su četiri neovisne varijable koje imaju utjecaj na prognozu tumora: udaljene metastaze, dob, veličina primarnog tumora i tumorska invazija; međutim, nađeno je da histologija nije prediktivni čimbenik preživljenja (46).

### **1.1.3.2. Prognostički bodovni sustavi karcinoma štitnjače**

Različiti prognostički bodovni sustavi temeljeni na regresijskoj analizi prediktivnih čimbenika, predloženi su za razvrstavanje bolesnika s karcinomom štitnjače u tri grupe: vrlo niskog rizika, niskog i visokog rizika.

Najčešće korišten sustav za predviđanje preživljenja je TNM sustav, u kojem T označava ekstenziju primarnog tumora, N pokazuje zahvaćenost lokalnih limfnih čvorova, a M prisutnost udaljenih metastaza. Zadnja recenzija TNM klasifikacije 2002. godine naglasila je važnost dobi bolesnika zajedno s histološkim tipom u prognozi folikularnog i papilarnog karcinoma štitnjače (12, 18, 47, 48). U novoj klasifikaciji 2002. dvije važne



promjene su istaknute. Prvo, svi tumori  $\leq 2$  cm u promjeru, ali ograničeni na štitnjaču su sada klasificirani kao T1, dok su ranije samo tumori  $\leq 1$  cm bili klasificirani kao T1. Drugo, zahvaćenost limfnih čvorova pomiče tumore u grupu lošije prognoze premda su veličinom i dobi bili svrstani u grupu povoljnije prognoze. Dosadašnja istraživanja pokazivala su da metastaze u limfne čvorove imaju ograničeni značaj u sveukupnom preživljenju (49, 50, 51).

Ostale važne točke klasifikacije su:

- Ekstratireoidna ekstenzija svrstava tumore u T3 ili T4
- Metastatski limfni čvorovi su ili prisutni (N1) ili odsutni (N0). Broj čvorova ne mijenja stadij.
- Svi anaplastični karcinomi su 4. stadij bolesti (52).

U suglasnosti s TNM sustavom definirane su u Europi tri rizične skupine za diferencirani karcinom štitnjače:

- Vrlo niski rizik: unifokalni T1(<1cm)N0M0, bez proširenosti izvan kapsule štitnjače i povoljne histologije (klasična ili folikularna varijanta PKŠ-e i minimalno invazivni FKŠ-e)
- Niski rizik: T1(>1cm) ili T2N0M0 ili multifokalni T1N0M0
- Visoki rizik: bilo koji T3 i T4 ili bilo koji T,N1, ili bilo koji M1

U smjernicama Američkog udruženja za štitnjaču (ATA- American Thyroid Association) bolesnici su razvrstani u slijedeće kategorije:

- Niski rizik: T1-2N0M0 i odsustvo agresivne histologije ili vaskularne invazije
- Srednji rizik: T3 ili tumor s agresivnom histologijom ili vaskularnom invazijom
- Visoki rizik: T4 ili bilo koji T,N1 ili M1

Mortalitet bolesnika vrlo niskog rizika je manji od 1%, dok mortalitet bolesnika visokog rizika je oko 46% (53).

Ostali bodovni sustavi uključuju AMES, AGES, MACIS, Ohio State Scoring System i dr. AMES sustav je temeljen na kombinaciji dobi (*Age*), udaljenim metastazama (*Metastases*), proširenosti (*Extend*) i veličini primarnog tumora (*Size*). Na temelju tog sustava bolesnici s papilarnim i folikularnim karcinomom štitnjače su podijeljeni u grupu

niskog rizika (dob  $\leq$  40 godina za muškarce, odnosno 50 godina za žene, bez udaljenih metastaza, veličina tumora  $\leq$  5 cm) i grupu visokog rizika (dob  $\geq$  40 godina za muškarce, 50 godina za žene, udaljene metastaze, ekstrakapsularna ekstenzija i veličina primarnog tumora  $\geq$  5 cm (54).

AGES sustav se razvio na Mayo klinici 1987. godine i uključuje slijedeće varijable: dob (*Age*), gradus (*Grade*), proširenost (*Extend*) uključujući lokalnu invaziju i udaljene metastaze i veličinu (*Size*) primarnog tumora. 1993.g. ovaj bodovni sustav je revidiran , te je isključen gradus tumora, a uključene metastaze (*Metastases*),dob (*Age*), kompletnost kirurškog postupka (*Completeness of surgery*), ekstrapireoidna invazija (*Invasion*) i veličina tumora (*Size*)(55).

Ohio State Scoring System se razlikuje od drugih sustava jer ne uključuje dob u prognostičke varijable, već uzima u obzir veličinu tumora, metastaze u limfne čvorove, multicentričnost, lokalnu invaziju i udaljene metastaze (10). U komparativnoj studiji sustava TNM, AMES, AGES, i MACIS nije nađena značajna razlika. Niti jedan od predloženih sustava nije pokazao jasnu prednost u predviđanju ishoda karcinoma štitnjače (12,48, 56). Analizom prognostičkih sustava TNM sustav pokazao se najboljim i najviše pogodnim za predviđanje ishoda bolesti u bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače (57). TNM klasifikacija ostaje najčešće upotrebljavana i obzirom da predstavlja brzu metodu procjene proširenosti bolesti, a također i zbog upotrebe u onkologiji drugih organa.

### **1.1.3.3. Molekulski prognostički čimbenici**

Uobičajeno je da se prognoza ishoda karcinoma štitnjače temelji na vrijednosti cirkulirajućeg tireoglobulina u bolesnika s totalnom tireoidektomijom. Praćenje tireoglobulina otkriva da li se radi o perzistentnoj bolesti ili o recidivu karcinoma štitnjače (58,59).

Slijedeći tumorski biljeg koji se često upotrebljava za procjenu recidiva medularnog karcinoma štitnjače je kalcitonin. Također , ekspresija kalcitonina u imunohistokemijskoj

analizi uzorka ima prognostički značaj jer se pokazalo da medularni karcinom štitnjače s negativnim kalcitoninom ima agresivniji tijek bolesti (60).

Razumijevanje biologije karcinoma štitnjače unaprijeđeno je prepoznavanjem nekih prognostičkih čimbenika. Obećavajući biološki čimbenici kao što je receptor epidermalnog faktora rasta, katepsin, odgovor adenilat ciklaze, DNA ploidiya, telomeraza, onkofetalni fibronektin, p 53 i E kadherin pojavljaju se kao potencijalni prognostički parametri (61).

Imunohistokemijski biološki čimbenici se upotrebljavaju u dijagnostici PKŠ-e i MKŠ-e, pokazujući različiti stupanj senzitivnosti i specifičnosti.

Imunohistokemijska istraživanja PKŠ-e identificirala su nekoliko bioloških biljega. Do sada nađeni biljezi s najvišom osjetljivošću i specifičnošću su: Hector Battifora mesothelial cell 1 (HBME-1), citokeratin 19 (CK 19), galektin-3 i c-Met protoonkogen.

**HBME-1** je monoklonsko protutijelo stvoreno protiv mikrovilozne površine mezotelnih stanica mezotelioma. Izvijesteno je da je HBME-1 reaktivan u mnogo slučajeva PKŠ-e, a negativan je u benignim bolestima. Time je taj biljeg dosta specifičan za PKŠ-e, ali pokazuje slabu osjetljivost (62). Naime, onkocitne stanice PKŠ-e su nereaktivne s HBME-1 i negativni rezultat ne isključuje dijagnozu karcinoma.

**Citokeratin 19 (CK 19)** je citokeratin visoke molekulske težine koji pokazuje visoku senzitivnost, ali slabu specifičnost za PKŠ-e.

**Galektin-3** je član beta-galaktozida koji se izražava u PKŠ-e, uglavnom u klasičnoj formi. Imunoreaktivnost za galektin-3 pokazana je i u brojnim FKŠ-e, te je galektin-3 razmatran kao potencijalni čimbenik u razlikovanju benignih i malignih folikularnih lezija (63). Upravo zato se i anti-galektin-3 protutijelo predložilo kao pomoćna procedura u konvencionalnoj citologiji u dijagnostici čvora štitnjače (64,65). Međutim, specifičnost galektina-3 je slaba budući da je reaktivan i u benignim lezijama štitnjače, a također i senzitivnost nije visoka jer su mogući lažno negativni rezultati u minimalno invazivnom folikularnom karcinomu. (66).

**c-Met proto-onkogen**, lokaliziran na dugom kraku 7. kromosoma, kodiran je za receptor tirozin kinaze, c-met. Papilarni karcinom štitnjače je povezan sa sto puta većom ekspresijom c-met proto-onkogenom, a rijetko je izražen u drugim tumorima štitnjače (67).

Molekulski biljezi štitnjače odgovaraju genetskim mutacijama proizašlim u malignim stanicama štitnjače. Nekoliko molekularnih alteracija (mutacija i/ili genskih preraspodjela) je opisano, a uključeni su u razvoj papilarnog i folikularnog karcinoma štitnjače, kao i medularnog. Ekspresija svakog molekularnog biljega proučava se na smrznutom tumorskom materijalu metodom lančane reakcije polimeraze (PCR-eng. polymerase chain reaction).

Mutacije protoonkogena **B-RAF** značajne su u staničnoj, tumorskoj progresiji i najviše ukazuju na razvoj papilarnog karcinoma štitnjače. Izgleda da mutacija protoonkogena B-RAF nije učestala u drugim histološkim tipovima. Prevalencija B-RAF mutacije u karcinoma štitnjače varira između 23 i 62%. Oko povezanosti mutacije B-RAF s kliničkim ishodom bolesti postoje u literaturi proturječja, pa tako u nekim radovima nije pronađena povezanost između B-RAF mutacije i agresivnog ponašanja tumora (68, 69), dok je u nešto novijem radu pokazana povezanost mutacije gena B-RAF<sup>V600E</sup> s PKŠ-e visokog rizika, posebno u folikularnoj varijanti s invazivnim tumorskim rastom (70).

Druga najčešća genska alteracija koja se opisuje u PKŠ-e je preraspodjela **RET/PTC**. RET je protoonkogen, a preraspodjela genskog materijala rezultira aktivacijom protoonkogena RET i njegova prelaska u onkogen RET. U odraslih je ta preraspodjela gena nađena u oko 15-20% PKŠ-e, dok je nakon Černobilske katastrofe nađena u 87% slučajeva PKŠ-e. Preraspodjela RET/PTC je ograničena na papilarne karcinome štitnjače, uključujući klasični oblik, ali i onkocitnu i difuzno sklerozirajuću varijantu. Međutim, njihova je specifičnost upitna budući da se preraspodjela RET/PTC nalazi i u netumorskim folikularnim stanicama (71).

U medularnom karcinomu štitnjače također je nađena mutacija protoonkogena RET.

Slijedeća genska alteracija koja se nalazi u PKŠ-e je točkasta **RAS mutacija**, uključujući specifične regije sva tri RAS onkogena: H-RAS, K-RAS i N-RAS. RAS mutacije nalaze se također i u folikularnom karcinomu štitnjače, kao i u anaplastičnom. Međutim, RAS mutacije nemaju dijagnostički značaj u razlikovanju folikularnih adenoma od folikularnih karcinoma štitnjače (72).

Ekspresija genske preraspodjele, koja uključuje fuziju gena za tireoidni specifični transkripcijski čimbenik **PAX8** i **PPAR $\gamma$**  gena ima ulogu u progresiji folikularnog

adenoma u folikularni karcinom. Ovaj fuzijski gen nađen je u manje od 10% folikularnih adenoma. Razvoj anaplastičnog karcinoma štitnjače iz papilarnog ili folikularnog oblika povezan je s mutacijom (brisanjem) gena **p53** koji je po svojoj funkciji antionkogen (73). **Matriks metaloproteinaze** (MMP) potpomažu degradaciju ekstracelularnog matriksa, a time omogućuju invaziju i metastaziranje karcinoma štitnjače. Za sada se još istražuju kao potencijalni prognostički parametri (74).

Novi prognostički biološki čimbenici se stalno istražuju. Međutim, do danas niti jedan nije ušao u rutinsku kliničku praksu i ostaje otvoreno da li i jedan biološki čimbenik može biti točniji i sigurniji nego do sada upotrebljavani bodovni prognostički sustavi.

#### 1.1.4. Liječenje

Inicijalna terapija za diferencirane karcinome štitnjače je totalna ili gotovo-totalna tireoidektomija. Korist od profilaktičke, paratrahealne disekcije limfnih čvorova, bez preoperativno pozitivnog nalaza limfnih čvorova je proturječna. Nema dokaza da poboljšava preživljenje, međutim profilaktička disekcija omogućuje određivanje točne proširenosti bolesti (*staging*).

Disekcija limfnih čvorova po skupinama izvodi se u slučaju preoperativno ili intraoperativno dokazane/suspektne metastaze.

Nakon operativnog zahvata uobičajeno slijedi primjena  $^{131}\text{I}$  u svrhu ablacije ostatnog tkiva štitnjače i potencijalnog mikroskopskog ostatnog tumora. Radiojodna ablacija smanjuje rizik lokoregionalnog recidiva, omogućuje praćenje bolesnika radiojodnim scintigramom cijelog tijela, te omogućuje određivanje serumskog tireoglobulina (Tg). Radiojodna ablacija preporučuje se u bolesnika visokog rizika i niskog rizika, dok se za bolesnike vrlo niskog rizika (unifokalni tumor manji od 1 cm, povoljne histologije, bez ekstratireoidne proširenosti i bez pozitivnih limfnih čvorova) radiojodna ablacija ne preporučuje (75, 76).

Učinkovita radiojodna ablacija zahtijeva adekvatnu stimulaciju s TSH koja se postiže prekidom supstitucijske terapije l-tiroksinom kroz 4 tjedna ili primjenom rekombinantnog

humanog TSH (rhTSH). Nedavna multicentrična i prospektivna studija pokazala je da je primjena rhTSH efikasna i sigurna te da je uspješnost ablacije uz pomoć rhTSH slična kao u uvjetima prestanka uzimanja l-tiroksina (77). Primjena rhTSH je odobrena u Europi 2005. godine te u SAD-u 2007. godine kao priprema za radiojodnu ablaciju bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, bez metastaza, koristeći fiksnu dozu od 3700 MBq (100 mCi)  $^{131}\text{I}$ . Međutim, nedavna randomizirana, prospektivna studija pokazala je da je u bolesnika pripremljenih s rhTSH doza od 1850 MBq (50 mCi)  $^{131}\text{I}$  jednako učinkovita kao i 3700 MBq (100 mCi  $^{131}\text{I}$ ), čak i u prisutnosti metastaza u limfne čvorove (78).

Terapija lokoregionalne bolesti temelji se na kombinaciji kirurške i radiojodne terapije. Udaljene metastaze se liječe uspješno ukoliko lezije nakupljaju  $^{131}\text{I}$ . Najbolje se liječe radioaktivnim jodom male metastaze u plućima koje nisu vidljive na rentgenogramima. Plućne makronodularne metastaze mogu imati korist od radioaktivnog joda, međutim definitivno liječenje je vrlo loše. Metastaze u kosti imaju najlošiju prognozu, iako se liječe kombinacijom vanjskog zračenja i radijodne terapije. Metastaze u mozak su rijetke i obično imaju lošu prognozu. Kirurška resekcija i radioterapija predstavljaju jedinu terapijsku mogućnost.

Vanjsko zračenje je indicirano u slučaju kada kirurška ekscizija nije moguća, odnosno kada nema značajnog radiojodnog nakupljanja u tumoru. Također se vanjsko zračenje primjenjuje kao adjuvantna terapija u slučaju lokalne tumorske invazije, te kao palijativna terapija u slučaju kompresije medule spinalis (uz kiruršku terapiju), obstrukcije gornje šuplje vene i disfagije. Vanjsko zračenje u karcinoma štitnjače uključuje ležište štitnjače i limfne čvorove (paratrahealne, pretrahealne, gornjeg medijastinuma te cervikalne). Cilj je predati 60 Gy u 30 frakcija kroz 6 tjedana, a doza na medulu spinalis ne smije preći 46 Gy. Danas se koristi tri-dimenzijska konformalna radioterapija koja je kreirana tako da donosi planiranu dozu zračenja na štitnjaču i ostala mjesta makroskopske bolesti bez dodatnog ozračenja medule spinalis (79).

Konvencionalna kemoterapija je ograničena samo za bolesnike s uznapređovalom bolešću u kojih su iscrpljeni drugi načini liječenja i nema veću efikasnost.

Ciljana terapija, nova generacija liječenja u onkologiji, usmjerena je na inhibiranje specifičnih molekularnih ciljeva važnih u tumorskom rastu i progresiji. Nekoliko agensa koji se istražuju u kliničkim studijama uključuju inhibitore angiogeneze (sorafenib,

aksitinib, vandetanib), receptore epidermalnog faktora rasta (gefitinib, vandetanib) i RET proteine (vandetanib). Nekoliko molekula doseglo je fazu II i III kliničke studije s obećavajućim rezultatima (80,81).

## **1.2. Plazminogeni aktivacijski sustav**

### **1.2.1. Sustav aktivacije plazminogena u tumorskom rastu i metastaziranju**

Obilje je eksperimentalnih dokaza da sustav aktivacije plazminogena igra važnu ulogu u procesu tumorske invazije i metastaziranja preko upliva sustava na angiogenezu i migraciju stanica (82, 83).

Proces metastaziranja je događaj koji uključuje nekoliko stepenica: lokalnu invaziju, degradaciju ekstracelularnog matriksa (ECM), angiogenezu, intravazaciju (ulazak malignih stanica u cirkulaciju), supresiju apoptoze i preživljenje u cirkulaciji, ekstravazaciju i rast na sekundarnom mjestu (84). Jedan od ključnih medijatora ovog procesa je serinska proteaza urokinazni aktivator plazminogena.

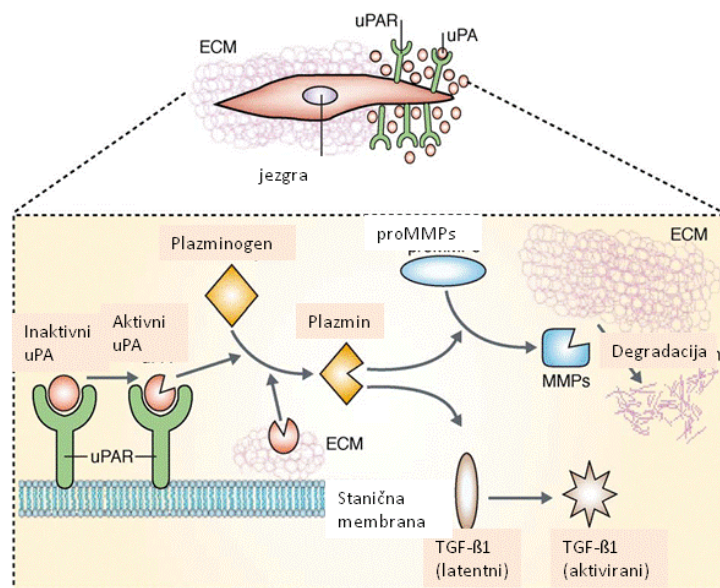
Sustav aktivacije plazminogena sastoji se od pet esencijalnih molekula: urokinazni aktivator plazminogena (uPA), receptor urokinaznog aktivatora plazminogena (uPAR), inhibitori aktivatora plazminogena (PAI-1, PAI-2) i tkivni aktivator plazminogena (tPA).

#### **1.2.1.1. Urokinazni aktivator plazminogena**

Sustav uPA je primarno vezan za degradaciju i regeneraciju bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa što dovodi do metastaziranja. Protein uPA sastavljen je od 411 aminokiselina i sintetizira se kao 53 KD zimogen (pro-urokinaza). uPA se smatra multifunkcionalnim proteinom koji je uključen u proteolizu i signalnu transdukciju. Kao proteaza uPA katalizira aktivaciju plazminogena u plazmin, koji olakšava oslobađanje nekoliko proteolitičkih enzima, uključujući gelatinazu, fibronektin, fibrin i latentnu formu kolagenaze (85). Plazmin također može posredovati u degradaciji ECM-a indirektno, putem aktivacije latentnih matriks metaloproteinaza (MMPs), kao što su MMP-3, MMP-9, MMP-12 i MMP-13. Plazmin može aktivirati ili osloboditi specifične čimbenike

rasta, kao što su fibroblastni faktor rasta 2 (FGF 2), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i transformirajući faktor rasta  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). Ovi čimbenici rasta imaju mogućnost da potaknu tumorsku progresiju stimuliranjem angiogeneze, kao i povećanjem stanične proliferacije i migracije. Degradacija ECM-a je preduvjet za tumorsku invaziju i metastaziranje.

Uloga uPA u procesu širenja karcinoma ostvaruje se putem sposobnosti uPA da stimulira angiogenezu, mitogenezu, migraciju stanica i modulira adheziju stanica. Također je pokazano da uPA prevenira apoptozu, a time povećava preživljenje malignih stanica (86). uPA je jedan od najmoćnijih bioloških biljega opisanih do danas.



Slika 1. Sustav uPA: uPAR veže pro-uPA koji se konvertira u aktivni uPA. Aktivni uPA konvertira inaktivni zimogen plazminogen u aktivni plazmin, koji onda razara komponente ekstracelularnog matriksa ili aktivira latentne faktore rasta kao što je TGF. Plazmin također degradira ECM indirektno preko aktivacije pro-matriks metaloproteinaza. (preuzeto iz Duffy MJ. Clin Biochem 2004) (87)



## **uPAR**

uPAR je glikoprotein bogat cisteinom, vezan na membranu plazme karboksilnom skupinom, a zreli protein sadrži 283 aminokiseline. uPAR ima mnoge funkcije, uključujući migraciju stanica, stimulaciju diacilglicerola, regulaciju cAMP, interakciju s integrinima, tirozin kinazom i serin/treonin kinazama (85). Vezanje uPA za receptor uPAR dovodi do dvije važne posljedice. Kao prvo, vodi u povećanu i fokusiranu proteolizu, te drugo, interakcija liganda i receptora rezultira u signalnoj transdukciji.

## **tPA**

Tkivni aktivator plazminogena (tPA) je protein sastavljen od 527 aminokiselina, također se sintetizira kao zimogen. Međutim tPA je uglavnom involviran u intravaskularnu trombolizu.

### **1.2.1.2. Inhibitori aktivatora plazminogena**

Inhibitori aktivatora plazminogena su anti-proteaze koje inhibiraju uPA i tPA. Dva su podtipa: PAI-1 i PAI-2. Pokazano je da su oba inhibitora upletena u metastaziranje, rast tumora i opće preživljenje bolesnika s karcinomom. PAI-1 i PAI-2 pripadaju obitelji serpina (od engl. serine proteinase inhibitors).

PAI-1 egzistira kao jednostruki lanac glikoproteina s 379 amino kiselina (oko 52 KD protein), formira kovalentni kompleks s tPA i uPA i značajno je izražen kroz cijeli tumor. PAI-2 cirkulira kao glikolizirana (60KD) i neglikolizirana (47KD) intracelularna forma. PAI-2 je izražen u placenti, monocitima/makrofazima i epidermisu (85).

## **PAI-1**

PAI-1 je glavni inhibitor sustava uPA/uPAR. PAI-1 se veže na aktivni kompleks uPA u kompleksu s uPAR i donosi internalizaciju cijelog kompleksa, uPAR-uPA-PAI-1 kompleksa.

Uloga PAI-1 u različitim tumorima je paradoksalna. Logično bi bilo da PAI-1, inhibirajući uPA, negativno utječe na proliferaciju karcinoma, međutim u mnogim je radovima pokazano da PAI-1 pozitivno utječe na invaziju tumora i angiogenezu, te korelira s lošom prognozom (88). Suprotno tome, gubitak PAI-1 je bio povezan s redukcijom rasta tumora, invazije i metastaziranja (89). Razlog zbog kojeg PAI-1 korelira s lošom prognozom u bolesnika s karcinomom nije sasvim jasna. Pretpostavlja se da je PAI-1 nužan za angiogenezu, zatim da modulira adheziju i migraciju stanica čime ubrzava proces metastaziranja. PAI-1 također inhibira apoptozu (86).

