

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Nina Dabelić

**Ekspresija gena za protein visoke
pokretljivosti 2 skupine A (HMGA2) u
diferenciranim karcinomima i
benignim bolestima štitnjače**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nina Dabelić

**Ekspresija gena za protein visoke
pokretljivosti 2 skupine A (HMGA2) u
diferenciranim karcinomima i
benignim bolestima štitnjače**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvonko Kusić

Zahvaljujem svome mentoru, akademiku Zvonku Kusiću, na svekolikoj potpori u
provođenju ovoga istraživanja, na vjeri u mene, na životnim mudrostima.

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli tijekom istraživanja:
prof. dr. sc. Josipu Lukaču i doc. dr. sc. Ivanu Šamiji,
predstojniku Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ KBC-a „Sestre
milosrdnice“, dr. sc. Moniki Ulamec i zdravst.-lab. tehn. Deniri Oslaković,
doc. dr. sc. Milanu Miloševiću,
svim suradnicima iz laboratorija, osobito bacc. med. tech. Vlatki Vračić i
bacc. med. tech. Željki Rakvin.

Hvala svim kolegama, suradnicima i prijateljima.

I na kraju, ali najznačajnije, zahvaljujem svojoj obitelji - roditeljima na bezuvjetnoj i
neizmjerne podršci i ljubavi, a svojoj sestri, izv. prof. dr. sc. Sanji Dabelić, na
sestrinskoj potpori, ali i iznimnom znanstvenom i stručnom doprinosu ovom
istraživanju i radu.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD	1
1.1. Neoplazme štitnjače	1
1.1.1. Diferencirani karcinomi štitnjače	1
1.1.1.1. Epidemiologija diferenciranih karcinoma štitnjače	1
1.1.1.2. Etiološki čimbenici za razvoj diferenciranih karcinoma štitnjače	3
1.1.1.3. Patohistološka obilježja diferenciranih karcinoma štitnjače	5
1.1.1.3.1. Patohistološka obilježja papilarnih karcinoma štitnjače	5
1.1.1.3.2. Patohistološka obilježja folikularnih karcinoma štitnjače.....	8
1.1.1.4. Klinička slika diferenciranih karcinoma štitnjače	10
1.1.1.5. Dijagnostičke metode kod diferenciranih karcinoma štitnjače	10
1.1.1.5.1. Laboratorijske metode kod diferenciranih karcinoma štitnjače	10
1.1.1.5.2. Ultrasonografija kod diferenciranih karcinoma štitnjače	11
1.1.1.5.3. Citološka punkcija štitnjače – FNA (engl. <i>fine needle aspiration</i>)	12
1.1.1.5.4. Scintigrafija cijelog tijela ¹³¹ I kod diferenciranih karcinoma štitnjače	13
1.1.1.5.5. PET/CT kod diferenciranih karcinoma štitnjače.....	15
1.1.1.5.6. CT i MR kod diferenciranih karcinoma štitnjače.....	15
1.1.1.6. Liječenje diferenciranih karcinoma štitnjače	16
1.1.1.6.1. Kirurško liječenje diferenciranih karcinoma štitnjače.....	16
1.1.1.6.2. Liječenje radioaktivnim jodom diferenciranih karcinoma štitnjače.....	16
1.1.1.6.2.1. Ablacija ostatnog tkiva na vratu.....	16
1.1.1.6.2.2. Liječenje hematogenih metastaza diferenciranih karcinoma štitnjače radioaktivnim jodom	17
1.1.1.6.3. Supresija TSH u liječenju diferenciranih karcinoma štitnjače	18
1.1.1.6.4. Radioterapija vanjskim snopovima i ostali lokalni oblici liječenja diferenciranih karcinoma štitnjače.....	19
1.1.1.6.5. Standardna kemoterapija u liječenju diferenciranih karcinoma štitnjače.....	20
1.1.1.6.6. Ciljana terapija u liječenju diferenciranih karcinoma štitnjače	21
1.1.1.7. Prognostički čimbenici i sustavi stupnjevanja diferenciranih karcinoma štitnjače	22