## **PAI-2**

PAI-2 formira također kompleks s uPA. Pokazano je da prekomjerna ekspresija PAI-2 inhibira apoptozu i potiče razvoj tumora, ali djeluje znatno sporije nego PAI-1. Nema dokaza da PAI-2 kontrolira adheziju i migraciju tumorskih stanica (87).

### **1.2.2. Sustav aktivatora plazminogena kao prognostički čimbenik u malignim tumorima**

Pokazano je u radovima nezavisnih istraživanja da su uPA i PAI-1 neovisni prognostički čimbenici u bolesnika s karcinomom dojke, te se smatraju prvim biološkim čimbenicima koji imaju prognostički značaj, provjeren prospektivnim randomiziranim studijama, odnosno skupnim analizama (86).

Prospektivna studija uPA/PAI-1 u bolesnika s karcinomom dojke i negativnim limfnim čvorovima (N0) je završena i prikazana na godišnjem sastanku Američkog društva za kliničku onkologiju (ASCO - American Society of Clinical Oncology) 2009. godine. Studija je obuhvatila više od 4000 bolesnika s N0 karcinomom dojke i pokazala da je određivanje uPA i PAI-1 moguće i pouzdano čak i iz uzoraka dobivenih biopsijom širokom iglom (engl. core needle). Koristeći tumorski gradus i uPA/PAI-1, adjuvantna kemoterapija može se izbjeći u 39% bolesnika s N0 karcinomom dojke. (90, 91). Kvantifikacija uPA/PAI-1 u tumorskom tkivu dojke predstavlja relevantan prognostički

čimbenik, te se smatra da uPA/PAI-1 treba integrirati u postupnik za izbor bolesnica s N0 karcinomom dojke u kojih bi se kemoterapija mogla izbjeći (92).

Osim u karcinoma dojke, visoke koncentracije uPA povezane su s agresivnom bolesti u mnogih malignih tumora, kao što su karcinomi probavnog, respiratornog, genitourinarnog sustava, te osteosarkomi i melanomi (85, 93).

U karcinoma želuca, visoke vrijednosti uPA i PAI-1 su značajno povezane s kraćim preživljenjem (94). U kolorektalnog karcinoma nađena je pozitivna korelacija između uPA i PAI-1 i kliničkopatoloških čimbenika. Multivarijatnom analizom pokazano je da su varijable uPA i PAI-1 neovisni prognostički parametri (95).

U karcinoma jajnika povišene vrijednosti uPA i PAI-1 u tumorskom tkivu koreliraju s većom rezidualnom tumorskom masom i kraćim preživljenjem bez progresije (PFS) i sveukupnim preživljenjem (OS). Nadalje, uPA je neovisni prognostički čimbenik za PFS i OS (96). Kombinacija visokih koncentracija uPA i PAI-1u citosolu karcinoma endometrija ukazuje na skupinu bolesnica s visokim rizikom za progresiju (97).

U karcinomu pluća nemalih stanica nije nađena značajna korelacija između plazminogenog aktivacijskog sustava i preživljenja (98). Međutim, u planocelularnom karcinomu pluća, visoke vrijednosti uPAR i PAI-1 povezane su s kraćim sveukupnim preživljenjem (99).

Za karcinom bubrežnih stanica uPA, uPAR i PAI-1 su snažni i neovisni prognostički čimbenici (100).

Imunohistokemijskom metodom na 230 bolesnika s karcinomom prostate nađeno je da povećana izražajnost uPA i PAI-1 predskazuje agresivniji recidiv bolesti (101).

Vrijednosti PAI-1 su značajno više u bolesnika s malignim melanomom veće debljine (Breslow>0,75 mm), veće invazivnosti s mikroskopskim ulceracijama i vaskularnom invazijom. Određivanje uPA i PAI-1 omogućuju dodatnu prognostičku informaciju (102). Kombinirajući ekspresiju članova plazminogenog aktivacijskog sustava u tumorskom tkivu i serumu bolesnika sa sarkomom mekih tkiva, nađena je značajna povezanost uPA, PAI-1, uPAR iz tumorskog tkiva, te uPAR iz seruma sa specifičnim mortalitetom (103).

### 1.2.3. Sustav aktivatora plazminogena i karcinomi štitnjače

Mnogo je kliničkih dokaza da visoke vrijednosti uPA i PAI-1 mogu predvidjeti lošu prognozu različitih solidnih tumora (104).

Unatoč mnogobrojnim radovima o ulozi uPA i PAI-1 u progresiji mnogih karcinoma, malo je informacija o ekspresiji dijelova plazminogenog aktivacijskog sustava u karcinoma štitnjače, kao i o njihovoj ulozi u prognozi tumora štitnjače.

Uplitanje sustava aktivatora plazminogena u proces degradacije ekstracelularnog matriksa koristeći stanice karcinoma štitnjače prikazano je u radu Smita i suradnika (105). U tom radu opažena je razlika aktivnosti PAI-1 između stanica folikularnog karcinoma štitnjače dobivenih iz primarnog tumora i metastaza, ukazujući na značaj PAI-1 u degradaciji ekstracelularnog matriksa.

Opisana je intenzivna i difuzna ekspresija uPA, uPAR i PAI-1 u karcinomima štitnjače koristeći imunohistokemijsku metodu, ali nije nađena povezanost između tih proteina i kliničkopatoloških parametara (106).

Koristeći imunohistokemijsku metodu na 39 PKŠ-e Zanetti je pokazao da su tumorske stanice karakterizirane konkomitantnom ekspresijom uPAR-a, te je uPA kao aktivator čimbenika rasta možda i relevantan u patogenezi PKŠ-e (107).

Također imunohistokemijskom metodom nađena je ekspresija uPA u karcinomima štitnjače, ali ne i u adenomima i pripadajućim normalnim tkivima štitnjače. Selektivna ekspresija uPA u tumorima štitnjače omogućila bi razlikovanje benignih od malignih tumora (108).

Klinički značaj uPAR u tumorima štitnjače istraživani je u radu Kima i suradnika. Izraženost uPAR je prospektivno istraživana sa streptavidin-biotin metodom koristeći monoklonska protutijela na uPAR. Pokazano je da ekspresija uPAR može biti korisna u razlikovanju folikularnog karcinoma štitnjače od folikularnog adenoma, a također bi mogla služiti kao prognostički čimbenik u papilarnom karcinomu štitnjače (109).

Kvantitativnom RT-PCR analizom Ulisse i suradnici pokazali su da su uPA, uPAR i PAI-1 mRNA povišeni u svim stanicama karcinoma štitnjače. Korelacija je nađena između

veliĉine tumora i porasta uPA mRNA, a takoĊer su i povišene vrijednosti uPA i uPAR mRNA nađene u metastatskom papilarnom karcinomu štitnjaĉe (110).

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

### Hipoteza

Dijelovi plazminogenog aktivacijskog sustava: urokinazni aktivator plazminogena (uPA) i inhibitor aktivatora plazminogena tip 1 (PAI-1) iz tkiva karcinoma štitnjače povezani su s lošom prognozom karcinoma štitnjače.

**2.1. Glavni cilj :** ispitati da li urokinazni aktivator plazminogena uPA i njegov inhibitor PAI-1 iz citosola diferenciranih karcinoma štitnjače imaju utjecaj na preživljenje bez progresije bolesti (engl. Progression free survival-PFS).

### 2.2. Specifični ciljevi:

1. Ispitati korelaciju uPA i PAI-1 u citosolu tumorskog tkiva štitnjače
2. Ispitati korelaciju uPA i PAI-1 u citosolu zdravog tkiva štitnjače
3. Pokazati da postoji razlika između vrijednosti uPA i PAI-1 u tkivu malignih tumora štitnjače i zdravom tkivu štitnjače.
4. Pokazati da postoji razlika između vrijednosti uPA i PAI-1 u malignim i benignim tumorima štitnjače.
5. Pokazati da postoji razlika između vrijednosti uPA i PAI-1 u različitim patohistološkim tipovima malignih tumora štitnjače (papilarni, folikularni, anaplastični).
6. Ispitati da li postoji razlika uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače kod različitih poznatih prognostičkih čimbenika karcinoma štitnjače:
  - a) različite dobi bolesnika
  - b) različite veličine primarnog tumora
  - c) prisutnosti odnosno odsutnosti multicentričnosti
  - d) prisutnosti odnosno odsutnosti lokalne invazivnosti tumora
  - e) prisutnosti odnosno odsutnosti metastaza regionalnih limfnih čvorova
  - f) prisutnosti odnosno odsutnosti udaljenih metastaza

### **Etičko-deontološki aspekt istraživanja**

1. Ovo istraživanje na ispitanicima i bolesnicima obavljeno je u skladu sa svim važećim i primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04). Identitet zdravih ispitanika i bolesnika uvijek će ostati povjerljiv i zaštićen. Suglasnost bolesnika za sudjelovanje u istraživanju je uključena.
2. Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb, kao i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu dalo je suglasnost za istraživanja na prijedlog projekta kojeg je ovaj rad sastavni dio, kao i za sami rad.

### 3. BOLESNICI I METODE

#### Ispitanici:

Ispitanici su bolesnici Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, KBC Zagreb u kojih se citološkom punkcijom pod kontrolom ultrazvuka postavila dijagnoza tumora odnosno karcinoma štitnjače. Bolesnici su potom upućeni na operativni zahvat na Kliniku za otorinolaringologiju, KBC Zagreb u svrhu liječenja: lobektomiju u slučaju dobroćudnog tumora, odnosno totalnu tireoidektomiju u slučaju karcinoma štitnjače.

U rad je prospektivno uključeno ukupno 128 bolesnika, od toga 107 bolesnika s karcinomom štitnjače, te 21 bolesnik s adenomom štitnjače. Zdravo tkivo štitnjače u istih bolesnika služila je kao kontrola.

Tumorski materijal skupljao se od listopada 2002. godine do srpnja 2008. godine.

Postoperativno su svi bolesnici s karcinomom primili  $^{131}\text{I}$  u svrhu ablacije te su potom kontrolirani na Kliničkom odjelu Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu, KBC Zagreb. Bolesnici s adenomom štitnjače kontrolirani su ambulantno.

Iz povijesti bolesti korišteni su slijedeći nalazi o bolesniku: patohistološki nalaz tumora štitnjače, ultrazvučni nalaz vrata s citoškom punkcijom zbog otkrivanja lokalnog recidiva i/ili pozitivnih limfnih čvorova na vratu, rentgenogrami, MSCT nalazi i scintigrami s  $^{131}\text{I}$  i/ili  $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$  radi procjene udaljenih metastaza,  $^{18}\text{F-FDG-PET}$ ,  $^{18}\text{F-FDG-PET/CT}$ , biokemijski parametri, posebno tireoglobulin (Tg) kao specifični tumorski biljeg.

Bolesnici su praćeni postoperativno kroz 2-8 godina, od listopada 2002. godine do travnja 2010. godine.

Recidiv tumora dijagnosticiran je na temelju pozitivnih slikovnih, dijagnostičkih metoda (Rtg, ultrazvuk, MSCT, scintigram cijelog tijela s  $^{131}\text{I}$ , scintigram kosti s  $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ ,  $^{18}\text{F-FDG-PET}$  ili  $\text{PET/CT}$ ), citoloških punkcija ili biopsija, a potvrđen je ili patohistološkim nalazom ili daljnjim praćenjem.



**Materijal:**

Laboratorijski dio istraživanja proveo se u Laboratoriju za eksperimentalnu patofiziologiju Katedre za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom operativnog zahvata uzimao se komadić (0,03-0,1 grama) tumorskog tkiva kao i komadić zdravog tkiva štitnjače (0,03-0,1 grama), te ih se svježe pohranjivao u tekući dušik.

Tumorsko tkivo se kao što je uobičajeno upućivalo na Klinički zavod za patologiju zbog patohistološke dijagnoze. Iz opisa patohistološkog preparata izdvojeni su slijedeći parametri: veličina primarnog tumora, multicentričnost, invazija čahure tumora, krvnih žila, kapsule štitnjače, lokalna invazivnost u smislu zahvaćanja masnog tkiva, okolnih mišića, jednjaka, dušnika i sl., lokalna zahvaćenost limfnih čvorova tumorskim procesom, te histološki tip tumora.

**Postupak dobivanja citosola:**

Tumorsko tkivo kao i normalno tkivo štitnjače od istog bolesnika, koje služi kao kontrola, nakon pohrane u tekućem dušiku se u smrznutom stanju pulverizira uz pomoć mikrodismembratora, kao što je preporučeno od EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) za procesiranje tumora dojke za receptorske studije u citosolu (111).

Dobiveni prah tumorskog i normalnog tkiva štitnjače se suspendira u receptorskom puferu (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, koji sadrži 1,5 mM KCl EDTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 10 mM monotioglicerola i 10% v/v glicerola, pH 7,4). Suspenzija se potom centrifugira 30 minuta na 100000xg na 4°C za dobivanje frakcije supernatanta (citosola).

Kvantitativno određivanje uPA i PAI-1 vrši se u citosolu koristeći ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) kit (Imubind® uPA i Imubind® PAI-1; American Diagnostica, Stamford, CT, USA) (112).

uPA ELISA koristi mišje monoklonsko protutijelo usmjereno na uPA β-lanac i time detektira sve forme uPA i uPA kompleksa s PAI-1. Detekcijski sustav koristi protutijelo uPA α-lanca, obilježeno biotinom.

PAI-1 ELISA koristi mišje monoklonsko protutijelo usmjereno na aktivni i inaktivni PAI-1 i PAI-1 kompleks. Detekcijski sustav koristi biotinizirano protutijelo usmjereno na epitop, koje je nekompetitivno s mjestom vezivanja.

Koncentracije antigena uPA i PAI-1 se izražavaju u ng/mg proteina s kalibracijom sa standardnim preparatima. Najniži prag mjerenja je 0,01 ng/mL za uPA i 0,05 ng/mL za PAI-1.

Koncentracije proteina određuje se u citosolu metodom po Löwry-u.

### **Statistička analiza**

Normalnost distribucije kontinuiranih broječnih varijabli analizirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Za procjenu značajnosti razlika dva uzorka korišteni su neparametrijski statistički testovi, budući da većina varijabli ne slijedi normalnu distribuciju (Wilcoxon Signed Ranks test za ovisne uzorke i Mann-Whitney za neovisne uzorke, dok je za više neovisnih uzoraka korišten Kruskal-Wallis test, uz Bonferroni-evu korekciju razine značajnosti pri *post-hoc* testovima).

Korelacija uPA i PAI-1 analizirana je Spearmanovim i Pearsonovim korelacijskim testom.

Distribucija preživljenja bez progresije (engl. Progression-Free Survival -PFS) u bolesnika s visokom i niskom koncentracijom uPA i PAI-1 prikazana je Kaplan-Meierovim krivuljama, a značajnost razlika dvije distribucije je testirana Log Rank testom.

Utjecaj pojedinih čimbenika na preživljenje bez progresije utvrđen je primjenom Cox-ovog regresijskog modela. Uvjet proporcionalnosti rizika ispitan je grafički, analizom odnosa djelomičnih ostataka i preživljenja bez progresije za sve uvrštene varijable.

Sve statističke analize, uključujući deskriptivnu statistiku izvedene su korištenjem statističkog paketa Statistica for Windows, inačica 6.0. (Statsoft software).

Vrijednosti  $P < 0,05$  smatrane su statistički značajnima.

#### **4. REZULTATI**

U rad je uključeno 128 bolesnika s tumorom štitnjače, 107 žena, 21 muškarac, od toga 107 bolesnika s karcinomom štitnjače, te 21 bolesnik s adenomom štitnjače.

Prema patohistološkom nalazu (PHD) bilo je 98 (76,6%) bolesnika s papilarnim karcinomom, 7 (5,5%) s folikularnim karcinomom, 2 (1,6%) s anaplastičnim karcinomom, 12 (9,4%) bolesnika s folikularnim adenomom, te 9 (7%) s Hürthleovim adenomom.

##### **Maligni tumori štitnjače**

Od 107 bolesnika s malignim tumorom štitnjače (medijan 50 godina, raspon 3-80 g; srednja vrijednost  $\pm$  SD 48,98 $\pm$ 15,01g) bilo je 89 žena i 18 muškaraca. 25 (23,4%) bolesnika imalo je metastaze u cervikalne limfne čvorove, 12 (11,2%) je imalo udaljene metastaze. 51(47,7%) bolesnik je imao multicentrični karcinom. 21 (23,4%) bolesnik je imao karcinom štitnjače s ekstratireoidnom invazijom. Prema gradusu 93 (86,9%) bolesnika je imalo tumor gradus I, 12 (11,2%) gradus II i 2 (1,9%) gradus III.

##### **Diferencirani karcinomi štitnjače**

105 bolesnika imalo je diferencirani karcinom štitnjače, od toga njih 98 (93,3%) bolesnika je imalo papilarni karcinom štitnjače, a 7 (6,7%) folikularni karcinom. U skupini diferenciranih karcinoma štitnjače bilo je 89 žena (84,8%) i 16 (15,2%) muškaraca, medijan dobi 50 godina (raspon 3-80), srednja vrijednost dobi  $\pm$  SD 48,63 $\pm$ 14,89 g.

24 (22,9%) bolesnika imalo je metastaze u cervikalne limfne čvorove, 10 (9,5%) je imalo udaljene metastaze. 49 (46,7%) bolesnika je imalo multicentrični karcinom. 19(18,1%) bolesnika je imalo karcinom štitnjače s ekstratireoidnom invazijom. Prema gradusu 93 (88,6%) bolesnika imalo je tumor gradus I, a 12 (11,4%) gradus II.

Tablica 1. Obilježja tumora i bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače (N=105)

Obilježja tumora i bolesnika		Srednja vrijednost ±SD	Medijan (raspon)
<b>Dob (godine)</b>		48,63±14,89	50 (3-80)
<b>Veličina tumora (cm)</b>		1,716±1,886	1,2 (0,4-13)
		N	%
<b>Histološki nalaz</b>	papilarni	98	93,3
	folikularni	7	6,7
<b>Gradus</b>	I	93	88,6
	II	12	11,4
<b>Multicentričnost</b>	ne	56	53,3
	da	49	46,7
<b>Ekstratireoidna invazija</b>	ne	86	81,9
	da	19	18,1
<b>Limfni čvorovi</b>	ne	81	77,1
	da	24	22,9
<b>Udaljene metastaze</b>	ne	95	90,5
	da	10	9,5
<b>Spol</b>	žene	89	84,8
	muškarci	16	15,2

Srednja vrijednost uPA u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače bila je  $0,509 \pm 0,767$  ng/mg, medijan 0,31 (0,01-6,45) ng/mg, a srednja vrijednost PAI-1 bila je  $6,337 \pm 6,415$  ng/mg, medijan 3,8 (1,20-35,69) ng/mg.

Srednja vrijednost uPA u normalnom tkivu iznosila je  $0,237 \pm 0,051$  ng/mg proteina citosola, medijan 0,23 (raspon 0,14-0,35) ng/mg, a srednja vrijednost PAI-1 u normalnom tkivu iznosila je  $2,368 \pm 0,418$  ng/mg proteina citosola, medijan 2,38 (1,45-3,49) ng/mg.

### **Nediferencirani karcinomi štitnjače**

Bilo je 2 anaplastična karcinoma, oba u muškaraca, srednja dob i medijan 67,5 godina (jedan 59 godina, drugi 76 godina).

uPA u anaplastičnim karcinomima iznosio je  $8,45 \pm 2,192$  (6,9 i 10) ng/mg, a PAI-1  $94,65 \pm 59,468$  (52,6 i 136,7) ng/mg proteina.

U pripadajućem normalnom tkivu koncentracija uPA iznosila je  $0,2 \pm 0,042$  (0,17 i 0,23) ng/mg, a PAI-1  $2,7 \pm 0,24$  (2,53 i 2,87) ng/mg proteina.

### **Benigni tumori štitnjače**

21 bolesnik imao je dobroćudni tumor štitnjače; od toga 18 žena, 3 muškarca. Srednja vrijednost njihove dobi iznosila je  $51,33 \pm 12,519$  godina; medijan dobi 55 (22-71) g. 12 (57,1%) bolesnika imalo je folikularni adenom, a 9 (42,9%) Hürthleov adenom.

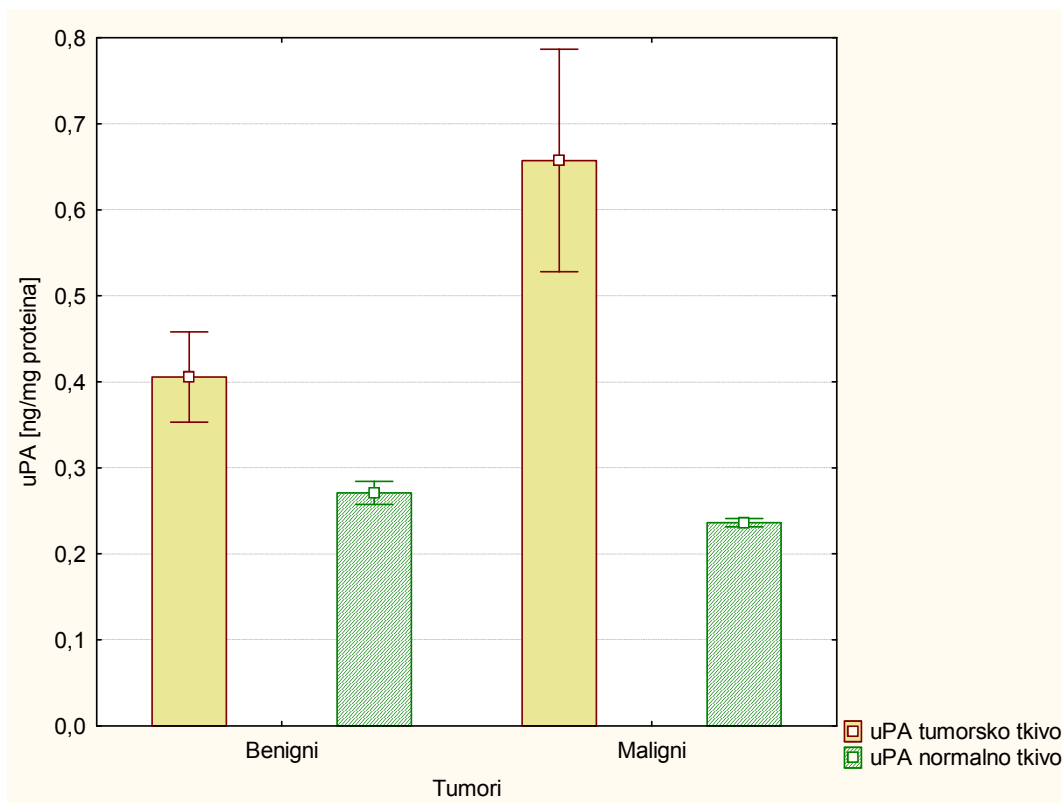
Srednja vrijednost uPA u adenomima je iznosila  $0,406 \pm 0,241$  ng/mg, medijan je 0,36 (0,01-0,96), a PAI-1 u adenomima je bio  $3,131 \pm 0,916$ , medijan 3,04 (1,35-6,2) ng/mg.

Koncentracija uPA u pripadajućem normalnom tkivu bila je  $0,271 \pm 0,062$  ng/mg, medijan 0,25 (0,17-0,45), a PAI-1  $2,436 \pm 0,257$ , medijan 2,36 (1,98-2,93) ng/mg.

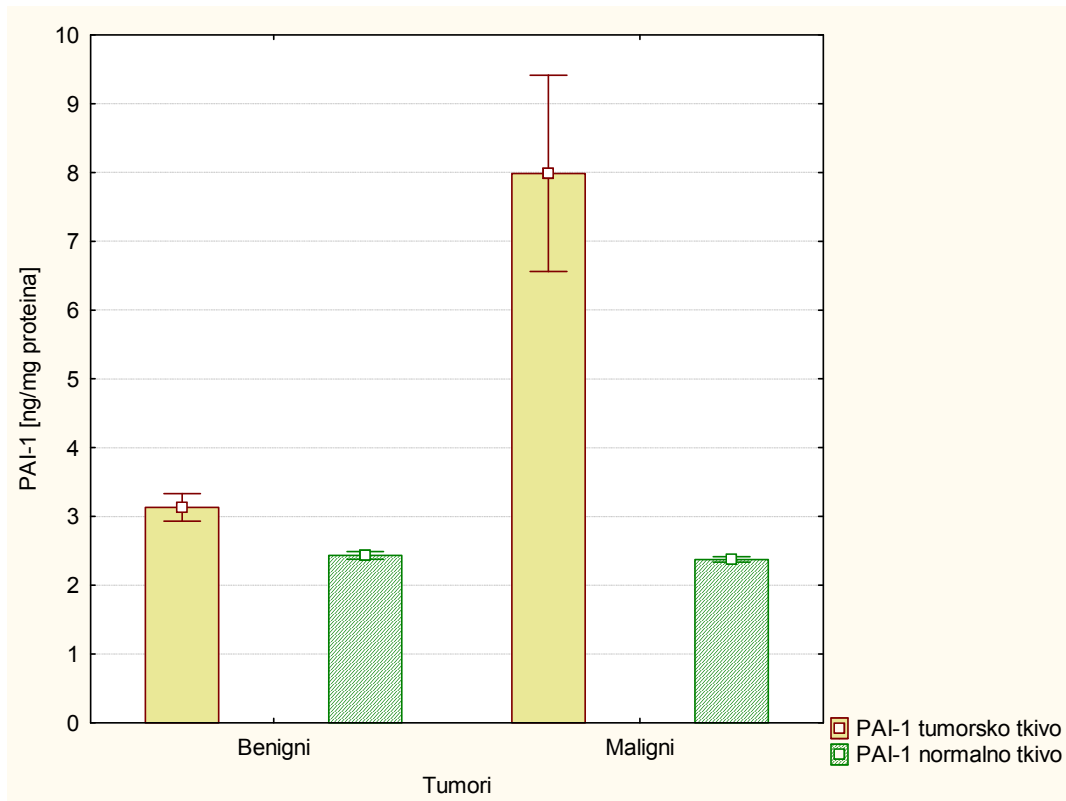
Vrijednosti uPA i PAI-1 bile su značajno više u malignom tumorskom tkivu nego u pripadajućem normalnom tkivu štitnjače ( $P < 0,001$  za uPA i PAI-1).

Također, koncentracije uPA i PAI-1 su značajno više u diferenciranim karcinomima štitnjače u odnosu na pripadajuće normalno tkivo štitnjače ( $P < 0,001$  za uPA i PAI-1).

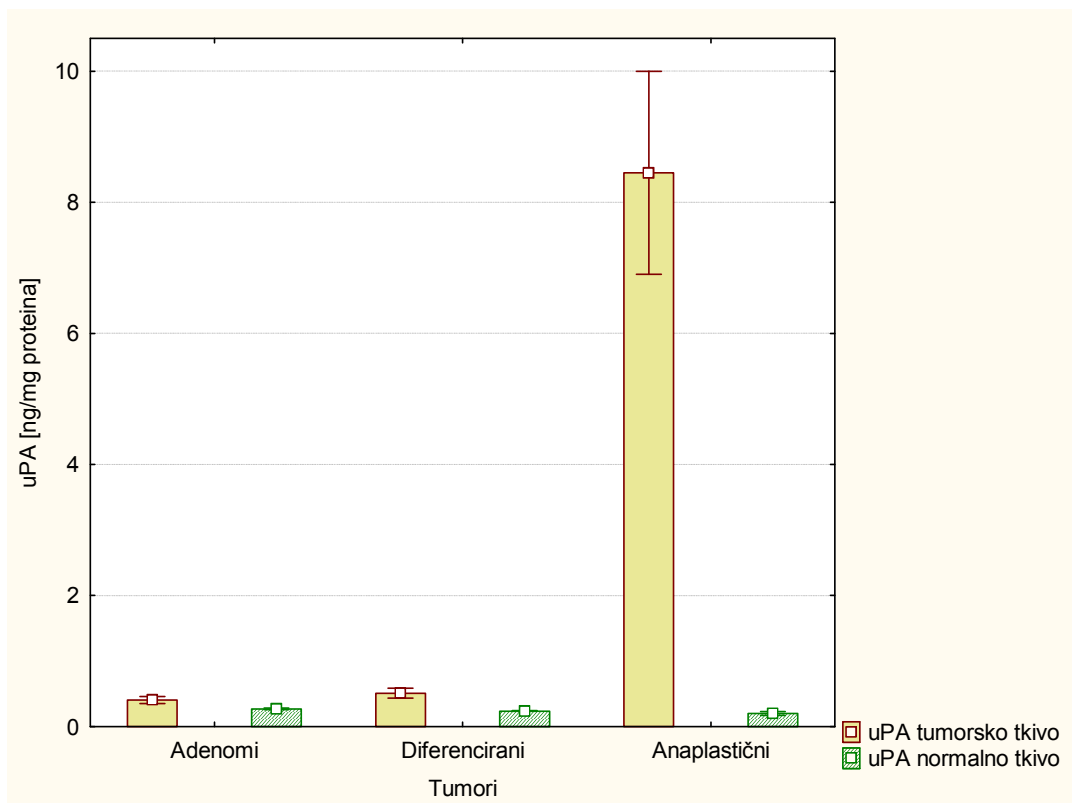
Usporedbom citosola benignih tumora i pripadajućeg normalnog tkiva nađene su značajno više vrijednosti uPA ( $P = 0,042$ ) i PAI-1 ( $P = 0,001$ ) u tumorskom tkivu.



Slika 2. Koncentracije uPA u benignom (n=21) i malignom tumorskom tkivu (n=107) i pripadajućem normalnom tkivu štitnjače (srednja vrijednost±SEM).

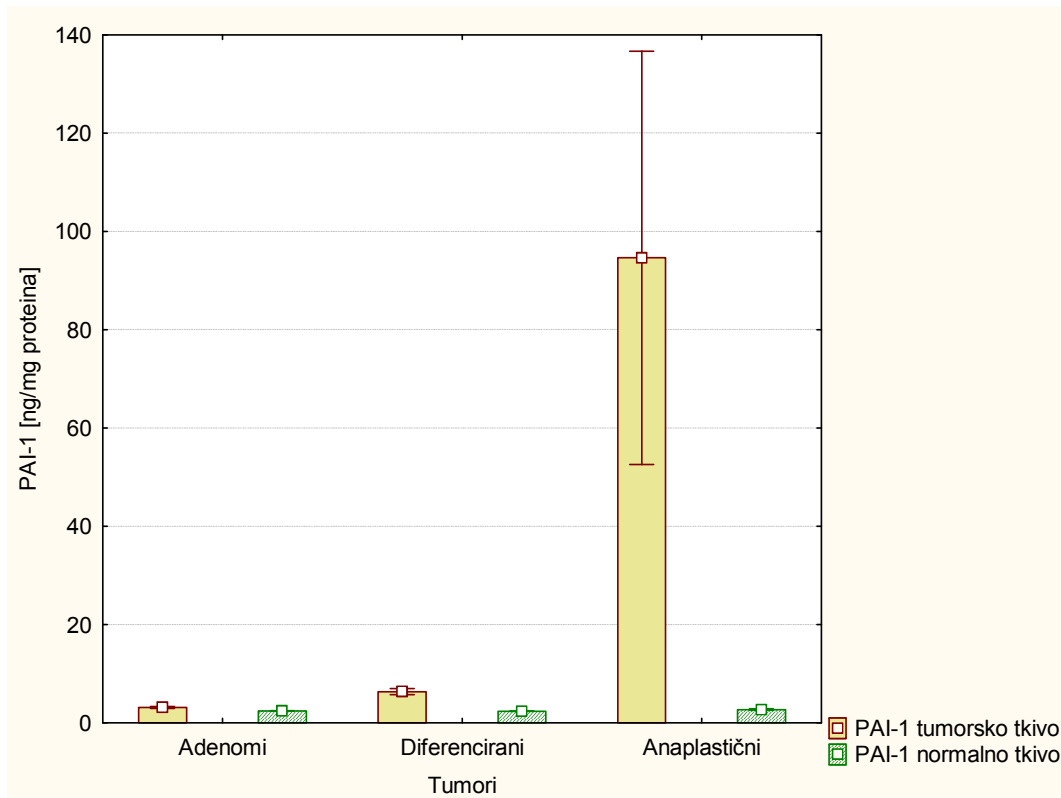


Slika 3. Koncentracije PAI-1u benignom (n=21) i malignom tumorskom tkivu (n=107) i pripadajućem normalnom tkivu štitnjače (srednja vrijednost±SEM)



Slika 4. Koncentracije uPA u adenomima (n=21), diferenciranim (n=105) i nediferenciranim tumorima (n=2) i pripadajućem normalnom tkivu štitnjače (srednja vrijednost±SEM).

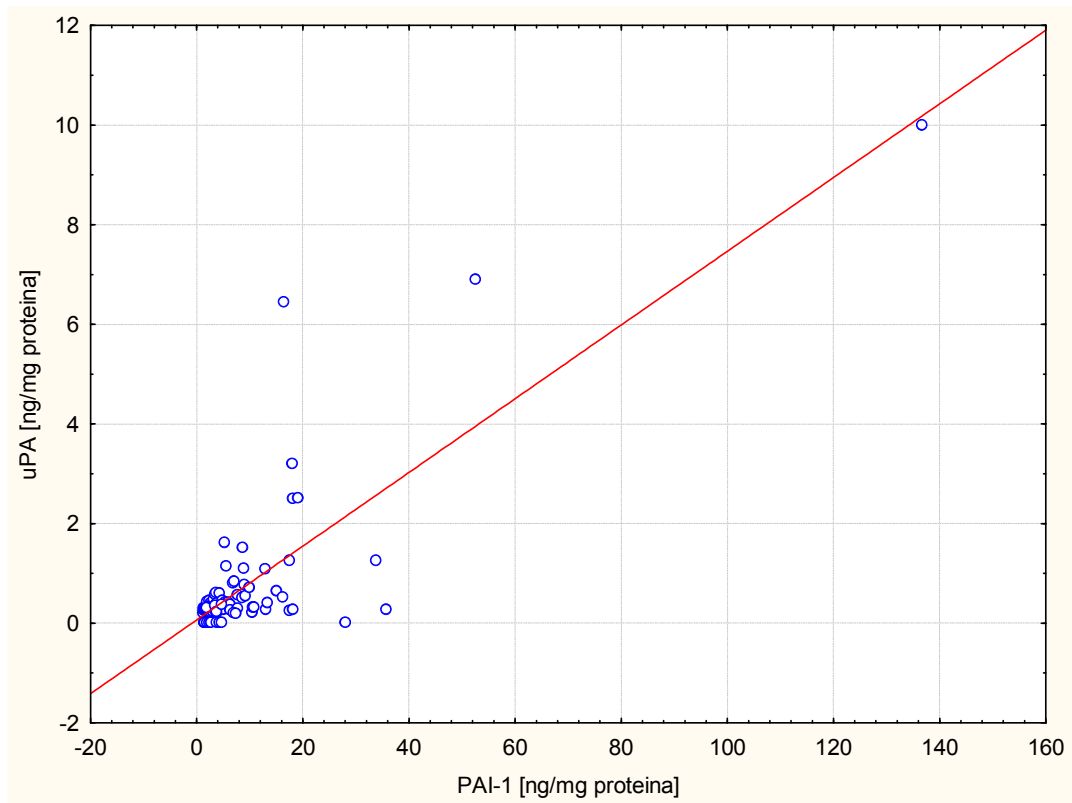




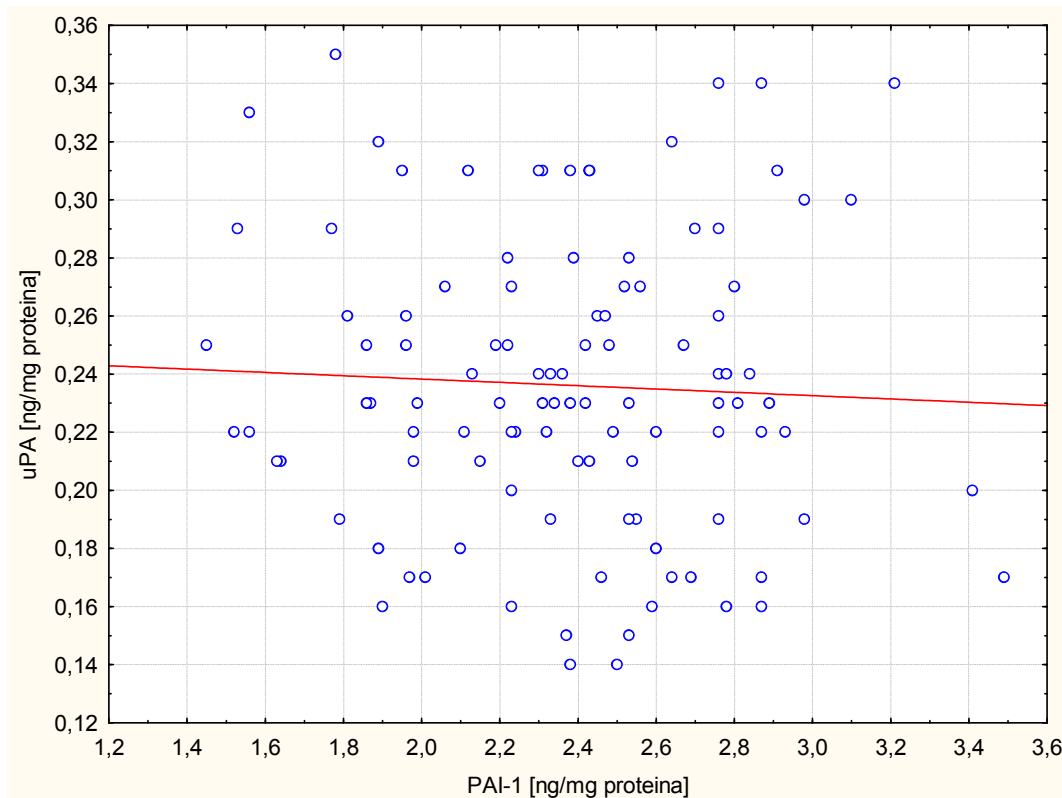
Slika 5. Koncentracije PAI-1 u adenomima (n=21), diferenciranim (n=105) i nediferenciranim tumorima (n=2) i pripadajućem normalnom tkivu štitnjače (srednja vrijednost±SEM).

#### 4.1. Korelacija uPA i PAI-1 u citosolu tumorskog i normalnog tkiva štitnjače

Nađena je značajna pozitivna korelacija između uPA i PAI-1 u citosolu malignog tumorskog tkiva (Pearson  $r=0,817$ ,  $P<0,001$ ; Spearman  $\rho=0,475$ ,  $P<0,001$ ), ali ne i značajna korelacija između promatranih parametara u uzorcima normalnog tkiva (Pearson  $r=-0,47$ ,  $P=0,632$ ; Spearman  $\rho=-0,45$ ,  $P=0,644$ ).



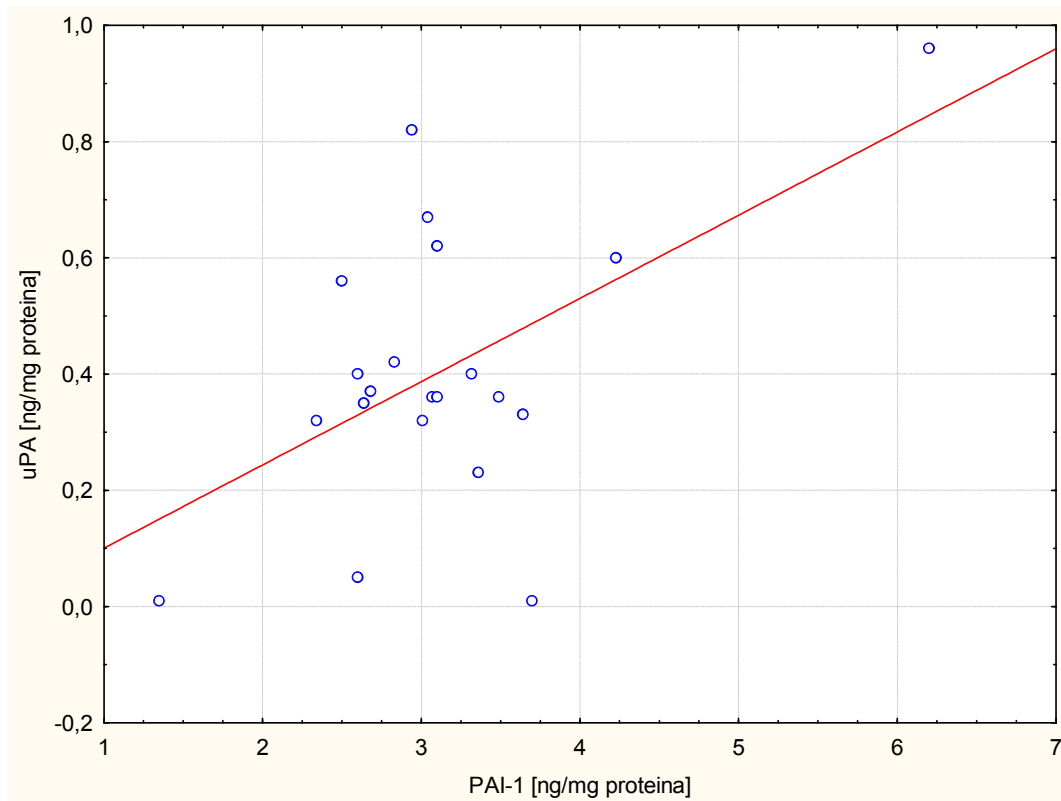
Slika 6. Korelacija uPA i PAI-1 u malignom tumorskom tkivu (n=107) (Pearson  $r=0,817$ ,  $P<0,001$ ; Spearman  $\rho=0,475$ ,  $P<0,001$ )



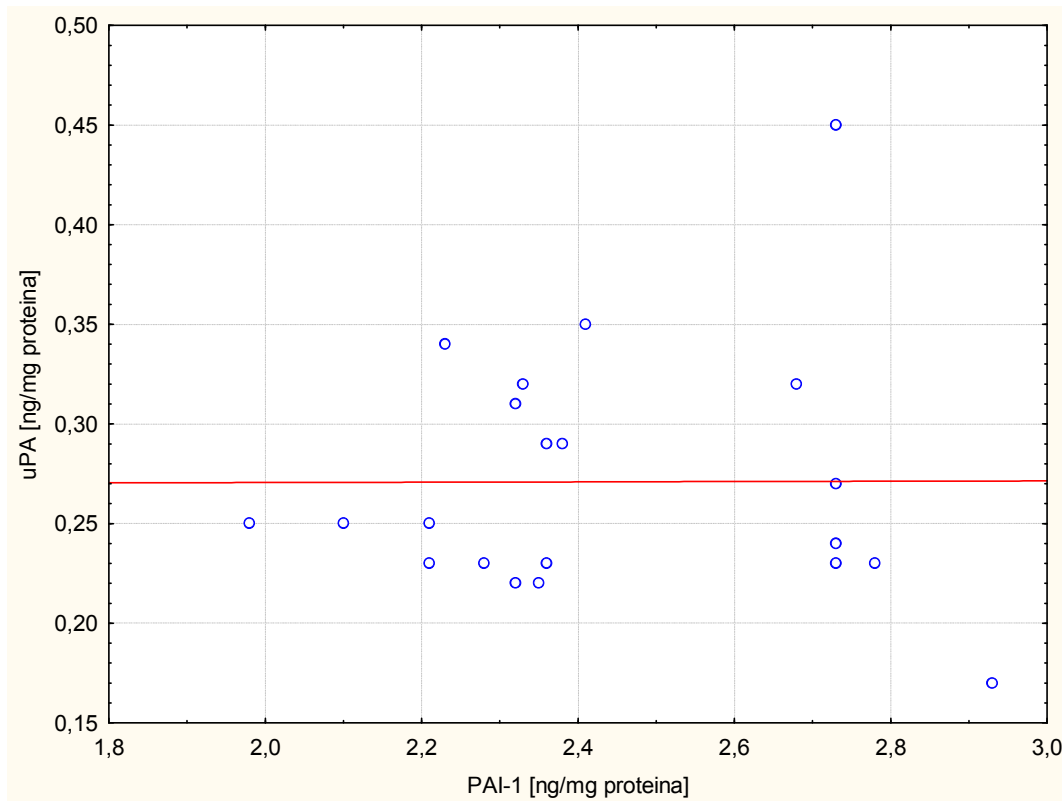
Slika 7. Korelacija uPA i PAI-1 u pripadajućem normalnom tkivu štitnjače bolesnika s malignim tumorom (n=107)(Pearson  $r=-0,47$ ,  $P=0,632$ ; Spearman  $\rho=-0,45$ ,  $P=0,644$ )

Nađena je značajna pozitivna korelacija između uPA i PAI-1 u citosolu tumorskog tkiva diferenciranih karcinoma štitnjače (Pearson  $r=0,399$ ,  $P<0,001$ ; Spearman  $\rho=0,444$ ,  $P<0,001$ ), ali ne i značajna korelacija između uPA i PAI-1 u uzorcima pripadajućeg normalnog tkiva štitnjače (Pearson  $r=-0,032$ ,  $P=0,745$ ; Spearman  $\rho=-0,028$ ,  $P=0,777$ ).

Pearsonovim testom također je nađena značajna pozitivna korelacija uPA i PAI-1 u citosolu benignih tumora štitnjače ( $r=0,545$ ,  $P=0,01$ ), koja nije potvrđena Spearmanovim testom ( $\rho=0,208$ ,  $P=0,365$ ).



Slika 8. Korelacija uPA i PAI-1 u benignim tumorima štitnjače (n=21) (Pearson  $r=0,545$ ,  $P=0,01$ ; Spearman  $\rho=0,208$ ,  $P=0,365$ ).



Slika 9. Korelacija uPA i PAI-1 u pripadajućem normalnom tkivu štitnjače bolesnika s adenomom (n=21) (Pearson  $r=0,003$ ,  $P=0,988$ ; Spearman  $\rho=-0,41$ ,  $P=0,861$ ).

#### 4.2. Povezanost uPA i PAI-1 s prognostičkim čimbenicima

##### 4.2.1. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu malignih tumora sa stupnjem diferencijacije tumora

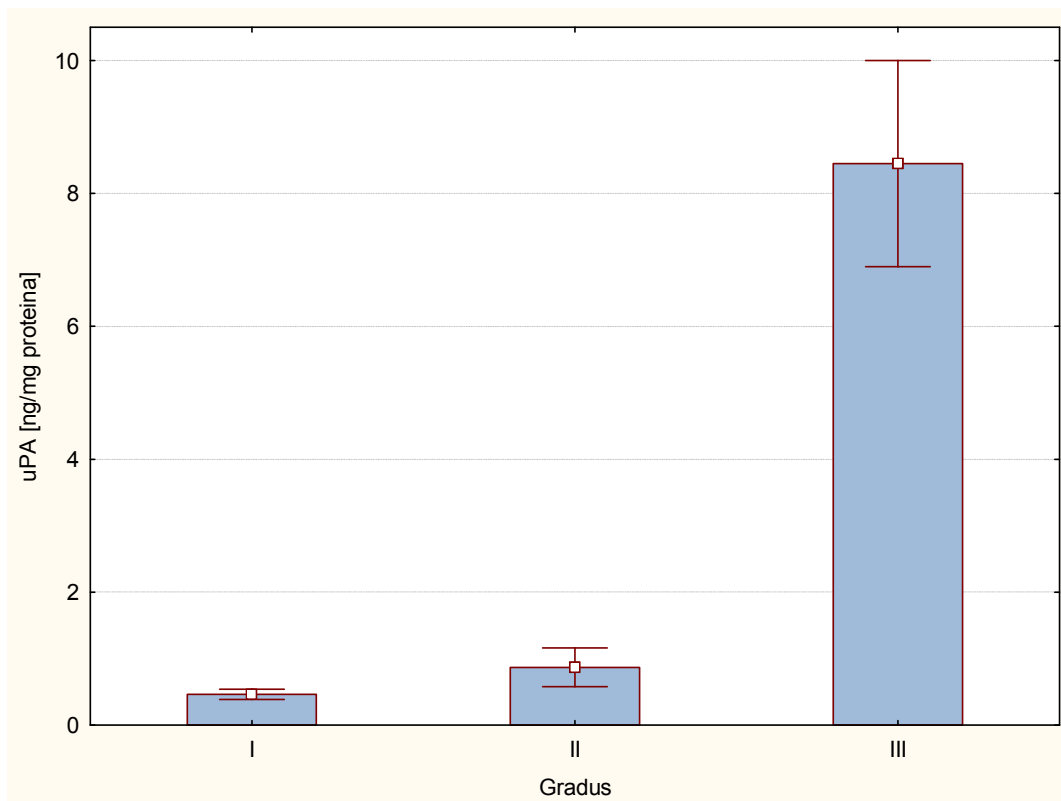
U skupini tumora gradusa I bilo je 93 bolesnika. Srednja vrijednost uPA iznosila je  $0,463 \pm 0,724$  ng/mg, medijan 0,31 (0,01-6,45), a srednja vrijednost PAI-1 bila je  $5,061 \pm 4,679$  ng/mg, medijan 3,470 (1,20-33,8) ng/mg.