1.1.1.7.1. Prognostički čimbenici.....	22
1.1.1.7.2. Sustavi stupnjevanja.....	24
1.1.2. Adenomi štitnjače.....	30
1.2. Proteini visoke pokretljivosti A, HMGA (engl. <i>High Mobility Group A</i>)	31
1.2.1. Struktura gena <i>HMGA</i> i proteina HMGA	31
1.2.2. Uloga HMGA u nastanku nekih neneoplastičnih bolesti.....	36
1.2.3. Uloga HMGA u nastanku novotvorina	36
1.2.3.1. Uloga HMGA kod drugih zloćudnih novotvorina	38
1.2.3.2. Ekspresija HMGA i zloćudne novotvorine štitnjače.....	41
2. HIPOTEZA.....	45
3. CILJEVI RADA	46
4. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE	47
4.1. Ispitanici.....	47
4.2. Prikupljanje uzoraka i podataka	48
4.3. Uzgoj stanične kulture.....	49
4.4. Izolacija ukupne RNA iz stanica stanične linije FTC-133.....	50
4.5. Izolacija ukupne RNA iz tkiva uklopljenog u parafin.....	50
4.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i čistoće izolirane ukupne RNA.....	51
4.7. Određivanje čistoće i integriteta izolirane ukupne RNA elektroforezom u agaroznom gelu s formaldehidom.....	51
4.8. Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. <i>qRT-PCR, quantitative reverse transcription- real-time polymerase chain reaction</i>) ..	52
4.4. STATISTIČKA ANALIZA	55
5. REZULTATI	56
5.1. Razina ekspresije gena <i>HMGA2</i> kod zloćudnih (diferenciranih karcinoma) i dobroćudnih (folikularnih adenoma) neoplazmi štitnjače te nodoznih struma	56
5.2. Razina ekspresije gena <i>HMGA2</i> između različitih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače u ovisnosti o njihovoj kliničkoj uznapredovalosti	58
5.3. Razina ekspresije gena <i>HMGA2</i> između različitih podskupina bolesnika prema njihovim demografskim obilježjima.....	60
5.4. Razina ekspresije gena <i>HMGA2</i> kod diferenciranih karcinoma štitnjače u ovisnosti o prisutnim patohistološkim čimbenicima bolesti.....	62

5.5. Razina ekspresije gena <i>HMGA2</i> kod diferenciranih karcinoma štitnjače u ovisnosti o klinički rizičnim podskupinama, provedenom liječenju i odgovoru na njega, te kliničkom tijeku i ishodu bolesti	86
6. RASPRAVA	103
7. ZAKLJUČCI	115
8. SAŽETAK	117
9. SUMMARY	118
10. LITERATURA	119
11. ŽIVOTOPIS	144

POPIS OZNAKA I KRATICA

AGES	prognostički sustav za PKŠ koji se temelji na dobi bolesnika, gradusu tumora, proširenosti, uključujući lokalnu invaziju i udaljene metastaze, te veličini primarnog tumora (engl. <i>Age, Grade, Extend, Size</i>)
AJCC	Američka združena komisija za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
AJCC/UICC	zajednička klasifikacija zloćudnih tumora po AJCC i UICC
AMES	prognostički sustav za DKŠ koji se temelji na dobi bolesnika, udaljenim metastazama, proširenosti i veličini primarnog tumora (engl. <i>Age, Metastases, Extend, Size</i>)
AP1	aktivatorski protein 1 – transkripcijski faktor za više gena
ATA	Američko društvo za štitnjaču (engl. <i>American Thyroid Association</i>)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i>)
BRAF	oznaka gena (protoonkogen) <i>BRAF</i> (engl. <i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>), B-tip RAF-kinaze; kodira za protein B-Raf
BRAF V600E	oznaka gena (ili protoonkogen) <i>BRAF</i> (engl. <i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>), B-tip RAF-kinaze V600E
ca.	karcinom
CD	obojeni Doppler – vrsta UZV-metode (engl. <i>Color-Doppler</i>)
c-KIT	protoonkogen, protein tirozin-kinaznog receptora, kodiran <i>KIT</i> -genom
cRNA	komplementarna ribonukleinska kiselina (engl. <i>complementary ribonucleic acid</i>)
CT	kompjuterizirana tomografija (engl. <i>computed tomography</i>)
DKŠ	diferencirani karcinom štitnjače
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)

EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
EORTC	Europska organizacija za istraživanje i liječenje raka (engl. <i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>)
ERT	eksterna radioterapija, radioterapija vanjskim snopovima
ETA	Europsko društvo za štitnjaču (engl. <i>European Thyroid Association</i>)
ETE	ekstratireoidna ekstenzija, proboj čahure štitnjače
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drugs Administration</i>)
¹⁸FDG-PET-CT	pozitronska tomografija provedena pomoću fluorodeoksiglukoze u kombinaciji s kompjuteriziranom tomografijom (engl. <i>¹⁸F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography - computed tomography</i>)
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (engl. <i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FKŠ	folikularni karcinom štitnjače
FNA	citološka punkcija (engl. <i>Fine Needle Aspiration</i>)
FLT3	vrsta tirozin-kinaze iz fetalne jetre (engl. <i>Fetal Liver Tyrosine Kinase 3</i>)
FTC-133	vrsta stanične kulture humanog folikularnog karcinoma štitnjače (engl. <i>follicular thyroid carcinoma</i>)
FVPKŠ	folikularna varijanta papilarnog karcinoma štitnjače
Gy	<i>Gray</i> – SI-jedinica apsorbirane radijacijske doze
HER2 (ERBB2)	receptor za epidermalni čimbenik rasta 2 (engl. <i>Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2</i>)
HDAC1	histon-deacetilaza 1
HDŠ	Hrvatsko društvo za štitnjaču

HKŠ	Hürthleov karcinom štitnjače, karcinom štitnjače Hürthleovih stanica
HMG	skupina proteina visoke pokretljivosti (engl. <i>High Mobility Group</i>)
HMGA	skupina proteina visoke pokretljivosti A (engl. <i>High Mobility Group A</i>)
HMGA1	skupina proteina visoke pokretljivosti A1 (engl. <i>High Mobility Group A1</i>)
HMGA1a	skupina proteina visoke pokretljivosti A1a (engl. <i>High Mobility Group A1a</i>); prethodno zvani HMGI
HMGA1b	skupina proteina visoke pokretljivosti A1b (engl. <i>High Mobility Group A1b</i>); prethodno zvani HMGY
HMGA2	skupina proteina visoke pokretljivosti A2 (engl. <i>High Mobility Group A2</i>); prethodno zvani HMGI-C
HMGA2-IGF2BP2-NRAS	signalni put u koji je uključen HMGA2 (HMGA2-IGF2BP2-NRAS)
HMGI	vidjeti pod HMGA1a
HMGI-C	vidjeti pod HMGA2
HMGY	vidjeti pod HMGA1b
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
¹²³I	radioizotop joda – jod - 123
¹³¹I	radioizotop joda – jod – 131, radioaktivni jod, radiojod, RAI
IMP3	gen (engl. <i>insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3</i>)
kDa	kiloDalton – atomska jedinica mase
KiMSV	mišji virus Kirstenovog sarkoma (engl. <i>Kirsten murine sarcoma virus</i>)
LČ	limfni čvor(ovi)

let-7	vrsta mikro-ribonukleinske kiseline (engl. <i>letal-7</i>)
LT4	levotiroksin
L-tiroksin	levotiroksin
MACIS	prognostički sustav za PKŠ koji uzima u obzir metastaze, dob bolesnika, cjelovitost kirurškog zahvata, ekstratireoidnu invaziju i veličinu primarnog tumora (engl. <i>Metastases, Age, Completeness of surgery, Invasion, Size</i>)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPK/ERK/AKT	signalni put koji uključuje protein-kinazu aktiviranu mitogenima (MAPK, engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>), izvanstaničnu signalno reguliranu kinazu (ERK, engl. <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>) i serin/treonin-kinazu AKT
mCi	mjerna jedinica radioaktivnosti – mili-Curie (izvan SI-sustava)
miRNA	mikro-ribonukleinska kiselina (engl. <i>micro-ribonucleic acid</i>)
mikroPKŠ	papilarni mikrokarcinom štitnjače
MR	magnetska rezonancija
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NIFTP	neinvazivna folikularna neoplazma štitnjače s papilama sličnim jezgrenim osobinama (engl. <i>noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features</i>)
NOS	bez posebnih obilježja (engl. <i>Not Otherwise Specified</i>)
NP	nije primjenjivo
npl.	neoplazma, novotvorina
NRAS	gen, engl. <i>rat sarcoma</i>

NSCLC	karcinomi pluća nemalih stanica (engl. <i>non-small cell lung cancer</i>)
p53	tumor-supresorski gen, „čuvar genoma“ (engl. <i>protein 53</i>)
PDGF	čimbenik rasta koji proizlazi iz trombocita (engl. <i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PDGFR- α	receptor za PDGF α (engl. <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor α</i>)
PDGFR-B	receptor za čimbenik rasta trombocita B (engl. <i>Platelet Derived Growth Factor B</i>)
PAX8- PPARγ	fuzijski protein kod folikularnih karcinoma štitnjače
PH	patohistološki
PHD	patohistološka dijagnoza
PI3K	fosfatidil-inozitol-3-kinaza
PIK3CA	vrsta gena (engl. <i>Phosphatidylinositol 3-kinase Catalytic Subunit Alpha</i>)
PKŠ	papilarni karcinom štitnjače
qRT-PCR	reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. <i>quantitative reverse transcription- real-time polymerase chain reaction</i>)
RAI	radioaktivni jod, radiojod, isto što i ^{131}I
RAF	vrsta kinaza (engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)
RAS	skupina onkogeni (engl. <i>rat sarcoma</i>)
RET	protoonkogen (engl. <i>rearranged during transfection</i>)
RET/PTC	rearanžman gena <i>RET</i>
rh-TSH	rekombinantni humani TSH
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)