U skupini gradusa II bilo je 12 bolesnika. Srednja vrijednost uPA bila je  $0,867 \pm 1,009$  ng/mg, medijan 0,375 (0,01-3,2), a srednja vrijednost PAI-1 bila je  $16,224 \pm 9,253$  ng/mg, medijan 17,52 (4,71-35,69) ng/mg.

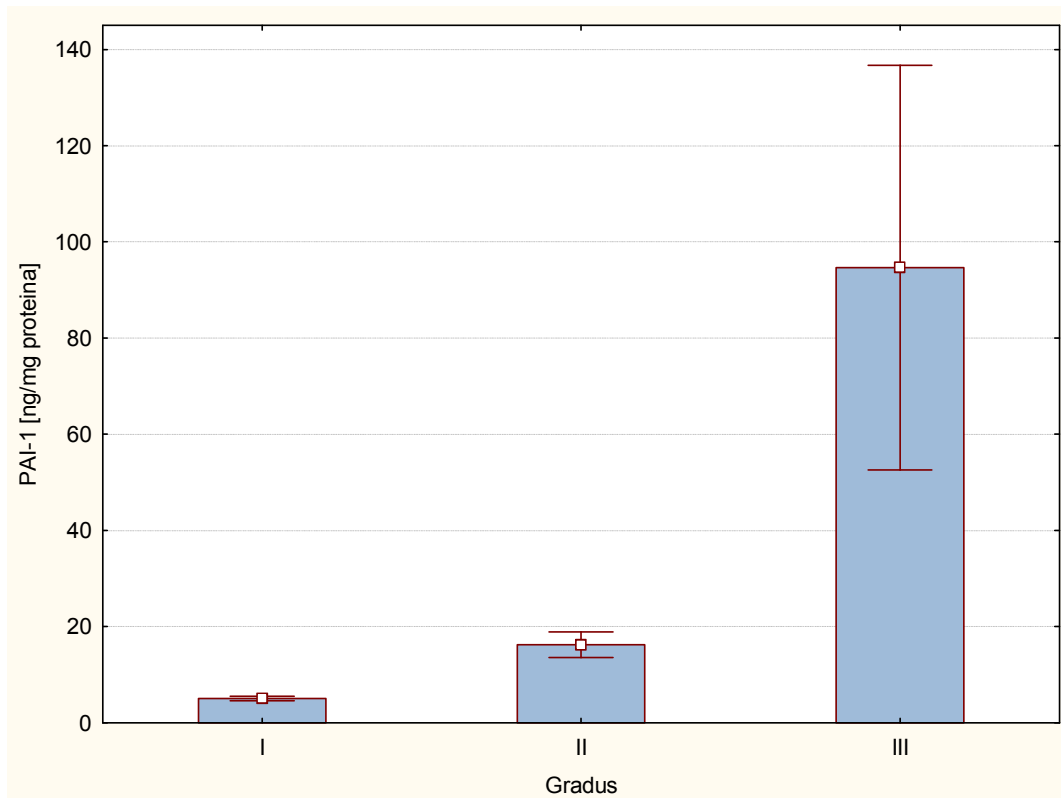
U skupini gradusa III bilo je 2 bolesnika. uPA je iznosio  $8,45 \pm 2,192$  (6,9 i 10), a PAI-1  $94,65 \pm 59,468$  (52,6 i 136,7) ng/mg.

Koncentracije uPA i PAI-1 bile su značajno različite između različitih histoloških gradusa tumora ( $P=0,031$ , odnosno  $P<0,001$ ).

Analiza podgrupa, za koju je korištena Bonferroni-eva korekcija (značajni  $P<0,017$ ), pokazala je značajnu razliku uPA i PAI-1 između gradusa I i gradusa III ( $P<0,001$  za uPA i PAI-1). Između gradusa I i II nađena je značajna razlika PAI-1 ( $P<0,001$ ), ali ne i uPA ( $P=0,287$ ), dok između gradusa II i gradusa III nije nađena značajna razlika ( $P<0,022$  za uPA i PAI-1).



Slika 10. Koncentracije uPA u tumorskom tkivu različitih gradusa: gradus I (n=93), gradus II (n=12), gradus III (n=2) (srednja vrijednost ± SEM).



Slika 11. Koncentracije PAI-1 u tumorskom tkivu različitih gradusa: gradus I (n=93), gradus II (n=12), gradus III (n=2) (srednja vrijednost±SEM).

#### 4.2.2. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu malignih tumora s histološkim tipovima tumora

U skupini papilarnih karcinoma srednja vrijednost uPA iznosila je  $0,525 \pm 0,791$  ng/mg, medijan 0,31 (0,01-6,45), a srednja vrijednost PAI-1  $6,317 \pm 6,503$  ng/mg, medijan 3,795 (1,2-35,69) ng/mg.

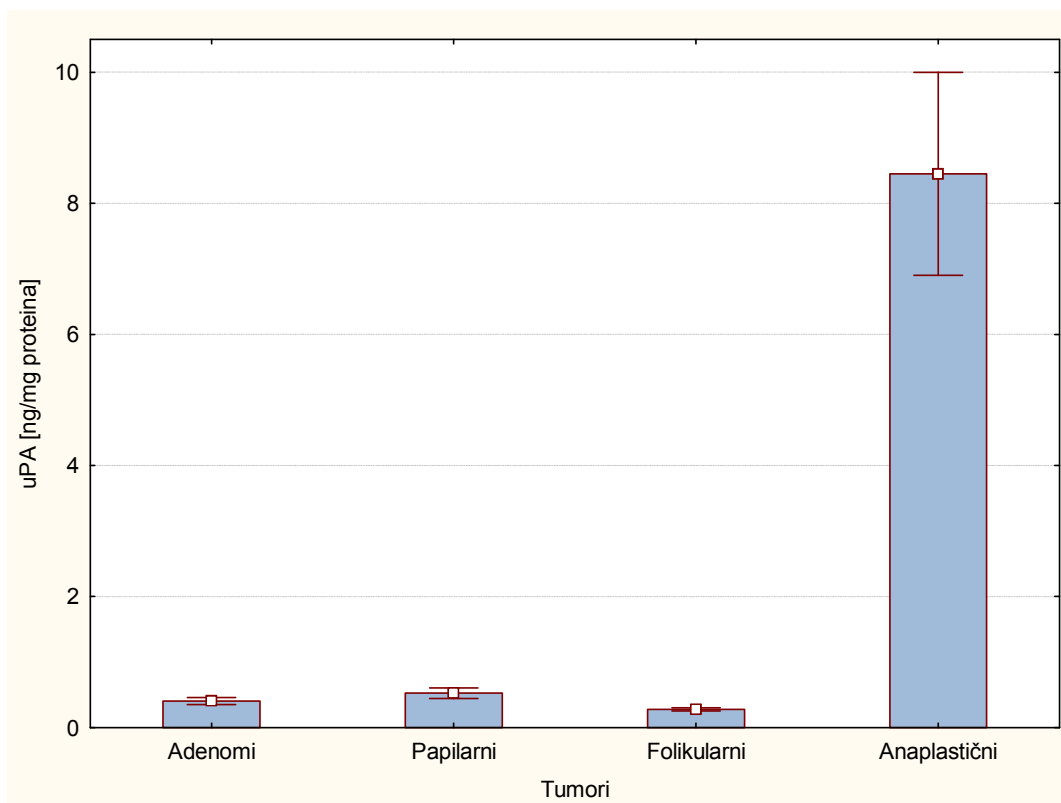
U skupini folikularnih karcinoma srednja vrijednost uPA iznosila je  $0,279 \pm 0,07$  ng/mg, medijan 0,27 (0,2-0,37), a srednja vrijednost PAI-1  $6,609 \pm 5,442$  ng/mg, medijan 4,71 (1,82-18,12) ng/mg.

Vrijednosti uPA i PAI-1 bile su značajno različite između različitih histoloških tipova tumora štitnjače ( $P=0,023$  za uPA,  $P=0,014$  za PAI-1), kao i između različitih histoloških tipova karcinoma štitnjače ( $P=0,025$  za uPA,  $P=0,041$  za PAI-1).

U skupini diferenciranih karcinoma štitnjače, nije nađena značajna razlika uPA i PAI-1 između papilarnih i folikularnih karcinoma štitnjače ( $P=0,210$  za uPA i  $P=0,445$  za PAI-1).

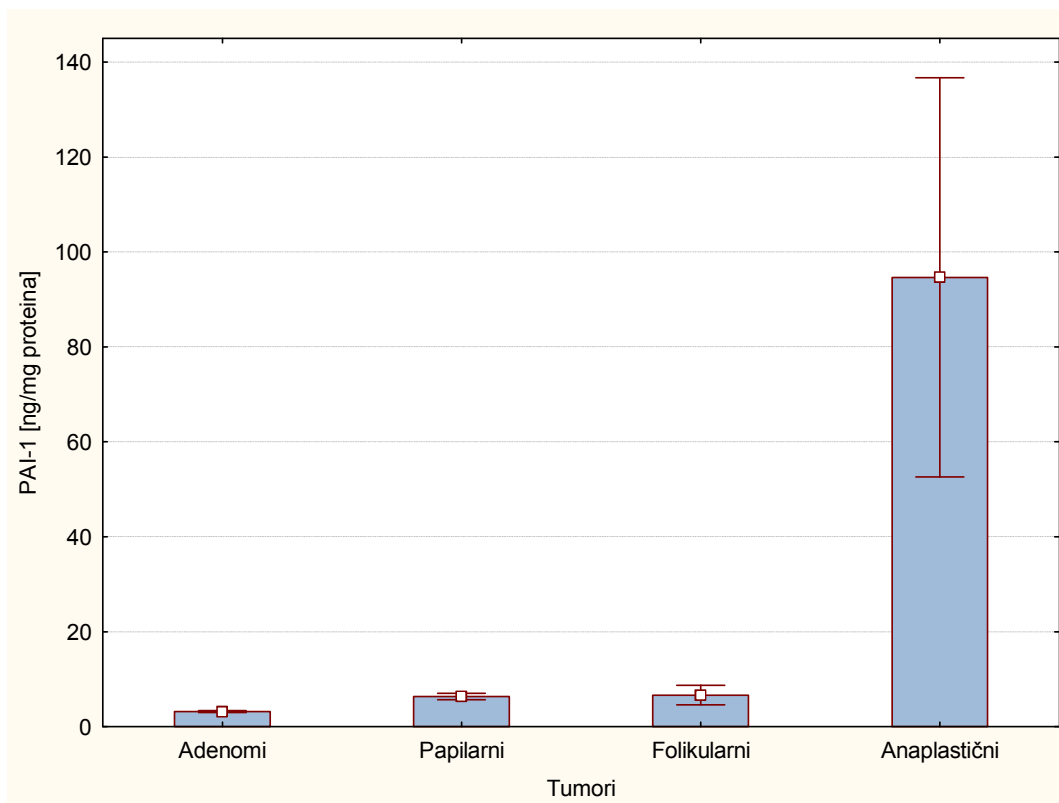
Usporedbom citosola diferenciranih karcinoma i adenoma nađena je značajna razlika u koncentraciji PAI-1 ( $P=0,041$ ), ali ne i u koncentraciji uPA ( $P=0,135$ ).

Vrijednosti uPA i PAI-1 bile su značajno različite između diferenciranih i nediferenciranih karcinoma štitnjače ( $P<0,001$  za uPA i PAI-1).



Slika 12. Koncentracije uPA u adenomima i različitim histološkim tipovima karcinoma štitnjače (srednja vrijednost $\pm$ SEM)





Slika 13. Koncentracije PAI-1u adenomima i različitim histološkim tipovima karcinoma štitnjače (srednja vrijednost $\pm$ SEM).

#### 4.2.3. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s dobi bolesnika

75 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače bilo je starije od 40 godina (srednja vrijednost  $55,8 \pm 9,895$  g; medijan 55 g, raspon 41-80 g), a 30 bolesnika je bilo mlađe od 40 godina (srednja vrijednost  $30,7 \pm 8,91$  g; medijan 33 g, raspon 3-40 g).

U skupini bolesnika starijih od 40 godina veličina tumora bila je  $1,795 \pm 2,036$  cm, a u skupini bolesnika mlađih od 40 godina veličina tumora bila je  $1,52 \pm 1,455$  cm.

Srednja vrijednost uPA u bolesnika starijih od 40 godina iznosila je  $0,503 \pm 0,566$  ng/mg; medijan 0,31 (0,01-3,2), a PAI-1  $6,976 \pm 7,164$  ng/mg, medijan 3,79 (1,28-35,69).

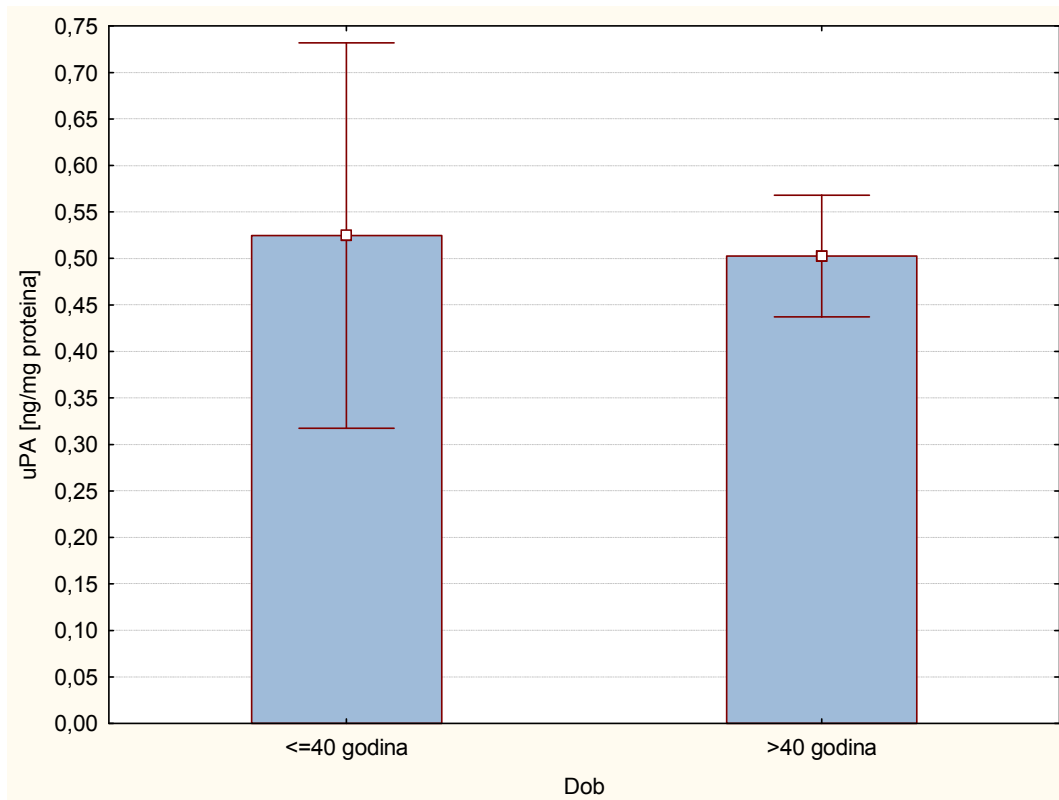
Tablica 2. Koncentracije uPA i PAI-1 iz citosola diferenciranih karcinoma štitnjače (n=105) prema različitim osobinama bolesnika i tumora

	uPA (ng/mg proteina) srednja vrijednost ± SD medijan (raspon)	PAI-1 (ng/mg proteina) srednja vrijednost ± SD medijan (raspon)
<b>Dob bolesnika</b>		
≤40 godina (n=30)	0,525±1,136 0,315 (0,01-6,45)	4,739±3,599 4,195 (1,2-16,43)
>40 godina (n=75)	0,503±0,566 0,31 (0,01-3,20)	6,976±7,164 3,79 (1,28-35,69)
P	0,655	0,27
<b>Veličina tumora</b>		
≤1 cm (n=50)	0,375±0,537 0,285 (0,01-3,2)	4,237±3,696 3,285 (1,2-19,14)
>1 cm (n=55)	0,63±0,916 0,34 (0,01-6,45)	8,246±7,686 5,41 (1,43-35,69)
P	0,002	0,001
<b>Multicentričnost</b>		
Solitarni (n=56)	0,366±0,439 0,295 (0,01-3,2)	5,843±6,454 4,055 (1,2-35,69)
Multicentrični (n=49)	0,672±1,001 0,32 (0,01-6,45)	6,901±6,39 3,8 (1,8-33,8)
P	0,015	0,252

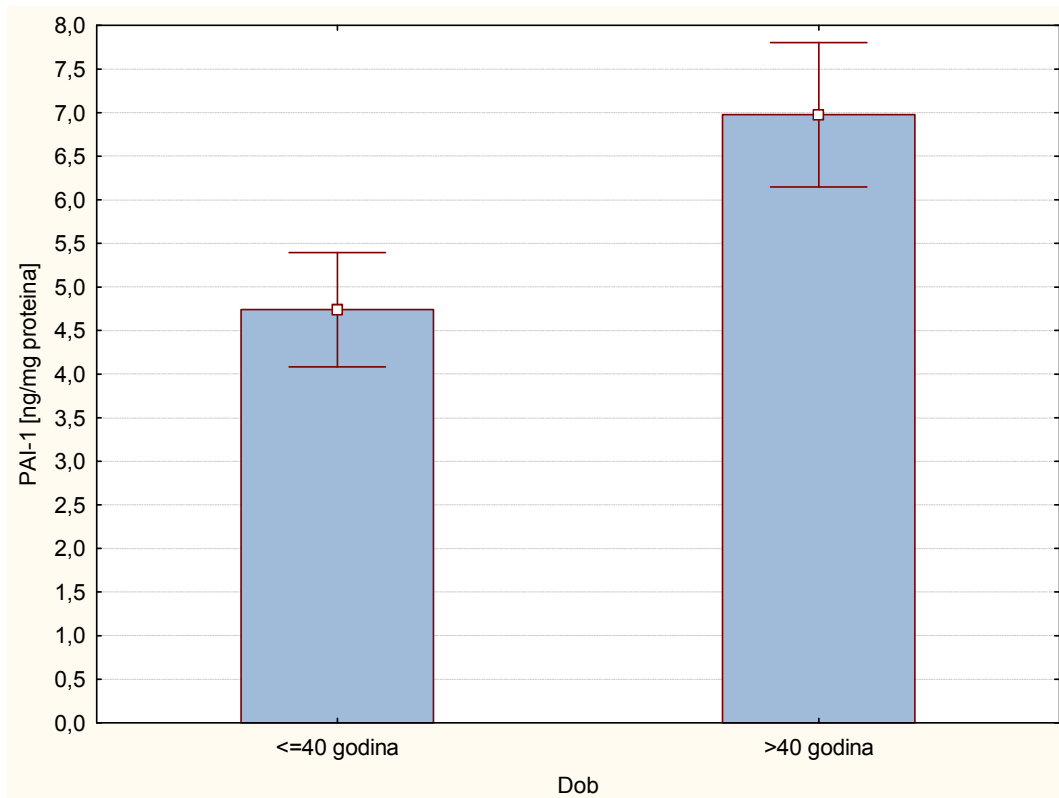
<b>Ekstratireoidna invazija</b>		
Ne (n=86)	0,389±0,403 0,3 (0,01-3,2)	5,132±5,078 3,5 (1,2-35,69)
Da (n=19)	1,051±1,501 0,42 (0,01-6,45)	11,791±8,815 9,9 (2,23-33,8)
P	0,015	<0,001
<b>Limfni čvorovi</b>		
Ne (n=81)	0,43±0,489 0,3 (0,01-3,2)	5,327±4,802 3,76 (1,28-28)
Da (n=24)	0,775±1,316 0,32 (0,01-6,45)	9,745±9,498 5,78 (1,2-35,69)
P	0,232	0,056
<b>Udaljene metastaze</b>		
Ne (n=95)	0,483±0,77 0,31 (0,01-6,45)	5,034±4,356 3,53 (1,2-28)
Da (n=10)	0,757±0,729 0,445 (0,22-2,5)	18,715±9,445 17,52 (4,71-35,69)
P	0,186	<0,001

Srednja vrijednost uPA u bolesnika mlađih od 40 godina iznosila je  $0,525 \pm 1,136$  ng/mg; medijan 0,315 (0,01-6,45), a PAI-1  $4,739 \pm 3,599$  ng/mg; medijan 4,195 (1,2-16,43).

Nije nađena statistički značajna razlika uPA i PAI-1 između skupina bolesnika starijih od 40 godina i mlađih od 40 godina (P za uPA=0,655, P za PAI-1=0,27).



Slika 14. Koncentracije uPA u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače u mlađih (n=30) i starijih od 40 godina (n=75) (srednja vrijednost±SEM).



Slika 15. Koncentracije PAI-1 u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače u mladih (n=30) i starijih od 40 godina (n=75) (srednja vrijednost±SEM).

#### 4.2.4. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s veličinom tumora

Obzirom na veličinu tumora bolesnici su bili podijeljeni u dvije skupine: bolesnici s diferenciranim tumorom > 1cm i bolesnici s tumorom ≤ 1 cm.

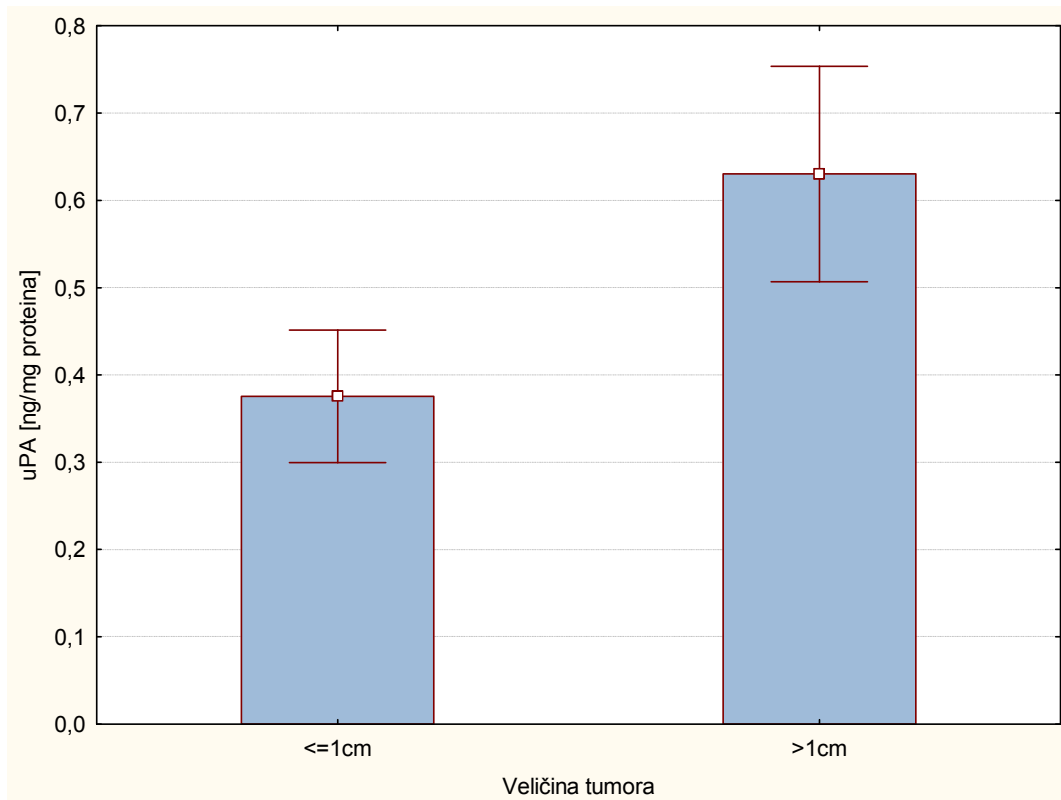
U skupini bolesnika s tumorom > 1cm bilo je 55 bolesnika, srednja vrijednost veličine tumora 2,605±2,264 cm; medijan 2 (1,1-13) cm.

U skupini bolesnika s tumorom ≤ 1 cm bilo je 50 bolesnika, srednja vrijednost veličine tumora 0,738±0,182 cm; medijan 0,75 (0,4-1) cm.

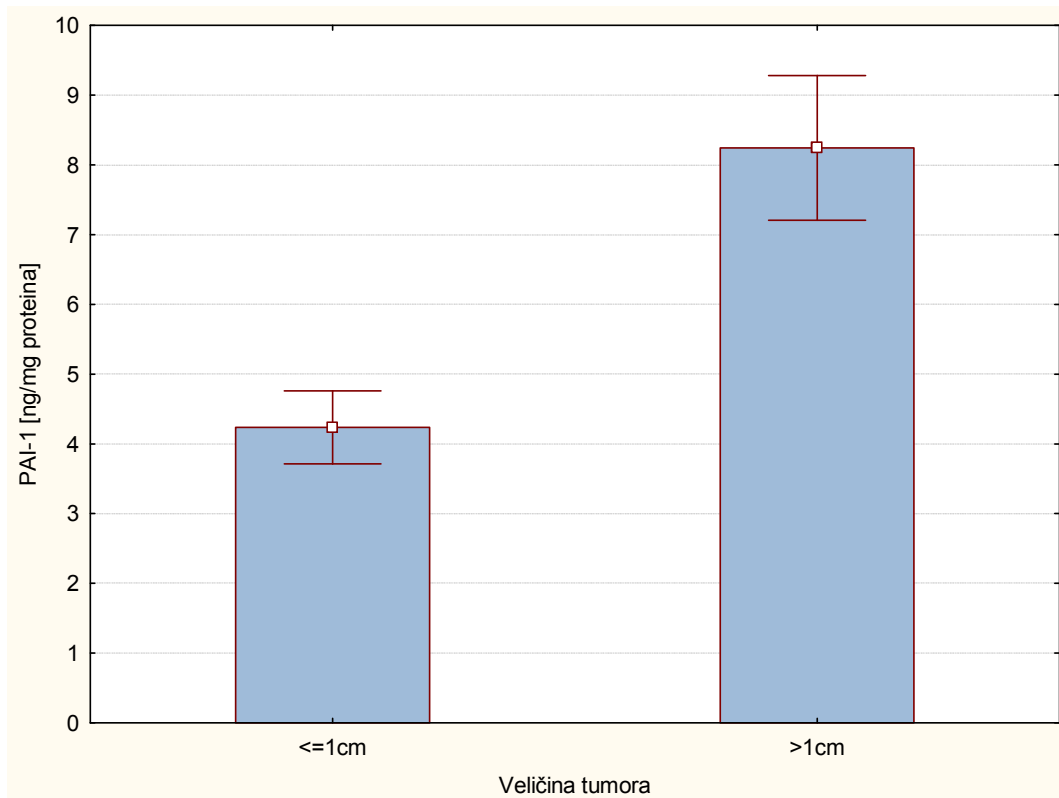
Koncentracija uPA u citosolu tumora > 1 cm iznosila je 0,63±0,916 ng/mg; medijan 0,34 (0,01-6,45), a PAI-1 8,246±7,686 ng/mg; medijan 5,41 (1,43-35,69).

Srednja vrijednost uPA u citosolu tumora  $\leq 1$  cm iznosila je  $0,375 \pm 0,537$  ng/mg; medijan 0,285 (0,01-3,2), a PAI-1  $4,237 \pm 3,696$  ng/mg; medijan 3,285 (1,2-19,14).

Usporedbom citosola tumora  $> 1$  cm i tumora  $\leq 1$  cm nađene su značajno veće koncentracije uPA ( $P=0,002$ ) i PAI-1 ( $P=0,001$ ) u tumorima  $> 1$  cm.



Slika 16. Koncentracije uPA u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače manjim ( $n=50$ ) i većim od 1 cm ( $n=55$ ) (srednja vrijednost $\pm$ SEM).



Slika 17. Koncentracije PAI-1 u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače manjim (n=50) i većim od 1 cm (n=55) (srednja vrijednost±SEM).

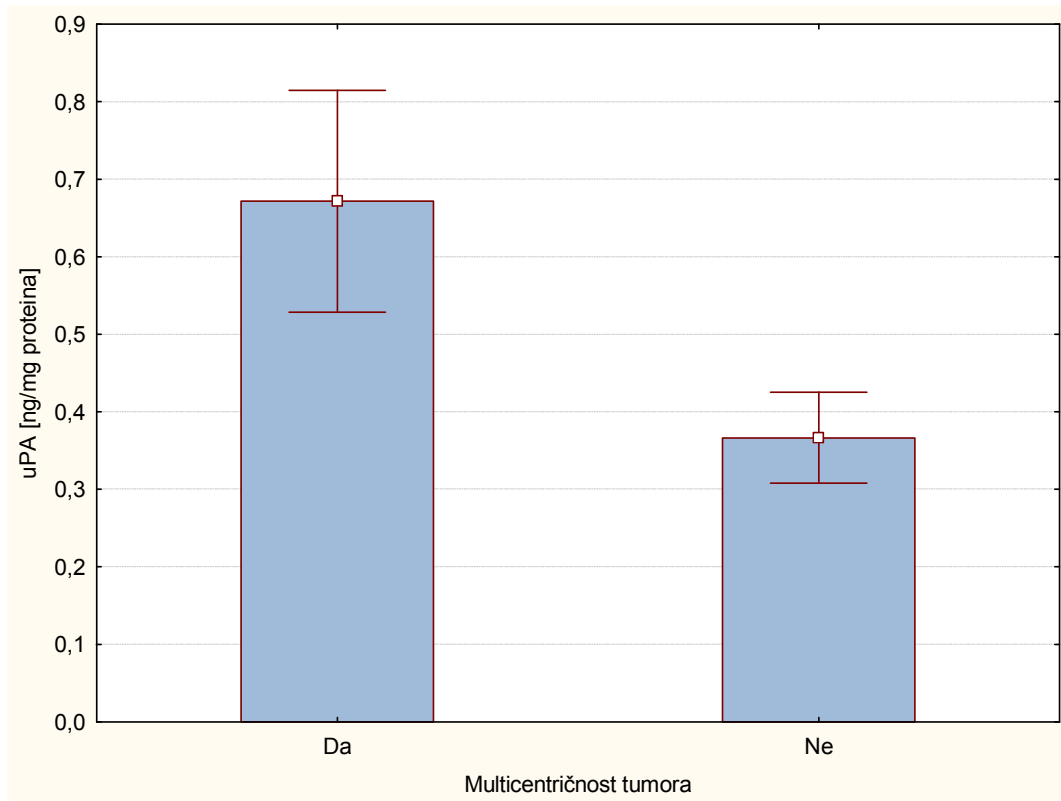
#### 4.2.5. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s multicentričnosti tumora

U skupini diferenciranih karcinoma bilo je 56 bolesnika sa solitarnim tumorom i 49 bolesnika s multicentričnim tumorom. Veličina solitarnih čvorova iznosila je  $1,548 \pm 1,624$ , a tumora koji su pokazivali multicentričnost  $1,908 \pm 2,148$ .

Koncentracija uPA u solitarnim tumorima bila je  $0,366 \pm 0,439$ ; medijan 0,295 (0,01-3,2), a u multicentričnim tumorima  $0,672 \pm 1,001$ ; medijan 0,32 (0,01-6,45).

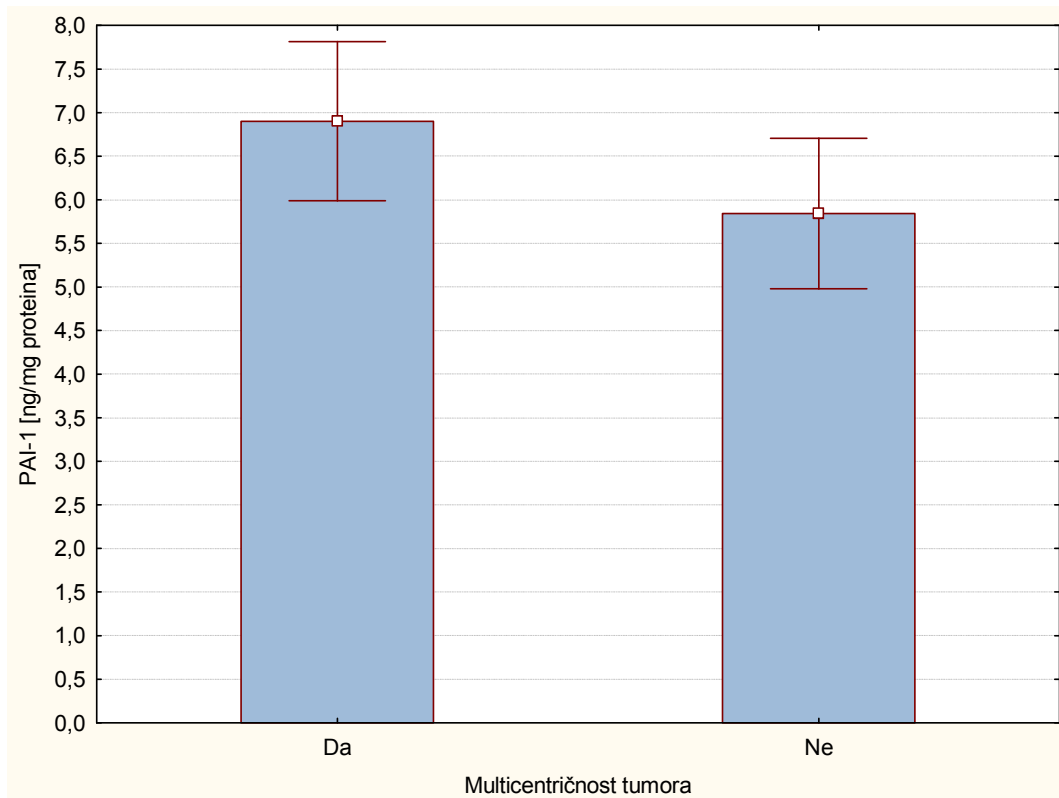
Koncentracija PAI-1 u solitarnim tumorima iznosila je  $5,843 \pm 6,454$ ; medijan 4,055 (1,2-35,69), a u multicentričnim tumorima  $6,901 \pm 6,39$ ; medijan 3,8 (1,8-33,8).

Usporedbom citosola solitarnih i multicentričnih karcinoma štitnjače nađena je značajno veća koncentracija uPA u multicentričnim tumorima ( $P=0,015$ ), ali ne i koncentracija PAI-1 ( $P=0,252$ ).



Slika 18. Koncentracije uPA u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, solitarnom ( $n=56$ ) i multicentričnom ( $n=49$ ) (srednja vrijednost $\pm$ SEM).





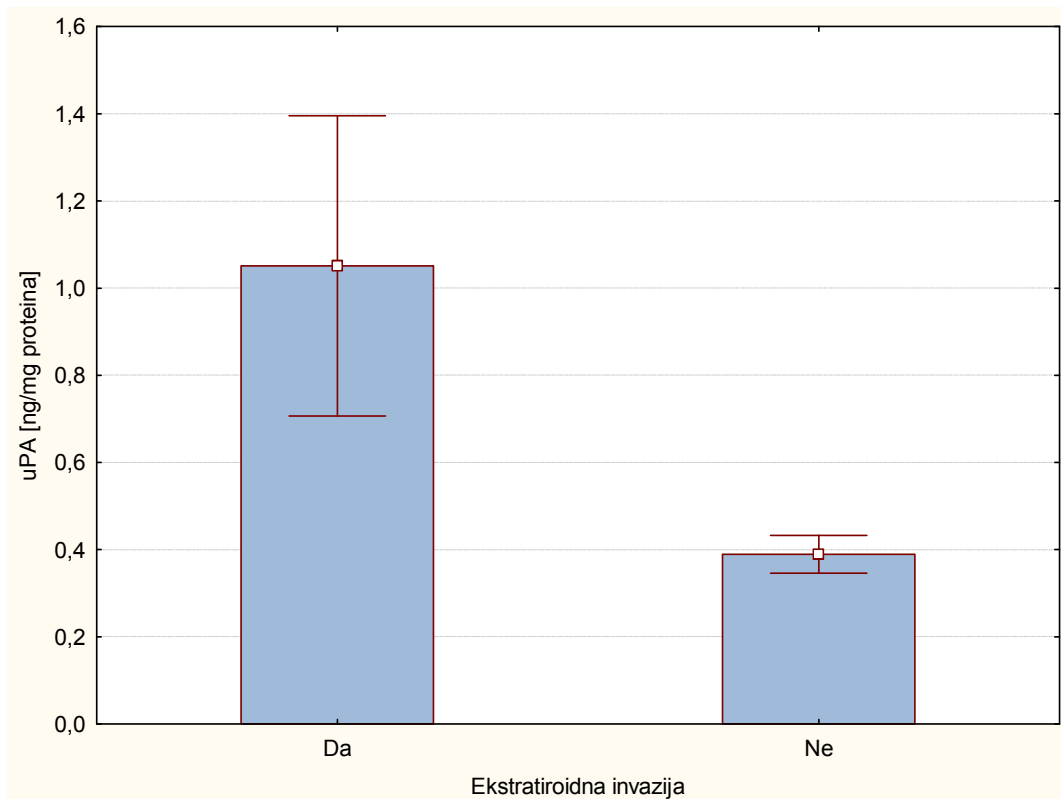
Slika 19. Koncentracije PAI-1 u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, solitarnom (n=56) i multicentričnom (n=49) (srednja vrijednost±SEM).

#### 4.2.6. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s ekstratireoidnom invazijom

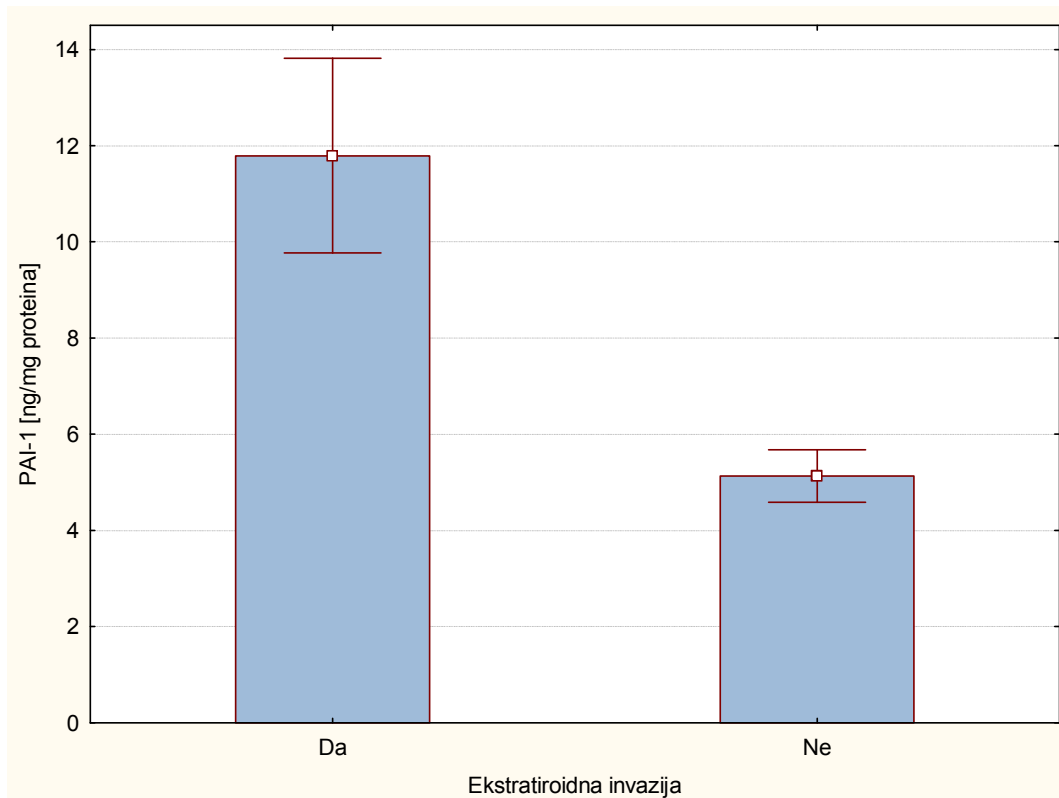
Od 105 diferenciranih karcinoma štitnjače, 19 bolesnika je imalo karcinom štitnjače s ekstratireoidnom invazijom, a 86 bolesnika je imalo karcinom bez ekstratireoidne invazije. Veličina tumora u skupini bolesnika bez lokalne invazivnosti tumora bila je  $1,520 \pm 1,425$  cm, a u skupini bolesnika s ekstratireoidnom invazijom veličina tumora iznosila je  $2,605 \pm 3,152$  cm.

Koncentracija uPA u tumorima koji nisu bili lokalno invazivni iznosila je  $0,389 \pm 0,403$  ng/mg; medijan 0,3 (0,01-3,2), a PAI-1  $5,132 \pm 5,078$  ng/mg; medijan 3,5 (1,2-35,69).

Koncentracija uPA u tumorima koji su bili lokalno invazivni iznosila je  $1,051 \pm 1,501$  ng/mg; medijan 0,42 (0,01-6,45), a PAI-1  $11,791 \pm 8,815$  ng/mg; medijan 9,9 (2,23-33,8). Nađeno je da su i uPA i PAI-1 značajno viši u diferenciranih karcinoma štitnjače s ekstratiroidnom invazijom u odnosu na tumore koji nisu lokalno invazivni (P za uPA=0,015, P za PAI-1 <0,001).



Slika 20. Koncentracije uPA u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, s lokalnom invazijom (n=19) i bez lokalne invazije (n=86) (srednja vrijednost±SEM).



Slika 21. Koncentracije PAI-1 u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, s lokalnom invazijom (n=19) i bez lokalne invazije (n=86) (srednja vrijednost±SEM).

#### 4.2.7. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s metastazama u regionalne limfne čvorove

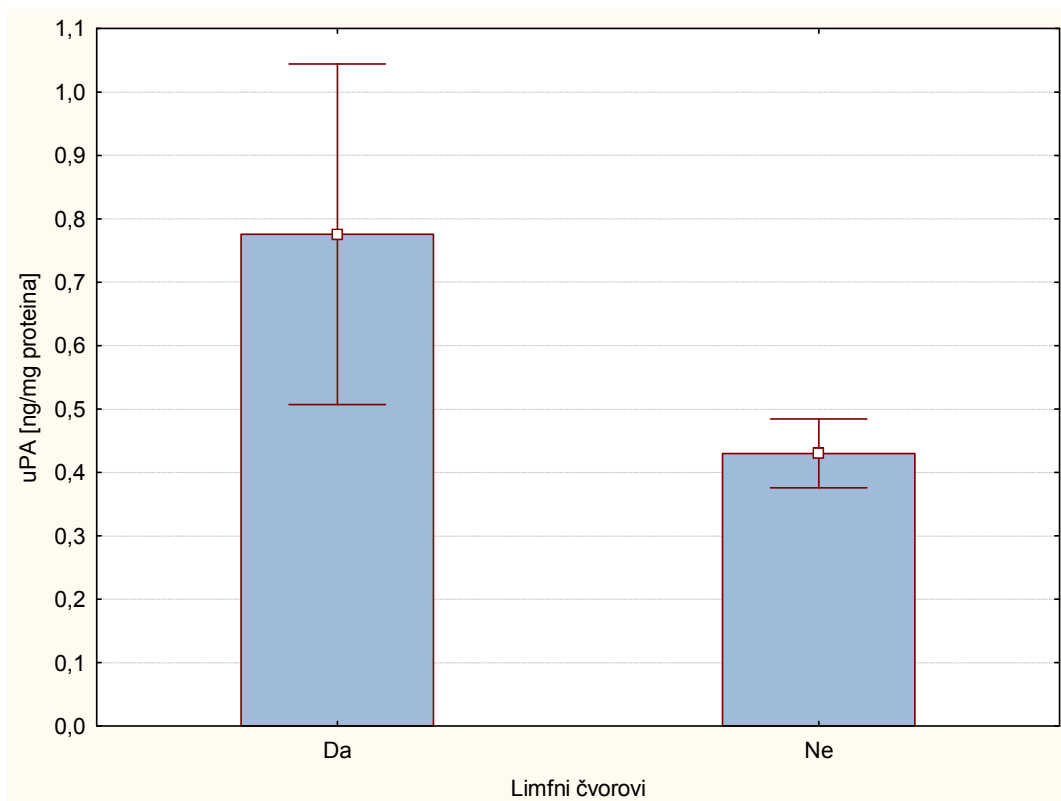
81 bolesnik s diferenciranim karcinomom štitnjače nije imao metastaze u regionalne limfne čvorove, dok je 24 bolesnika imalo regionalne metastaze.

Veličina tumora u skupini bolesnika s negativnim limfnim čvorovima bila je  $1,479 \pm 1,424$  cm, a u skupini bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima bila je  $2,517 \pm 2,857$  cm.

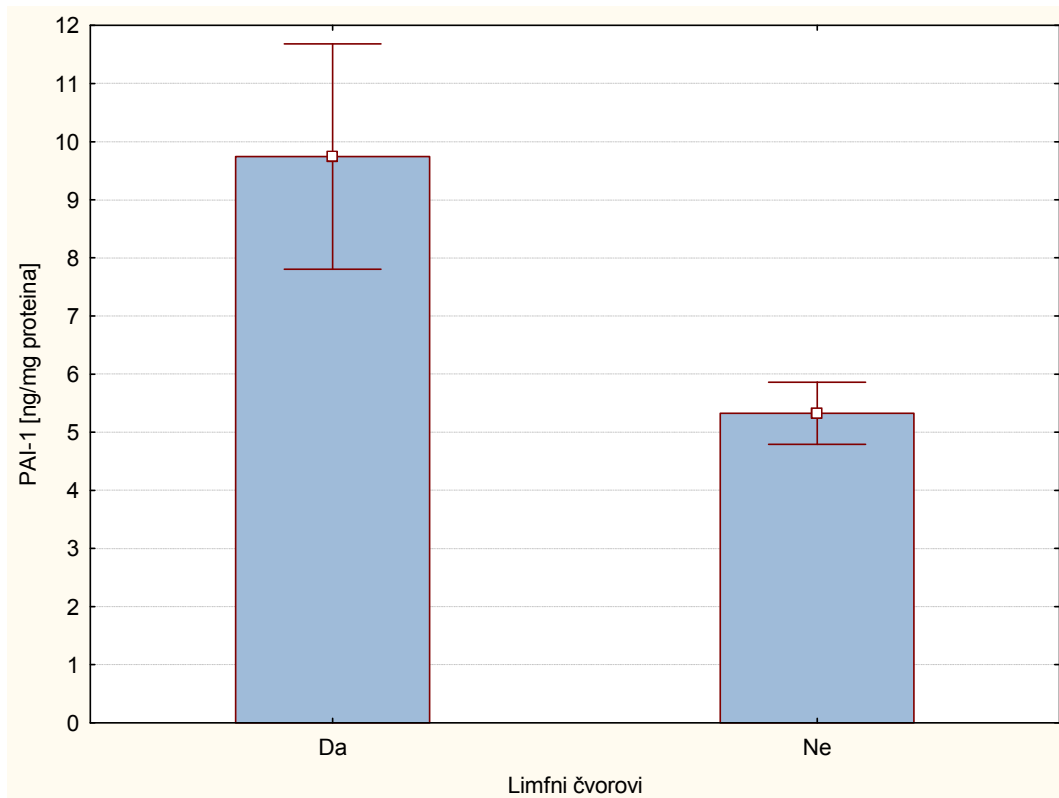
Srednja vrijednost uPA u skupini bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače bez metastaza u lokalne limfne čvorove iznosila je  $0,430 \pm 0,489$  ng/mg; medijan 0,3 (0,01-3,2), a srednja vrijednost PAI-1  $5,327 \pm 4,802$  ng/mg, medijan 3,76 (1,28-28).

U skupini bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima uPA je iznosio  $0,775 \pm 1,316$  ng/mg; medijan 0,32 (0,01-6,45), a PAI-1  $9,745 \pm 9,498$  ng/mg; medijan 5,78 (1,2-35,69).

Niti za jednu proteazu nije nađena statistički značajna razlika između skupine bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima i skupine s negativnim limfnim čvorovima (uPA  $P=0,232$ , PAI-1  $P=0,056$ ).



Slika 22. Koncentracije uPA u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, s pozitivnim (n=24) i negativnim regionalnim limfnim čvorovima (n=86) (srednja vrijednost $\pm$ SEM).



Slika 23. Koncentracije PAI-1 u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, s pozitivnim (n=24) i negativnim regionalnim limfnim čvorovima (n=86) (srednja vrijednost±SEM).

#### 4.2.8. Povezanost vrijednosti uPA i PAI-1 u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače s udaljenim metastazama

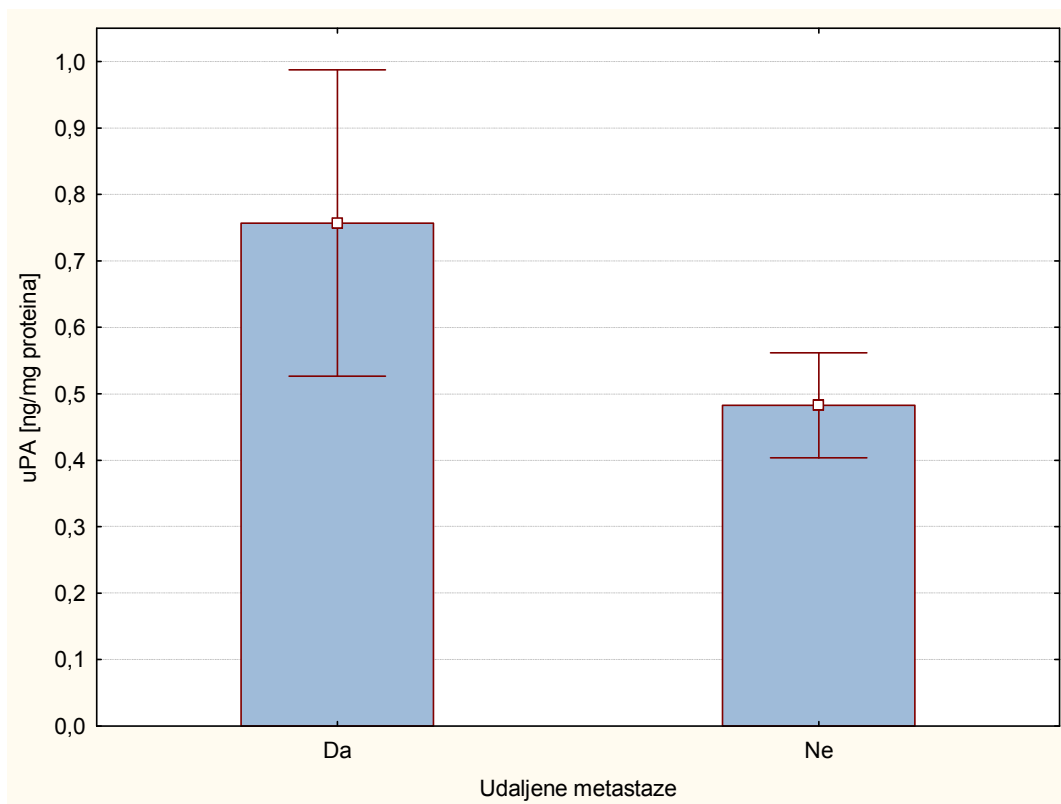
Od 105 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače 10 je imalo udaljene metastaze (pet bolesnika je imalo metastaze u kostima, tri u plućima, te dva bolesnika u kostima i plućima).

Veličina tumora u bolesnika s udaljenim metastazama bila je  $5,130 \pm 3,891$  cm, a bez udaljenih metastaza  $1,357 \pm 1,056$  cm.

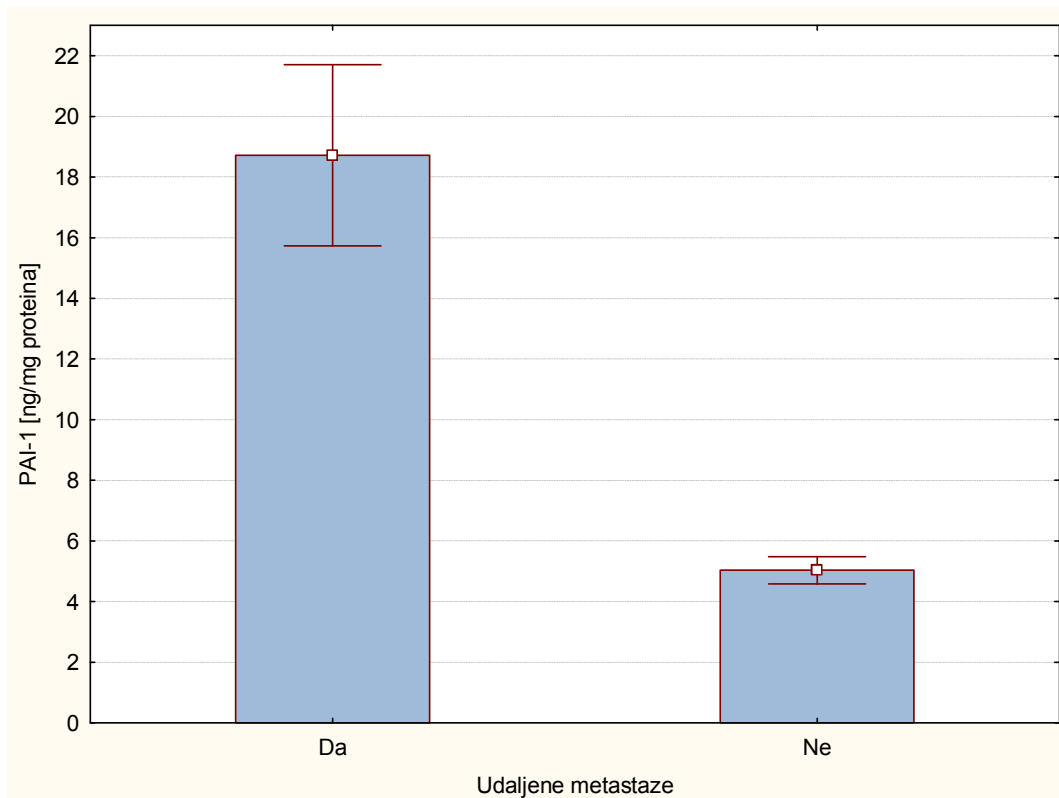
U skupini bolesnika bez udaljenih metastaza srednja vrijednost uPA bila je  $0,483 \pm 0,77$  ng/mg; medijan 0,31 (0,01-6,45), a PAI-1  $5,034 \pm 4,356$  ng/mg; medijan 3,53 (1,2-28).

U skupini bolesnika s udaljenim metastazama uPA je iznosio  $0,757 \pm 0,729$  ng/mg; medijan 0,445 (0,22-2,5), a PAI-1  $18,715 \pm 9,445$  ng/mg; medijan 17,52 (4,71-35,69).

Usporedbom dviju skupina nađena je značajno viša vrijednost PAI-1 u bolesnika s udaljenim metastazama u odnosu na one bez metastaza ( $P < 0,001$ ), ali ne i viša vrijednost uPA ( $P = 0,186$ ).



Slika 24. Koncentracije uPA u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, s udaljenim metastazama (n=10) i bez metastaza (n=95) (srednja vrijednost $\pm$ SEM).



Slika 25. Koncentracije PAI-1 u tumorskom tkivu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, s udaljenim metastazama (n=10) i bez metastaza (n=95) (srednja vrijednost±SEM).

#### 4.3. Povezanost uPA i PAI-1 iz citosola diferenciranih karcinoma štitnjače s tumorskom progresijom

Bolesnici s diferenciranim karcinomom štitnjače su prosječno praćeni nakon totalne tireoidektomije  $44,12 \pm 19,527$  mjeseci; medijan 44 mjeseca (19-88).

Zabilježeno je 14 relapsa bolesti s prosječnim PFS-om  $13,21 \pm 9,192$  mjeseci; medijan 13 mj (2-37). Tri bolesnika su umrla u vremenu praćenja.

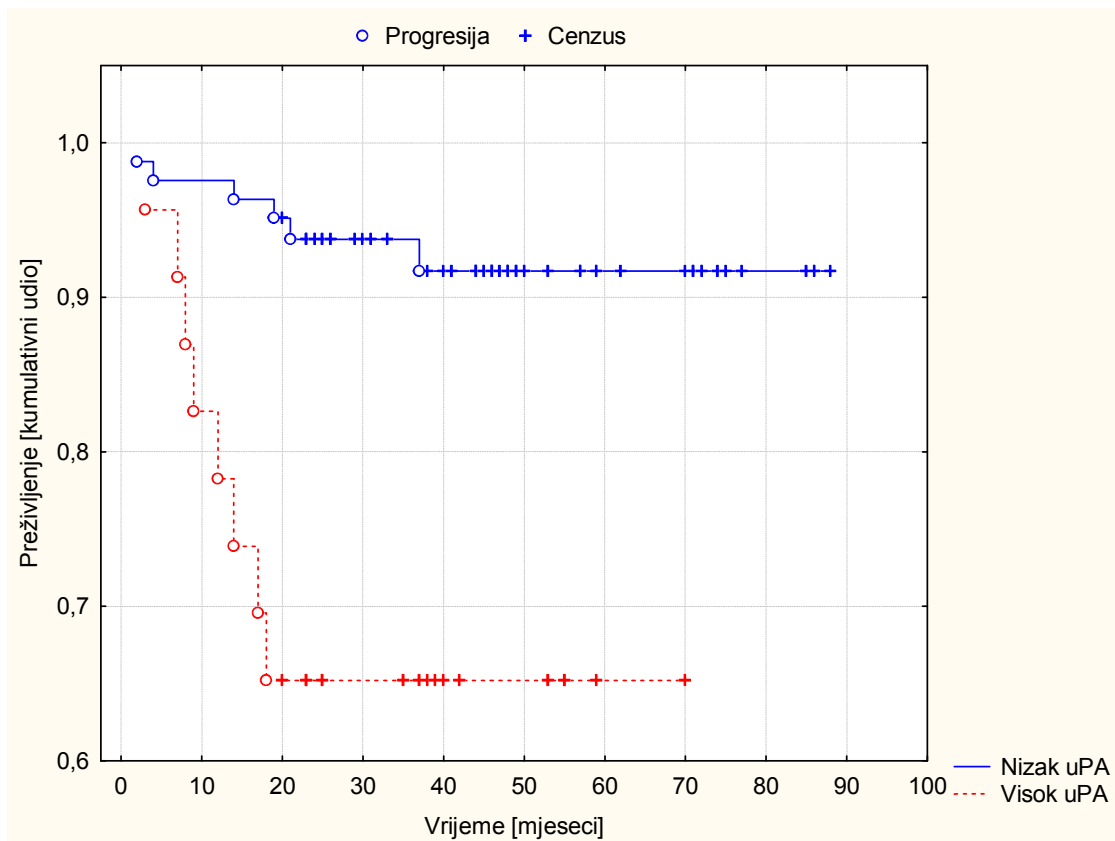
Kaplan-Meierove krivulje preživljenja s Log Rank testom učinjene su za 105 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače.

Srednja vrijednost preživljenja bez progresije karcinoma štitnjače bila je 37,82 mjeseci.

Bolesnici su dihotomizirani na temelju srednje vrijednosti uPA= 0,509 ng/mg proteina i srednje vrijednosti PAI-1 = 6,337 ng/mg proteina. Log Rank test je korišten za procjenu razlika između grupe s visokim, odnosno niskim uPA i PAI-1.

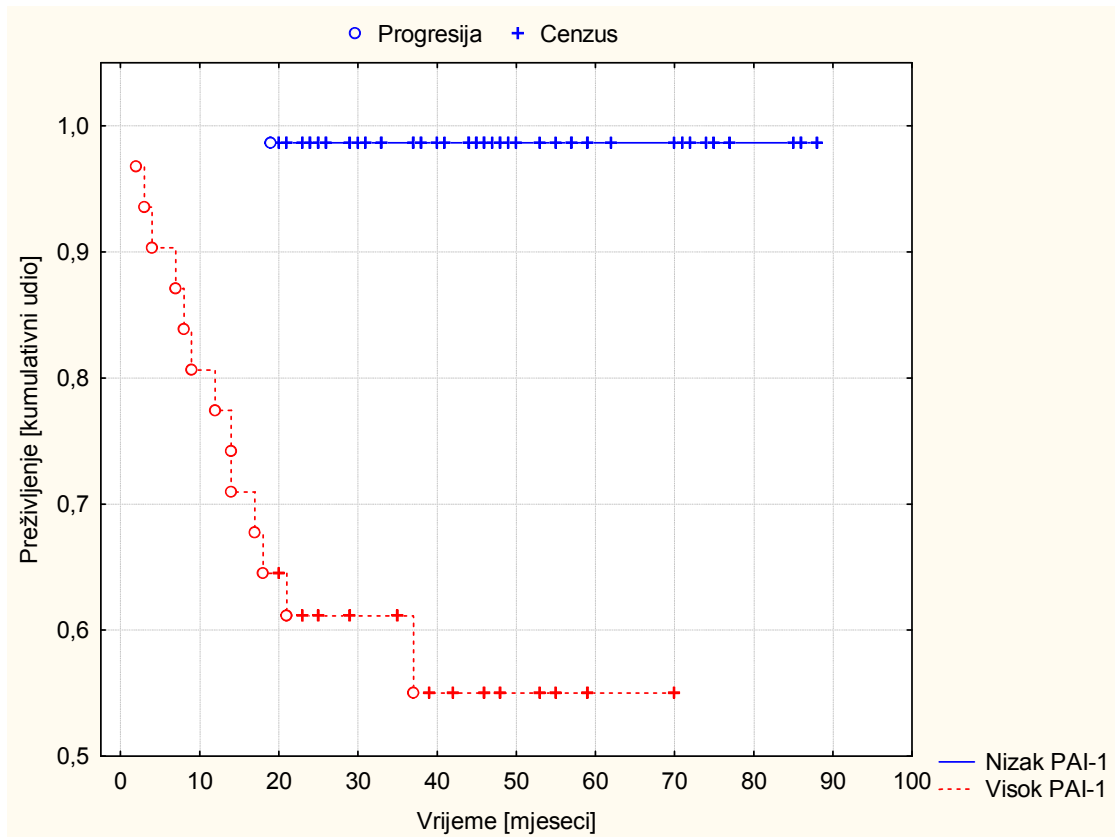
Bolesnici s niskim koncentracijama uPA (n=82) imali su veću srednju vrijednost PFS-a u usporedbi s bolesnicima s visokim uPA (n=23) (82,22±2,277 mjeseci vs. 49,478±5,89 mjeseci); P<0,001.

Također, bolesnici s niskim PAI-1 (n=74) pokazali su značajno dulji PFS (87,068±0,926 mjeseci) u odnosu na bolesnike s visokim uPA (n=31) (44,964±5,309 mj); P<0,001.



Slika 26. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja bez progresije u bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače: 82 bolesnika s niskom koncentracijom uPA i 23 bolesnika s visokom koncentracijom uPA (Log Rank test, P<0,001).





Slika 27. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja bez progresije u bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače: 74 bolesnika s niskom koncentracijom PAI-1 i 31 bolesnik s visokom koncentracijom PAI-1 (Log Rank test,  $P < 0,001$ ).

#### 4.4. **Određivanje neovisnih varijabli koje imaju utjecaj na preživljenje bez progresije (PFS) diferenciranih karcinoma štitnjače**

Učinjen je niz Cox-ovih regresijskih analiza.

Univarijatnom analizom nađeno je da slijedeće varijable imaju utjecaj na preživljenje bez progresije diferenciranih tumora: spol ( $P = 0,025$ ), veličina tumora ( $P < 0,001$ ), gradus ( $P < 0,001$ ), ekstratireoidna invazija ( $P < 0,001$ ), pozitivni limfni čvorovi ( $P < 0,001$ ), udaljene metastaze ( $P < 0,001$ ), uPA ( $P < 0,001$ ) i PAI-1 u tumorskom tkivu ( $P < 0,001$ ), dok

dob ( $P=0,56$ ), histološki tip diferenciranih tumora ( $P=0,206$ ) i multicentričnost tumora ( $P=0,365$ ) nemaju značajan utjecaj na PFS.

Multivarijatnom Cox-ovom regresijom analizirani su čimbenici koji su se univarijatnom analizom pokazali statistički značajnima, te je pokazano da su udaljene metastaze (HR 11,654, 95% CI 1,162-116,898,  $P=0,037$ ), uPA u tumorskom tkivu (HR 1,987, 95% CI 1,188-3,326,  $P=0,009$ ) i PAI-1 u tumorskom tkivu diferenciranih tumora (HR 1,131, CI 1,037-1,234,  $P=0,006$ ) neovisne varijable koje imaju utjecaj na PFS.

Tablica 3. Univarijatna Cox-ova regresijska analiza prognostičkih čimbenika za predviđanje preživljenja bez progresije (PFS) u 105 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače

Varijable	Omjer rizika	95 % CI	P
spol	3,492	1,167-10,443	0,025
dob	1,011	0,974-1,050	0,560
PHD	0,380	0,085-1,701	0,206
veličina tm	1,446	1,254-1,669	<0,001
multicentričnost	1,632	0,566-4,711	0,365
gradus	0,044	0,015-0,135	<0,001
ekstratireoidna invazija	7,111	2,462-20,542	<0,001
limfni čvorovi	7,604	2,538-22,738	<0,001
udaljene metastaze	79,517	19,722-291,486	<0,001
uPA u tumoru	1,892	1,365-2,623	<0,001
PAI-1 u tumoru	1,158	1,107-1,211	<0,001

Tablica 4. Multivarijatna Cox-ova regresijska analiza prognostičkih čimbenika za predviđanje preživljenja bez progresije (PFS) u 105 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače

Varijable	Omjer rizika	95 % CI	P
spol	0,341	0,055-2,135	0,251
veličina tm	1,229	0,98-1,541	0,074
gradus	0,442	0,11-1,78	0,251
ekstratireoidna invazija	0,582	0,111-3,052	0,522
limfni čvorovi	4,650	0,541-40	0,162
udaljene metastaze	11,654	1,162-116,898	0,037
uPA u tumoru	1,987	1,188-3,326	0,009
PAI-1 u tumoru	1,131	1,037-1,234	0,006

## 5. RASPRAVA

Terapija karcinoma štitnjače sastoji se od totalne tireoidektomije i radiojodne ablacije ostatnog tkiva, nakon čega slijedi supstitucijsko-supresivna terapija l-tiroksinom.

Poznato je da karcinomi štitnjače imaju uglavnom dobru prognozu i petogodišnje preživljenje je preko 90%, međutim u nekih bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače tijekom bolesti je progresivan i može završiti smrtnim ishodom. Unatoč odličnoj prognozi diferenciranih karcinoma štitnjače postoje još uvijek neka otvorena pitanja u svezi terapije: da li podvrgnuti bolesnika totalnoj tireoidektomiji ili manje ekstenzivnom operativnom zahvatu; da li primjeniti rutinski radiojodnu ablaciju i kod bolesnika koji pripadaju skupini niskog ili vrlo niskog rizika; da li je potrebna i koliko dugo supresivna terapija l-tiroksinom. Zbog toga je od kliničke važnosti pronaći prognostičke čimbenike, koji bi ukazali na prognozu bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače. Potreba za pronalaženjem prognostičkog čimbenika u karcinoma štitnjače je neupitna, te se novi prognostički biološki čimbenici stalno istražuju. Međutim, do danas niti jedan nije ušao u rutinsku kliničku upotrebu.

Odluka o postupku bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače trebala bi se temeljiti na dobro etabliranim prognostičkim čimbenicima i svrstavanju bolesnika u određene rizične skupine. Relativno dobra prognoza karcinoma štitnjače i dugo preživljenje bolesnika otežava razvoj prospektivnih, randomiziranih studija, koje bi odredile na koji način obilježja tumora, te načini liječenja utječu na specifični mortalitet i preživljenje bez bolesti (disease-free survival, DFS).

Važni prognostički čimbenici za diferencirane karcinome štitnjače proizašli iz velikih retrospektivnih, nekontroliranih studija uključuju: dob bolesnika, veličinu primarnog tumora, gradus i histološki tip tumora, ekstratireoidnu invaziju i prisustvo udaljenih metastaza (12, 113, 114).

U literaturi je mnogo podataka o istraživanju plazminogenog aktivacijskog sustava i njegovih istaknutih dijelova uPA i PAI-1 u mnogim zloćudnim tumorima. Mnogi radovi

pokazuju da je plazminogeni aktivacijski sustav (PAS) involviran u tumorski rast, invaziju i metastaziranje preko upliva sustava na angiogenezu i migraciju stanica. Nadalje, PAS ima multifunkcionalnu ulogu u biologiji tumora budući da sudjeluje i u ponovnom modeliranju tkiva oko tumorskih stanica što doprinosi procesu metastaziranja (115). Komponente PAS-a su nađene u mnogim tumorima i njihova ekspresija ima značenje ne samo u funkciji, nego i u prognozi tumora (116).

Najekstenzivnije se istražio uPA i njegov inhibitor PAI-1 u karcinomima dojke, te se uPA i PAI-1 i smatraju prvim biološkim čimbenicima koji su evaluirani prospektivnom, randomiziranom studijom ili skupnom analizom. Također, pokazano je u mnogim radovima da su uPA i/ili PAI-1 neovisne varijable za identifikaciju bolesnika visokog rizika u karcinomu želuca (94), kolorektalnom karcinomu (95), karcinomu jajnika (96), endometrija (97), planocelularnom karcinomu pluća (99), karcinomu bubrežnih stanica (100), karcinomu prostate (101), melanomu (102), te sarkomu mekih tkiva (103).

O utjecaju plazminogenog aktivacijskog sustava na tumore štitnjače zasad je objavljeno malo radova (104, 105, 106, 107, 108, 109, 110).

U našem radu nađena je značajno viša koncentracija uPA i PAI-1 u malignim tumorima štitnjače nego u pripadajućem normalnom tkivu. Prisustvo PAI-1 u karcinoma štitnjače korelira s uPA, te sugerira da oba proteina igraju važnu ulogu u regulaciji aktivacije plazminogena, a time i u procesu invazije i metastaziranja. Kritična ravnoteža uPA i PAI-1 je preduvjet efikasne proteolize, migracije tumorskih stanica, a time i posljedične tumorske invazije i metastaziranja, kao što je pokazano i za ostale karcinome (82).

Različiti prognostički sustavi, koji kombiniraju različite prognostičke čimbenike, razvrstavaju bolesnike s diferenciranim karcinomom štitnjače u tri prognostičke skupine: vrlo niskog, niskog i visokog rizika (12). AMES kategorizira bolesnike u tri skupine na temelju dobi, metastaza, proširenosti i veličine tumora (54). Slične prognostičke sustave razvili su i EORTC i Američko društvo za karcinome (AJCC-UICC)(52). Sve prognostičke sheme sadrže ekstratireoidnu invaziju i udaljene metastaze, gotove sve uključuju veličinu tumora, a većina uzima i histološki tip u razmatranje. Neki prognostički sustavi uključuju histološki gradus (AGES)(55) ili prisustvo multiplih tumora (Ohio State University)(10). Samo jedan prognostički sustav (MACIS) uključuje kompletnost resekcije kao prognostički parametar (12). U komparativnoj studiji 17

prognostičkih, bodovnih sustava za papilarni karcinom štitnjače nađeno je da MACIS ima najveću prediktivnu vrijednost i mogao bi biti sustav izbora za PKŠ-e u budućnosti (12), dok za FKŠ-e najveću prediktivnu vrijednost ima TNM sustav (117).

Dob bolesnika ima veliki utjecaj na ishod bolesti u diferenciranim karcinomima štitnjače. Time je karcinom štitnjače jedini karcinom u onkologiji za koji se dob uzima u prognostički sustav AJCC-UICC-a. Niti jedan drugi karcinom ne iskazuje dob kao prognostički parametar. U našem radu nije nađena značajna razlika u koncentraciji uPA i PAI-1 u skupini bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače starijih od 40 godina u odnosu na skupinu mlađih od 40 godina. Granična dob od 40 godina koristi se u AGES i MACIS sustavu Mayo Klinike, u nekim sustavima (TNM) koristi se granična dob od 45 godina, dok u nekima (AMES) granična dob je različita za žene i muškarce.

Istraživana je povezanost koncentracije uPA i PAI-1 i diferencijacije karcinoma štitnjače. Ito i autori su u svojoj imunohistokemijskoj studiji pokazali da nema statistički značajne povezanosti između dijelova plazminogenog aktivacijskog sustava i stupnja diferencijacije karcinoma štitnjače (106). Naši rezultati pokazuju da je stupanj diferencijacije tumora povezan s koncentracijom uPA i PAI-1 u citosolu tumora. Koncentracije uPA i PAI-1 značajno su različite između različitih histoloških gradusa tumora ( $P=0,031$  za uPA, odnosno  $P<0,001$  za PAI-1). Analiza podgrupa pokazala je značajnu razliku uPA i PAI-1 između gradusa I i gradusa III ( $P<0,001$  za uPA i PAI-1). Između gradusa I i II nađena je značajna razlika PAI-1 ( $P<0,001$ ), ali ne i uPA ( $P=0,287$ ). Razlika između rezultata naše i Ito-ve studije može biti uvjetovana različitim metodama koje su korištene u određivanju uPA i PAI-1. U našoj studiji korištena je ELISA kao senzitivna i kvantitativna metoda, dok je u Ito-voj studiji korištena imunohistokemija kao manje senzitivna i semikvantitativna. S druge strane naši rezultati su usporedivi s rezultatima studija drugih karcinoma (94, 96, 97, 103, 125).

uPA i PAI-1 pokazuju različite vrijednosti u različitim histološkim tipovima karcinoma štitnjače. Diferencirani tumori pokazuju značajno niže vrijednosti dijelova plazminogenog sustava nego anaplastični karcinomi. U skupini diferenciranih karcinoma štitnjače, nije nađena značajna razlika uPA i PAI-1 između papilarnih i folikularnih karcinoma štitnjače. Agresivnije varijante (visokostanični tip, difuzno sklerozirajući tip) nisu u statističkim analizama posebno prikazane zbog niske učestalosti.

Utjecaj histološkog nalaza na ishod bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače ispitivan je na 875 bolesnika s PKŠ-e i 350 bolesnika s FKŠ-e. Tumor-specifični mortalitet bio je isti za papilarni i folikularni karcinom štitnjače, u slučaju kad je analiza bila kontrolirana za ostale prognostičke čimbenike. Multivarijatnom analizom identificirane su četiri neovisne varijable koje imaju utjecaj na prognozu tumora: udaljene metastaze, dob, veličina primarnog tumora i tumorska invazija; međutim, nađeno je da histologija nije prediktivni čimbenik preživljenja (46).

Postoji linearna povezanost između veličine primarnog tumora i recidiva, odnosno mortaliteta za papilarni i folikularni karcinom štitnjače (38). Recidiv i mortalitet papilarnih karcinoma manjih od 1 cm su izrazito rijetki (39). Ipak, mikrokarcinomi su u 20% slučajeva multifokalni i do 60% imaju pozitivne cervikalne limfne čvorove, a u nekih se čak razvijaju i metastaze u pluća (40).

U našem radu smo podjelili diferencirane karcinome štitnjače obzirom na veličinu primarnog tumora na manje od 1 cm, odnosno veće od 1 cm.

U skupini tumora većih od 1 cm nađene su značajno povišene vrijednosti oba proteina uPA ( $P=0,002$ ) i PAI-1 ( $P=0,001$ ). Ullisse i suradnici su našli korelaciju između veličine tumora i porasta uPA mRNA (110).

Univarijatnom analizom u našem radu nađeno je da veličina tumora ima značajan ( $P<0,001$ ) utjecaj na preživljenje bez progresije (PFS), ali se multivarijatnom analizom pokazalo da veličina tumora nije neovisna prgnostička varijabla.

Multicentričnost je jedan od važnijih razloga za totalnu tireoidektomiju. U našem radu multicentričnost je pronađena u 46,7 % slučajeva diferenciranih karcinoma štitnjače. U literaturi se navodi da se multicentrični tumori nađu rutinskim pregledom u 20% bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače, te čak u 80% bolesnika, ako se štitnjača pregledava s većom pažnjom. Oko polovine bolesnika upućenih na rutinsku tireoidektomiju zbog unilateralnog karcinoma štitnjače ima tumor u kontralateralnom režnju (10, 41), što je u skladu s našim podacima. Koristeći gensku analizu, noviji radovi pokazuju da su multifokalni papilarni karcinomi štitnjače individualni tumori koji rastu neovisno (42). Usporedbom citosola solitarnih i multicentričnih karcinoma štitnjače u našem radu nađena je značajno viša koncentracija uPA u multicentričnim tumorima ( $P=0,015$ ), ali ne i koncentracija PAI-1 ( $P=0,252$ ). Univarijatnom analizom nije nađen



značajan utjecaj multicentričnosti na preživljenje bez progresije. U radu Pešutić-Pisac i suradnika multicentričnost nije također prognostički čimbenik za razvoj udaljenih metastaza. Smatra se da je multicentričnost rezultat multicentrične transformacije folikularnog epitela, a ne process limfogenog širenja (118).

Prisustvo ekstratireoidne invazije je još jedan važan čimbenik za totalnu tireoidektomiju. Bolesnici s ekstratireoidnom invazijom, prema literaturnim navodima imaju višu incidenciju lokalnog recidiva, regionalnih i udaljenih metastaza. Prognoza je bolja u slučaju mikroskopske tumorske invazije u okolno tkivo nego u slučaju makroskopske invazije okolnih struktura. U našem radu od 105 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače ekstratireoidna invazija je nađena u 21-og (23,4%). Mazzaferri navodi nešto nižu učestalost lokalne invazije, koja je prisutna u 8% papilarnih i 12% folikularnih karcinoma (38). U radu je pokazano da su i uPA i PAI-1 značajno viši u diferenciranim karcinoma štitnjače s ekstratireoidnom invazijom u odnosu na tumore koji nisu lokalno invazivni (P za uPA=0,015; P za PAI-1 <0,001). Univarijatnom analizom ekstratireoidna invazija se izdvojila kao značajni parametar koji ima utjecaj na ishod bolesti, odnosno progresiju, ali se multivarijatnom Cox-ovom regresijskom analizom ekstratireoidna invazija nije potvrdila kao neovisni prognostički parametar.

Prognostički značaj regionalnih limfnih čvorova je proturječan. Do sada ima velik broj radova koji nalaze da su nodalne metastaze čimbenik rizika za lokalni recidiv tumora, udaljene metastaze i karcinom-specifični mortalitet, a posebno ukoliko se radi o bilateralnim ili medijastinalnim limfnim čvorovima (38, 40). Međutim u nekoliko radova je pokazano da status regionalnih limfnih čvorova nema utjecaja ili ima ograničeni značaj na sveukupno preživljenje (49, 50, 51). U nekim radovima pokazano je da pozitivni limfni čvorovi u starijih bolesnika povećavaju rizik recidiva (119).

U velikoj retrospektivnoj, kohortnoj analizi podataka, iz baze podataka SEER, na 30 504 bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače i 2584 bolesnika s folikularnim karcinomom štitnjače, pokazano je da je status limfnih čvorova neovisni pokazatelj preživljenja u bolesnika s PKŠ-e starijih od 45 godina, te u bolesnika s FKŠ-e, bez obzira na dob. Prisustvo metastaza u lokalne limfne čvorove u bolesnika s PKŠ-e mlađih od 45 godina ne utječe na preživljenje (120).

Metastaze u limfne čvorove vide se u 36% odraslih bolesnika s PKŠ-e, te u 80% djece s PKŠ-e (36, 43). U našoj studiji 24 (22,9%) bolesnika imalo je metastaze u regionalne limfne čvorove, što je nešto niže prema navodima iz literature. Nađeno je da nema statistički značajne razlike obje proteaze u skupini s pozitivnim limfnim čvorovima u odnosu na skupinu s negativnim limfnim čvorovima (uPA  $P=0,232$ ; PAI-1  $P=0,056$ ). Univarijatnom analizom pozitivni regionalni limfni čvorovi imaju značajan utjecaj na preživljenje bez progresije, međutim multivarijatnom analizom limfni čvorovi se nisu pokazali kao nezavisni prognostički čimbenik.

Oko 10% bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače i do 25% s folikularnim karcinomom razvija udaljene metastaze, a u oko polovine bolesnika su prisutne u vrijeme dijagnoze. U 49% slučajeva karcinomi štitnjače metastaziraju u pluća, u 25% u kosti, 15% u pluća i kosti i 10% u središnji živčani sustav (36). U našem uzorku diferenciranih karcinoma štitnjače udaljene metastaze su nađene u 10 (9,5%) bolesnika, što se podudara s navodima iz literature. Nađena je značajno viša vrijednost PAI-1 u bolesnika s udaljenim metastazama u odnosu na one bez metastaza ( $P<0,001$ ), ali ne i uPA ( $P=0,186$ ).

Povećana ekspresija PAI-1 je povezana s agresivnom bolesti i lošom prognozom u različitim karcinoma. Postoji nekoliko hipoteza o načinu djelovanja PAI-1 u procesu tumorske invazije, a jedna od važnijih je da PAI-1 ima glavnu ulogu u tumorskoj neoangiogenezi, modulaciji adhezije i migracije stanica i inhibiciji apoptoze. Također, PAI-1 vjerojatno ima sposobnost da zaštiti tumor od proteolitičke aktivnosti (121).

Multivarijatnom analizom pokazano je da su udaljene metastaze statistički ( $P=0,037$ ) nezavisan čimbenik preživljenja bez progresije.

Sveukupno preživljenje i ishod bolesti u većine bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače je izuzetno dobar, te bi u svrhu analize utjecaja određenih čimbenika na ishod bolesti period praćenja trebao biti oko 20 godina. Preživljenje bez progresije (PFS) se definira kao vrijeme proteklo između inicijalne terapije i progresije tumora ili smrti s cenzuriranjem bolesnika koji su ispali iz praćenja. Mnoge recentne, randomizirane studije u onkologiji solidnih tumora koriste PFS kao primarni cilj istraživanja (122). Sveukupno

preživljenje kao pokazatelj ishoda bolesti je manje korišten u odnosu na udio povrata bolesti u procjeni morbiditeta od karcinoma štitnjače.

U našoj studiji analiziran je utjecaj uPA i PAI-1 na PFS. Medijan praćenja bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače nakon totalne tireoidektomije bio je 44 mjeseca (raspon 19-88 mjeseci). Zabilježeno je 14 relapsa bolesti (13 %) s medijanom PFS-a 13 mj (2-37), što je u skladu s navodima drugih autora koji navode lokalni ili udaljeni recidiv u 14% slučajeva (123). Tri bolesnika su umrli u vremenu praćenja.

Kaplan-Meierove krivulje preživljenja s Log Rank testom učinjene su za 105 bolesnika. Nađeno je da oba proteina, i uPA i PAI-1 imaju utjecaj na PFS, te bolesnici s višim uPA i PAI-1 imaju kraći PFS u odnosu na one bolesnike s niskim vrijednostima promatranih proteina ( $P < 0,001$  za uPA i PAI-1). Bolesnici su dihotomizirani na temelju srednje vrijednosti uPA i PAI-1, te koncentracije uPA  $> 0,509$  ng/mg proteina i koncentracije PAI-1  $> 6,337$  ng/mg proteina mogu ukazati na skupinu bolesnika s povišenim rizikom za progresiju.

Slični rezultati dobiveni su i u našoj pilot studiji na 19 bolesnika s malignim tumorom štitnjače (124).

U istraživanju uPA i PAI-1 kao prognostičkih parametara u karcinoma dojke u ranom stadiju, koje je uključilo 169 bolesnika, pokazano je da su vrijednosti uPA  $> 3$  ng/mg proteina i PAI-1  $> 14$  ng/mg proteina povezani s kraćim preživljenjem bez bolesti (125).

Cox-ovom regresijskom analizom (univarijatnom) u našem radu nađeno je da spol, veličina tumora, gradus, ekstratireoidna invazija, pozitivni limfni čvorovi, udaljene metastaze, uPA i PAI-1 imaju utjecaj na preživljenje bez progresije, dok dob, histološki tip i multicentričnost tumora nemaju značajan utjecaj.

Multivarijatnom analizom pokazano je da su uz udaljene metastaze (HR 11,654, 95% CI 1,162-116,898,  $P=0,037$ ) i uPA (HR 1,987, 95% CI 1,188-3,326,  $P=0,009$ ) i PAI-1 (HR 1,131, CI 1,037-1,234,  $P=0,006$ ) neovisne prognostičke varijable za diferencirane karcinome štitnjače.

U radu Soyulka i suradnika na 131 bolesniku s papilarnim karcinomom štitnjače nađeno je univarijatnom analizom da su samo uznapredovali tumorski stadij ( $> T1$ ) i prisustvo

metastaza u limfne čvorove značajni prognostički čimbenici recidiva tumora, međutim multivarijatna analiza nije potvrdila niti jedan neovisan prognostički parametar (126).

Na temelju dobivenih rezultata može se reći da u uPA i PAI-1 povezani s malignom progresijom diferenciranih karcinoma štitnjače. Rezultati su konzistentni s hipotezom da povišene vrijednosti uPA i PAI-1 doprinose invazivnosti i metastaziranju karcinoma štitnjače, a time imaju utjecaj na preživljenje bez progresije.

Prema dosadašnjoj literaturi ovo je prvo istraživanje koje kvalitativno evaluira prognostički značaj uPA i PAI-1 u karcinoma štitnjače korelacijom s kliničkim, demografskim i patološkim parametrima, analizama preživljenja, a također i univarijatnim i multivarijatnim analizama. uPA i njegov inhibitor PAI-1 iz citosola tumora mogu služiti kao dodatna informacija u procjeni prognoze diferenciranog karcinoma štitnjače i ispravnoj klasifikaciji tumora u grupe vrlo niskog, niskog ili visokog rizika. Povišene vrijednosti uPA i PAI-1 iz citosola tumora mogle bi pomoći u identifikaciji skupine bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače koja zahtijeva različiti terapijski pristup i kontrolne preglede u kraćim vremenskim razmacima.

Podaci proizašli iz studija prethodnih godina jasno ukazuju da sustav urokinaznog aktivatora plazminogena ima multifunkcionalnu zadaću u evoluciji malignih tumora, djelujući na tumorsku angiogenezu, proliferaciju malignih stanica, adheziju i migraciju, intravazaciju i rast na mjestu metastaza. Uplitanje sustava uPA u tumorsku progresiju identificira njegove komponente kao prikladne ciljeve za terapiju. Nekoliko terapijskih pristupa usmjerenih na dijelove uPA sustava pokazuje antitumorski učinak u modelima ksenografta, uključujući selektivne inhibitore uPA, antagoniste peptida, monoklonska protutijela sposobnih da spriječe vezivanje uPA na uPAR, a također i tehnike genske terapije koje smanjuju izražajnost uPA/uPAR (127, 128, 129).

## 6. ZAKLJUČCI

1. Vrijednosti uPA i PAI-1 su značajno više u malignom tumorskom tkivu štitnjače nego u pripadajućem normalnom tkivu štitnjače.
2. Nađena je značajna pozitivna korelacija između uPA i PAI-1 u citosolu tumorskog tkiva.
3. uPA i PAI-1 imaju utjecaj na preživljenje bez progresije (PFS), te bolesnici s višim uPA i PAI-1 imaju kraći PFS u odnosu na one bolesnike s nižim vrijednostima promatranih proteina.
4. Prognostički čimbenici koji su se pokazali značajnima u univarijantnoj analizi su: spol, veličina tumora, gradus, ekstratireoidna invazija, limfni čvorovi, udaljene metastaze, uPA u tumorskom tkivu i PAI-1 u tumorskom tkivu.
5. Multivarijantnom Cox-ovom regresijskom analizom u koju su uključeni svi značajni prognostički čimbenici iz univarijantne analize pokazano je da statističku značajnost imaju udaljene metastaze, uPA u tumorskom tkivu i PAI-1 u tumorskom tkivu.
6. Vrijednosti uPA i PAI-1 iz citosola tumorskog tkiva diferenciranih karcinoma štitnjače predstavljaju nezavisne prognostičke čimbenike za preživljenje bez progresije.
7. Visoke koncentracije uPA ( $>0,509$  ng/mg proteina) i visoke koncentracije PAI-1 ( $>6,337$  ng/mg proteina) iz citosola diferenciranih karcinoma štitnjače mogu ukazati na skupinu bolesnika s povišenim rizikom za progresiju.

## 7. SAŽETAK

Visoke vrijednosti urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA) i njegovog inhibitora PAI-1 povezane su s lošom prognozom različitih malignih tumora.

Cilj rada bio je istražiti ekspresiju i klinički značaj uPA i PAI-1 u diferenciranom karcinomu štitnjače.

*Bolesnici i metode:* U rad je bilo prospektivno uključeno 128 bolesnika s tumorom štitnjače, od toga 105 bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače, 2 bolesnika s anaplastičnim karcinomom, te 21 bolesnik s adenomom štitnjače.

uPA i PAI-1 su određeni u citosolu tumora, kao i u citosolu pripadajućeg zdravog tkiva, koristeći ELISU, te uspoređeni s poznatim prognostičkim čimbenicima.

*Rezultati:* koncentracije uPA i PAI-1 su značajno više u citosolu diferenciranih karcinoma štitnjače (uPA =  $0,509 \pm 0,767$  i PAI-1 =  $6,337 \pm 6,415$  ng/mg proteina), nego u pripadajućem normalnom tkivu štitnjače (uPA =  $0,237 \pm 0,051$  ng/mg,  $P < 0,001$  i PAI-1 =  $2,368 \pm 0,418$  ng/mg  $P < 0,001$ ). Nađena je značajna pozitivna korelacija promatranih proteina u malignom tumorskom tkivu (Pearson  $r = 0,817$ , Spearman  $\rho = 0,475$ ,  $P < 0,001$ ). Oba proteina su značajno različita u različitim histološkim gradusima ( $P = 0,031$ , odnosno  $P < 0,001$ ), pokazujući više vrijednosti u višim gradusima.

Usporedbom citosola tumora  $> 1$  cm i tumora  $\leq 1$  cm nađene su značajno veće koncentracije uPA ( $P = 0,002$ ) i PAI-1 ( $P = 0,001$ ) u tumorima  $> 1$  cm.

Nađena je značajno veća koncentracija uPA u multicentričnim tumorima ( $P = 0,015$ ), te povišena vrijednost PAI-1 u bolesnika s udaljenim metastazama, u odnosu na one bez metastaza ( $P < 0,001$ ).

uPA i PAI-1 su značajno viši u diferenciranim karcinomima štitnjače ako je prisutna ekstratireoidna invazija ( $P$  za uPA =  $0,015$ ,  $P$  za PAI-1  $< 0,001$ ).

Nije nađena statistički značajna razlika uPA i PAI-1 u uzorcima bolesnika starijih i mlađih od 40 godina, kao niti skupine bolesnika s pozitivnim u usporedbi s onima s negativnim limfnim čvorovima.

Kaplan-Meierove krivulje preživljenja pokazuju značajan utjecaj uPA i PAI-1 na preživljenje bez progresije (PFS) 82,22 vs. 49,478 mjeseci u bolesnika s niskim, odnosno

visokim uPA,  $P < 0,001$ ; te 87,068 vs. 44,964 mjeseci u bolesnika s niskim, odnosno visokim PAI-1;  $P < 0,001$ .

Univarijatnom analizom nađeno je da slijedeće varijable imaju utjecaj na preživljenje bez progresije diferenciranih tumora: spol ( $P = 0,025$ ), veličina tumora ( $P < 0,001$ ), gradus ( $P < 0,001$ ), ekstratireoidna invazija ( $P < 0,001$ ), pozitivni limfni čvorovi ( $P < 0,001$ ), udaljene metastaze ( $P < 0,001$ ), uPA u tumorskom tkivu ( $P < 0,001$ ) i PAI-1 u tumorskom tkivu ( $P < 0,001$ ), dok dob ( $P = 0,56$ ), histološki tip diferenciranih tumora ( $P = 0,206$ ) i multicentričnost tumora ( $P = 0,365$ ) nemaju značajan utjecaj na PFS.

Multivarijatnom analiza potvrdila je da su udaljene metastaze (HR 11,654, 95% CI 1,162-116,898,  $P = 0,037$ ), uPA u tumorskom tkivu (HR 1,987, 95% CI 1,188-3,326,  $P = 0,009$ ) i PAI-1 u tumorskom tkivu diferenciranih tumora (HR 1,131, CI 1,037-1,234,  $P = 0,006$ ) neovisne varijable koje imaju utjecaj na PFS.

*Zaključak:* Povezanost povišenih vrijednosti uPA i PAI-1 u bolesnika s karcinomom štitnjače i standardnih prognostičkih čimbenika lošeg ishoda bolesti, te povezanost uPA i PAI-1 s kraćim preživljenjem bez progresije, ukazuju na prognostički značaj uPA i PAI-1.

## 8. SUMMARY

Higher levels of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1) are linked to the poor prognosis in a variety of malignances. Aim of the present study was to investigate the expression and clinical relevance of uPA and PAI-1 in differentiated thyroid cancer.

*Patients and methods:* Analysis prospectively included 128 patients with thyroid tumors, among them 105 patients with differentiated thyroid carcinoma, 2 patients with anaplastic carcinoma and 21 patient with thyroid adenoma, who underwent surgery between 2002. and 2008. uPA and PAI-1 in paired cytosol samples of thyroid tumor and normal tissue were determined using enzyme-linked immunosorbent assay and correlated to the known prognostic features.

*Results:* Both uPA and PAI-1 concentrations were significantly higher in differentiated thyroid tumors (uPA =  $0.509 \pm 0.767$  and PAI-1 =  $6.337 \pm 6.415$  ng/mg protein) than in normal tissue (uPA =  $0.237 \pm 0.051$ ,  $P < 0.001$  and PAI-1 =  $2.368 \pm 0.418$  ng/mg protein,  $P < 0.001$ ) with positive correlation of the two proteins in the tumors (Pearson  $r = 0.817$ , Spearman  $\rho = 0.475$ ,  $P < 0.001$ ).

Both proteins' concentrations were significantly different among various histological grades (uPA  $P = 0.031$  and PAI-1  $P < 0.001$ ), showing higher values in higher tumor grades.

uPA and PAI-1 were significantly higher if extrathyroidal invasion (uPA  $P = 0.015$ , PAI-1  $P < 0.001$ ) or distant metastases (PAI-1  $P < 0.001$ ) had been present, and in tumors whose size exceeded 1 cm in diameter (uPA  $P = 0.002$  and PAI-1  $P = 0.001$ ). Only uPA, but not PAI-1 was significantly higher in multicentric vs. solitary tumors ( $P = 0.015$ ).

The differences of uPA and PAI-1 did not reach the significant level when patients with differentiated tumors below and above 40 years of age had been compared and in lymph node positive tumors compared to lymph node negative tumors.

Survival analysis revealed the significant impact of both uPA and PAI-1 on the Progression-Free Survival (PFS) (82.22 vs. 49.478 months for patients with low and high



uPA, respectively,  $P < 0.001$ ; 8.068 vs. 44.964 months for patients with low and high PAI-1, respectively,  $P < 0.001$ ).

Univariate analysis showed that sex ( $P = 0.025$ ), tumor size ( $P < 0.001$ ), gradus ( $P < 0.001$ ), extrathyroid invasion ( $P < 0.001$ ), local lymph nodes involvement ( $P < 0.001$ ), distant metastases ( $P < 0.001$ ), uPA ( $P < 0.001$ ) and PAI-1 ( $P < 0.001$ ) were significant predictors of PFS, whereas age ( $P = 0.56$ ), histopathological variant ( $P = 0.206$ ), and multifocality ( $P = 0.365$ ) were not.

Multivariate analysis confirmed that distant metastases ( $P = 0.037$ ), tumor tissue uPA ( $P = 0.009$ ), and PAI-1 ( $P = 0.06$ ) were strong independent predictors of PFS in patients with differentiated thyroid carcinoma.

*Conclusion:* The correlation of high uPA and PAI-1 with the known prognostic factors of poorer outcome and with lower PFS rate in patients with differentiated thyroid cancers proved that these proteins could be an additional prognostic parameter.

## 9. LITERATURA

1. Clark OH. Total thyroidectomy: The treatment of choice for patients with differentiated thyroid cancer. *Ann Surg* 1982; 196:361-370
2. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1998; 48:6-29
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:43-66
4. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the USA, 1985-1995. *Cancer* 1998; 83:2638-2648
5. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12:20-37
6. Albores-Saavedra J, Henson DE, Glazer E, Schwartz AM. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype--papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. *Endocr Pathol* 2007; 18:1-7
7. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74- 108
8. Amdur RJ, Mazzaferri EL. Incidence, prevalence, recurrence, and mortality of differentiated thyroid cancer. U: Amdur RJ, Mazzaferri EL, ur. *Essentials of thyroid cancer management*. New York: Springer; 2005: 123-140
9. Leenhardt L, Bernier MO, Boin-Pineau MH, Conte Devolx B, Maréchaud R, Niccoli-Sire P, Nocaudie M, Orgiazzi J, Schlumberger M, Wémeau JL, Chérie-Challine L, De Vathaire F. Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:133-139
10. Mazzaferri EL i Kloos RT. Clinical review 128: Current Approaches to Primary Therapy for Papillary and Follicular Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1447-63

11. Čupić H, Vučić M. WHO classification of differentiated thyroid carcinoma – recommendation and criteria for histopathological diagnosis. *Acta Clin Croat* 2007; 46 (suppl 2):25-27
12. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Staging systems for papillary thyroid carcinoma: a review and comparison. *Ann Surg* 2007; 245:366-78
13. Tronko MD, Howe GR, Bogdanova TI, Bouville AC, Epstein OV, Brill AB i sur. A cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the chornobyl accident: thyroid cancer in Ukraine detected during first screening. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:897-903
14. Brown HM, Amdur RJ, Mazzaferri EL. Pathology and classification of thyroid carcinoma. U: Amdur RJ, Mazzaferri EL, ur. *Essentials of thyroid cancer management*. New York: Springer; 2005:19-31
15. Mazzaferri EL. Long-term outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma: effect of therapy. *Endocr Pract* 2000; 6:469-76
16. Pellegriti G, Scollo C, Lumera G, Regalbutto C, Vigneri R, Belfiore A. Clinical behavior and outcome of papillary thyroid cancers smaller than 1.5 cm in diameter: study of 299 cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3713-20
17. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M i sur. BRAF<sup>V600E</sup> mutation and the biology of papillary thyroid cancer *Endocr-Rel Cancer* 2008; 15:1-16
18. Hermanek P, Sobin LH. Thyroid gland (ICD-OC73).U: *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6.izd. New York: International Union Against Cancer/Springer-Verlag; 2002
19. Al-Brahim N, Asa SL. Papillary Thyroid Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:1057-62
20. Amdur RJ, Mazzaferri EL. Differentiated thyroid cancer during pregnancy, in a thyroglossal duct, and unfavorable histologic subtypes of DTC. U: Amdur RJ, Mazzaferri EL, ur. *Essentials of thyroid cancer management*. New York: Springer; 2005:345-73

21. Morris LG, Shaha AR, Tuttle RM, Sikora AG, Ganly I. Tall-Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Matched-Pair Analysis of Survival. *Thyroid* 2010; 20(2):153-8
22. Wenig BM, Thompson LD, Adair CF, Shmookler B, Heffess CS. Thyroid papillary carcinoma of columnar cell type: a clinicopathologic study of 16 cases. *Cancer* 1998; 82:740-753
23. Ringel MD, Burman KD, Shmookler BM. Clinical aspects of miscellaneous and unusual types of thyroid cancers. U: Wartofsky L, ur. *Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management*. Totowa NJ: Humana Press Inc.; 2000:428-433
24. Trovato M, Ulivieri A, Dominici R, Ruggeri RM, Vitarelli E, Benvenga S i sur. Clinico-pathological significance of cell-type-specific loss of heterozygosity on chromosome 7q21: analysis of 318 microdissected thyroid lesions. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11:365-76
25. Schlumberger M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *Ann Endocrinol (Paris)* 2007; 68:120-8
26. Lopez-Penabad L, Chiu AC, Hoff AO, Schultz P, Gaztambide S, Ordonez NG, Sherman SI. Prognostic factors in patients with Hürthle cell neoplasms of the thyroid. *Cancer* 2003; 97:1186–1194
27. Herrera MF, Hay ID, Wu PS, Goellner JR, Ryan JJ, Ebersold JR i sur. Hurthle cell (oxyphilic) papillary thyroid carcinoma: a variant with more aggressive biologic behavior. *World J Surg* 1992; 16:669-675
28. Flavo L, Catania A, D'Andrea V, Grilli P, D'Ercole C, De Antoni E. Prognostic factors of insular versus papillary/follicular thyroid carcinoma. *Am Surgeon* 2004; 70:461-466
29. Volante M, Landolfi S, Chiusa L, Palestini N, Motta M, Codegone A, Torchio B, Papotti MG.. Poorly differentiated carcinomas of the thyroid with trabecular, insular, and solid patterns: a clinicopathologic study of 183 patients. *Cancer* 2004; 100(5):950-957

30. Chao TC, Lin JD, Chen MF. Insular carcinoma: infrequent subtype of thyroid cancer with aggressive clinical course. *World J Surg* 2004; 28: 393-396
31. Pellegriti G, Giuffrida D, Scollo C, Vigneri R, Regalbutto C, Squatrito S, Belfiore A. Long-term outcome of patients with insular carcinoma of the thyroid: the insular histotype is an independent predictor of poor prognosis. *Cancer* 2002; 95:2076-85
32. Wells SA, Franz C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. *World J Surg* 2000; 24:952-56
33. Pellegriti G, Leboulleux S, Baudin E, Bellon N, Scollo C, Travagli JP, Schlumberger M. Long-term outcome of medullary thyroid carcinoma in patients with normal postoperative medical imaging. *Br J Cancer* 2003; 88:1537-42
34. Elisei R, Romei C, Cosci B, Agate L, Bottici V, Molinaro E et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4725-9
35. Borson-Chazot F, Causeret S, Lifante JC, M Augros M, Berger N, and JL Peix JL. Predictive factors for recurrence from a series of 74 children and adolescents with differentiated thyroid cancer. *World J Surg* 2004; 28(11):1088-92
36. Mazzaferri EL. Thyroid carcinoma: papillary and follicular. U: Mazzaferri EL, Samaan N, ur. *Endocrine Tumors*. Cambridge: Blackwell Scientific Publications Inc.; 1993:278-333
37. Schlumberger M, Tubiana M, De Vathaire F, Hill C, Gardet P, Travagli JP, Fragu P, Lumbroso J, Caillou B, Parmentier C. Long-term results of treatment of 283 patients with lung and bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:960–967
38. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97:418-428
39. Baudin E, Travagli JP, Ropers J, Mancusi F, Bruno-Bossio G, Caillou B, Cailleux AF, Lumbroso JD, Parmentier C, Schlumberger M. Microcarcinoma of the thyroid gland—The Gustave-Roussy Institute Experience. *Cancer* 1998; 83:553-559.

40. Chow SM, Law SC, Chan JK, Au SK, Yau S, Lau WH. Papillary microcarcinoma of the thyroid-Prognostic significance of lymph node metastasis and multifocality. *Cancer* 2003; 98:31-40
41. Pacini F, Elisei R, Capezzone M, Miccoli P, Molinaro E, Basolo F, Agate L, Bottici V, Raffaelli M, Pinchera A. Contralateral papillary thyroid cancer is frequent at completion thyroidectomy with no difference in low- and high-risk patients. *Thyroid* 2001; 11:877-881
42. Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Distinct multiple *RET/PTC* gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4116-4122
43. Hung W, and NJ Sarlis. Current controversies in the management of pediatric patients with well differentiated non-medullary thyroid cancer: a review. *Thyroid* 2002; 12:683-702
44. Wunderbaldinger P, Harisinghani MG, Hahn PF, Daniels GH, Turetschek K, Simeone J, O'Neill MJ, Mueller PR. Cystic lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178:693-697
45. Mazzaferri EL. Thyroid remnant <sup>131</sup>I ablation for papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 1997; 7:265-271
46. Verburg FA, Mäder U, Luster M, Reiners C. Histology does not influence prognosis in differentiated thyroid carcinoma when accounting for age, tumour diameter, invasive growth and metastases. *Eur J Endocrinol* 2009; 160(4):619-24
47. Greene FL PD, Fleming I, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual*, 6. izd. New York: Springer-Verlag; 2002
48. Lang B, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Restaging of differentiated thyroid carcinoma by the sixth edition AJCC/UICC TNM staging system: stage migration and predictability. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:1551-9
49. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched pair analysis. *Head Neck* 1996; 18:127-32

50. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann Surg Oncol* 1996; 3(6):534-8 (SHAHA 1996)
51. Shaha AR. Controversis in the management of thyroid nodule. *Laryngoscope* 2000; 110 (2):183-193
52. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*, 6.izd. 2002. New York: Springer 22:91-92
53. Cady B, Ross R. An expanded view of risk group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 1988; 104:947-953
54. Cady B. Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition. *Surg Oncol Clin N Am* 1998; 7:633-44
55. Hay ID, Bergstrahl EJ, Goellner JR, Ebersold J, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993; 114:1050-58
56. Voutilainen PE, Siironen P, Franssila KO, Sivula A, Haapiainen RK, Haglund CH. AMES, MACIS and TNM prognostic classifications in papillary thyroid carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23:4283–8
57. Verburg FA, Mäder U, Kruitwagen CL, Luster M, Reiners C. A comparison of prognostic classification systems for differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72(6):830-8
58. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H I sur. European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:787-803
59. Castagna MG, Brillì L, Pilli T, Montanaro A, Cipri C, Fioravanti C i sur. Limited value of repeat recombinant human thyrotropin (rhTSH)-stimulated thyroglobulin testing in differentiated thyroid carcinoma patients with previous negative rhTSH-stimulated thyroglobulin and undetectable basal serum thyroglobulin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:76-81

60. Kebebew E, Ituarte P, Siperstein A, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000; 88: 1139-48
61. Shaha AR. Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope* 2004; 114:393-402
62. de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira Facuri F, Assumpção LV, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology* 2005; 47:391-401
63. Nucera C, Mazzon E, Caillou B, Violi MA, Moleti M, Priolo C i sur. Human galectin-3 immunoexpression in thyroid follicular adenomas with cell atypia. *J Endocrinol Invest* 2005; 28:106-12
64. Saggiorato E, Aversa S, Deandreis D, Arecco F, Mussa A, Puligheddu B i sur. Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas. *J Endocrinol Invest* 2004; 27:311-7
65. Collet JF, Hurbain I, Prengel C, Utzmann O, Scetbon F, Bernaudin JF, Fajac A. Galectin-3 immunodetection in follicular thyroid neoplasms: a prospective study on fine-needle aspiration samples. *Br J Cancer* 2005; 14:1175-81
66. Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R, Johnson SJ, Wilson JA, Davies BR, Lennard TW. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 2004; 45:493-500
67. Trovato M, Villari D, Bartolone L, Spinella S, Simone A, Violi MA i sur. Expression of the hepatocyte growth factor and c-met in normal thyroid, non-neoplastic, and neoplastic nodules. *Thyroid* 1998; 8:125-31
68. Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P i sur. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arc* 2005; 446:589-95
69. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A et al. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in



- papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:455-64
70. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(11):4085-90
71. Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *Int J Surg Pathol* 2002; 10:15-22
72. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific Pattern of RAS Oncogene Mutations in Follicular Thyroid Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 8:2745-52
73. Katalinić D, Solter M. Genska osnova nastanka novotvorbi štitnjače. U: Solter M, ur. *Bolesti štitnjače-klinička tireoidologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007:187-192
74. Buergy D, Weber T, Maurer GD, Mudduluru G, Medved F, Leupold JH, Brauckhoff M, Post S, Dralle H, Allgayer H. Urokinase receptor, MMP-1 and MMP-9 are markers to differentiate prognosis, adenoma and carcinoma in thyroid malignancies. *Int J Cancer* 2009; 125(4):894-901
75. Pacini F, Castagna MG, Brillì L, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. Differentiated thyroid cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009; 20 (Suppl 4):143-6
76. Kusić Z, Jukić T, Dabelić N, Franceschi M. Dijagnostičke i terapijske smjernice za diferencirani karcinom štitnjače Hrvatskog društva za štitnjaču. *Liječn Vjesn* 2008; 130:213-270
77. Elisei R, Schlumberger M, Driedger A, Reiners C, Kloos RT, Sherman SI, Haugen B, et al. Follow-up of low-risk differentiated thyroid cancer patients who underwent radioiodine ablation of postsurgical thyroid remnants after either recombinant human thyrotropin or thyroid hormone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(11):4171-9

78. Pilli T, Brianzoni E, Capocchetti F, Castagna MG, Fattori S, Poggiu A, Rossi G, Ferretti F, Guarino E, Burrioni L, Vattimo A, Cipri C, Pacini F. A comparison of 1850 (50 mCi) and 3700 MBq (100 mCi) <sup>131</sup>I-iodine administered doses for recombinant thyrotropin-stimulated postoperative thyroid remnant ablation in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(9):3542-6
79. Powell C, Newbold K, Harrington KJ, Bhide SA, Nutting CM. External beam radiotherapy for differentiated thyroid cancer. *Clinical Oncology* 2010 (u tisku)
80. Deshpande HA, Gettinger SN, Sosa JA. Novel chemotherapy options for advanced thyroid tumors: small molecules offer great hope. *Curr Opin Oncol* 2008; 20(1):19-24
81. Sherman SI. Advances in chemotherapy of differentiated epithelial and medullary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(5):1493-9
82. Andreasen PA, Kjöllér L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* 1997; 72:1-22
83. Kwaan HC, McMahon B. The role plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res* 2009; 148:43-66
84. Zetter B. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49: 407-14
85. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treatment Reviews* 2008; 34:122-136
86. Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level I evidence studies. *Clin Chem* 2002; 48(8):1194-7
87. Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* 2004; 37: 541-548
88. Swiercz R, Wolfe JD, Zaher A, Jankun J. Expression of the plasminogen activation system in kidney cancer correlates with its aggressive phenotype. *Clin Cancer Res* 1998;4(4):869-77

89. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen i sur. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998;4(8):923-8
90. Thomssen C, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Meisner C, von Minckwitz G i sur. ASCO-recommended prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative (N0) breast cancer patients (pts) compared to clinicopathological risk assessment within the NNBC 3-Europe trial. Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2009 (abstr 544)
91. Thomssen C, Harbeck N, Dittmer J, Abraha-Spaeth SR, Papendick N, Paradiso A, Lisboa B, Jaenicke F, Schmitt M, Vetter M. Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(14):1028-9
92. Lamy PJ, Romieu G, Jacot W. UPA/PAI-1: a tool for breast cancer treatment individualization. Biology, clinical implications and quantification assays. *Bull Cancer* 2010; 97(3):341-8
93. Binder BR, Mihaly J. The plasminogen activator inhibitor “paradox” in cancer. *Immunology letters* 2008; 118:116-124
94. Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink U, Siewerth JR. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 1994; 54(11):2900-7
95. Fuji T, Obara T, Tanno S, Ura H, Kohgo Y. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 as a prognostic factor in human colorectal carcinomas. *Hepatology* 1999; 46(28):2299-308
96. Konecny G, Untch M, Pihan A, Kimmig R, Gropp M, Stieber P, Hepp H, Slamon D, Pegram M. Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1743-9

97. Steiner E, Pollow K, Hasenclever D, Schormann W, Hermes M, Schmidt M, Puhl A, Brulport M, Bauer A, Petry IB, Koelbl H, Hengstler JG. Role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) for prognosis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 108(3):569-76
98. Salden M, Splinter TA, Peters HA, Look MP, Timmermans M, van Meerbeeck JP, Foekens JA: The urokinase-type plasminogen activator system in resected non-small-cell lung cancer. Rotterdam Oncology Thoracic Study Group. *Ann Oncol* 2000; 11(3):327-32
99. Pedersen H, Brunner N, Francis D, Osterlind K, Ronne E, Hansen HH, Dano K, Grondahl-Hansen J. Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res* 1994; 54(17):4671-5
100. Hofmann R, Lehmer A, Buresch M, Hartung R, Ulm K. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 1996; 78:487-92
101. Gupta A, Lotan Y, Ashfaq R, Roehrborn CG, Raj GV, Aragaki CC, Montorsi F, Shariat SF. Predictive value of the differential expression of the urokinase plasminogen activation axis in radical prostatectomy patients. *Eur Urol* 2009; 55: 1124-1134
102. Stabuc B, Marković J, Bartenjev I, Vrhovec I, Medved U, Kocijančić B. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 in stage I malignant melanoma. *Oncol Rep* 2003; 10(3):635-9
103. Taubert H, Würfl P, Greither T, Kappler M, Bache M, Lautenschläger C, Füssel S, Meye A, Eckert AW, Holzhausen HJ, Magdolen V, Kotsch M. Co-detection of members of the urokinase plasminogen activator system in tumour tissue and serum correlates with a poor prognosis for soft-tissue sarcoma patients. *Br J Cancer* 2010; 102(4):731-7
104. Schmitt M, Harbeck N, Thomsen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H. Clinical impact of the plasminogen activation

- system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 1997; 78:285-296
105. Smit JW, van der Pluijm G, Romijn HA, Löwik CW, Morreau H, Goslings BM. Degradation of extracellular matrix by metastatic follicular thyroid carcinoma cell lines: role of the plasmin activation system. *Thyroid* 1999; 9: 913-919
106. Ito Y, Takeda T, Kobayashi T, Wakasugi E, Tamaki Y, Umeshita K. i sur. Plasminogen activation system is active even in thyroid tumors: An immunohistochemical study. *Anticancer Res* 1996; 16:81-90
107. Zanetti A, Stoppacciaro A, Marzullo A, Ciabatta M, Fazioli F, Prat M, Comoglio PM, Baroni CD, Ruco LP. Expression of Met protein and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPA-R) in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol.* 1998; 186(3): 287-91
108. Chu QD, Hurd TC, Harvey S, Martinick M, Markus G, Tan D, Gibbs JF, Loree T. Overexpression of urinary plasminogen activator (uPA) protein and mRNA in thyroid carcinogenesis. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13(4):241-6
109. Kim SJ, Shiba E, Taguchi T, Tsukamoto F, Miyoshi Y, Tanji Y, Takai S, Noguchi S. uPA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. *Anticancer Res* 2002; 22(1A):387-93
110. Ulisse S, Baldini E, Toller M, Giacomelli L, De Antoni E, Ferretti E i sur. Differential expression of the components of the plasminogen activating system in human thyroid tumour derived cell lines and papillary carcinomas. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2631-8
111. EORTC Breast Cancer Cooperative Group Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1980; 16: 81-90
112. Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Prechtel A, Graeff H. Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res* 1994; 54: 2527-2530

113. Shaha AR. Prognostic factors in papillary thyroid carcinoma and implications of large nodal metastasis. *Surgery* 2004; 135:237-9
114. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol* 2010; 22:395-404
115. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(1): 25-40
116. McMahon B, Kwaan HC. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol haemost Thromb* 2008; 36(3-4): 184-94
117. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Staging systems for follicular thyroid carcinoma: application to 171 consecutive patients treated in a tertiary referral centre. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14:29-42
118. Pešutić-Pisac V, Punda A, Glunčić I, Bedeković V, Pranić-Kragić A, Kunac N. Cyclin D1 and p27 expression as prognostic factor in papillary carcinoma of thyroid: association with clinicopathological parameters *Croat Med J* 2008; 49(5): 643-9
119. Podnos YD, Smith D, Wagman LD, Ellenhorn JD. The implication of lymph node metastasis on survival in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Am Surg* 2005; 71: 731-4
120. Zaydfudim V, Feurer ID, Griffin MR, JE Phay. The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Surgery* 2008; 144(6): 1070-1078
121. Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implications for prognosis and therapy. *Cancer Metast Rev* 2003; 22: 205–222
122. Saad ED, Katz A, Hoff PM, Buyse M. Progression-free survival as surrogate and as true end point: insights from the breast and colorectal cancer literature. *Annals of Oncology* 2010; 21: 7-12
123. Jukkola A, Bloigu R, Ebeling T, Salmela P, Blanco G. Prognostic factors in differentiated thyroid carcinomas and their implications for current staging classifications. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11(3):571-9

124. Horvatić Herceg G, Herceg D, Kralik M, Bence-Zigman Z, Tomić-Brzac H, Kulić A. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in thyroid neoplasms: a cytosol study. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118(19-20):601-9
125. De Cremoux P, Grandin L, Dieras V, Savignoni A, Degeorges A, Salmon R i sur. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients. *Anticancer Res* 2009; 29(5): 1475-82
126. Soyuk O, Selcukbiricik F, Erbil Y, Bozbora A, Kapran Y, Ozbey N. Prognostic factors in patients with papillary thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2008; 31(11): 1032-7
127. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9(1): 32-71
128. Mekkawy AH, Morris DL, Pourgholami MH. Urokinase plasminogen activator system as a potential target for cancer therapy. *Future Oncol* 2009; 5(9): 1487-99
129. Nowicki TS, Kummer NT, Iacob C, Suslina N, Schaefer S, Schantz S, Shin E, Moscatello AL, Tiwari RK, Geliebter J. Inhibition of uPAR and uPA reduces invasion in papillary thyroid carcinoma cells. *Laryngoscope* 2010; 120(7): 1383-90

## 10. ŽIVOTOPIS

Rodena 21. prosinca 1961. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu (V gimnaziju).

Diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1988. godine. Tijekom studija obavljala dužnost demonstratora na Katedri za histologiju i Katedri za patologiju. Obavezan pripravnički liječnički staž odradila u KB "Sveti Duh", a državni ispit položila 1989. godine.

Od 1989.-1990. pohađala i završila poslijediplomski studij „Ultrazvuk u kliničkoj medicini, gastroenterologiji i hepatologiji“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 1994.-1995. pohađala i završila poslijediplomski studij „Nuklearna medicina“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Magistrirala 1996. godine s temom „Promjene u ehografskoj strukturi i funkcionalnom statusu štitnjače kod povišenog i smanjenog unosa joda u ljudski organizam“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Od 1992. zaposlena u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb, prvo u svojstvu znanstvenog novaka.

Od 1994.-1997. specijalizirala nuklearnu medicinu u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb, a specijalistički ispit položila 1997. godine, te od tada radi u navedenom Zavodu.

Do sada objavila više znanstvenih publikacija od kojih se 4 citiraju u Current Contentsu.

Član je Hrvatskog liječničkog društva, Hrvatskog društva za nuklearnu medicinu, Hrvatskog društva za štitnjaču, Hrvatskog društva za primjenu ultrazvuka u medicini i biologiji, Hrvatskog katoličkog liječničkog društva, Europskog društva za medicinsku onkologiju (ESMO), te Europskog društva za ultrazvuk u medicini i biologiji (EFSUMB).

Aktivno se služi engleskim jezikom.

Majka je dvoje djece.