SAD	Sjedinjene Američke Države
SEER	program Američkog nacionalnog instituta za rak (engl. <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>)
TF	transkripcijski čimbenik (engl. <i>transcription factor</i>)
Tg	tireoglobulin
Tg-At	antitireoglobulinska protutijela (engl. <i>Thyroglobulin Antibodies</i>)
TGF	transformirajući čimbenik rasta (engl. <i>transforming growth factor</i>)
tm	tumor
TNM	klasifikacija stadija tumora (engl. <i>Tumor-Node-Metastasis</i>)
TSH	tireostimulirajući hormon, tireotropin (engl. <i>thyroid-stimulating hormone</i>)
UICC	Međunarodno udruženje protiv raka (franc. <i>Union Internationale Contre Le Cancer</i>)
UZV	ultrazvuk
VEGF	čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR-1 i -2	receptor za čimbenik rasta vaskularnog endotela tipa 1- i 2- (engl. <i>vascular endothelial growth factor receptor 1- and 2-</i>)

1. UVOD

1.1. Neoplazme štitnjače

Novotvorine, ili kako ih još nazivamo, neoplazme, odnosno tumori štitnjače dijele se na dobroćudne i zloćudne. Jedan od najvećih problema i izazova u predoperacijskoj dijagnostici štitnjače jest upravo razlikovanje dobroćudnih (benignih) od zloćudnih (malignih) novotvorina. Velika većina zloćudnih neoplazmi štitnjače spada u skupinu dobro diferenciranih karcinoma folikularnog epitela, kamo ubrajamo papilarne i folikularne karcinome štitnjače, koji u velikom postotku bolesnika imaju dobru, čak odličnu prognozu. Međutim, kod malog udjela diferenciranih karcinoma štitnjače nastupi hematogena diseminacija bolesti u udaljena sijela, što, u najgorem slučaju, može dovesti do smrti bolesnika. Identificiranje bolesnika s dobrom prognozom naspram onih kod kojih će nastupiti diseminacija bolesti omogućilo bi agresivniji terapijski pristup te češća i opsežnija praćenja kod potonjih, uz istovremeno izbjegavanje pretjerane dijagnostičke obrade i prekomjernog liječenja kod bolesnika s dobrom prognozom i indolentnim tijekom bolesti. Zadnjih desetljeća pokušavaju se identificirati i određeni molekularni biljezi iz tumorskog tkiva koji bi omogućili identificiranje bolesnika s dobro diferenciranim karcinomima štitnjače koji su pod povećanim rizikom, bilo od lokalnog/lokoregionalnog povrata bolesti, a osobito pod povećanim rizikom od hematogene diseminacije bolesti.

1.1.1. Diferencirani karcinomi štitnjače

1.1.1.1. Epidemiologija diferenciranih karcinoma štitnjače

Čvorovi u štitnjači su oko četiri puta češći u žena nego u muškaraca. Učestalost palpabilnih čvorova povećava se tijekom života, te u dobi od 50 godina i više doseže prevalenciju od oko 5% u populaciji SAD-a (1, 2). Još je veća učestalost čvorova u štitnjači utvrđena tijekom obdukcija ili operativnih zahvata, ili ukoliko se provodi ultrazvučni pregled (UZV). U čak do 50% štitnjača analiziranih ultrazvučno utvrđeni su čvorovi, gotovo uvijek dobroćudni. Novi čvorovi u štitnjači nastaju stopom od oko 0,1% godišnje, počevši već od rane dobi. Međutim, nakon izloženosti ionizirajućem zračenju područja glave i vrata, čvorovi u štitnjači nastaju puno češće, stopom od oko 2% godišnje (3).

Za razliku od čvorova, karcinomi štitnjače su rijetki, te spadaju u rijetke zloćudne tumore. Sveukupno čine oko 1% svih zloćudnih novotvorina (4). Međutim, unatoč tome, karcinomi štitnjače spadaju u najčešće endokrine zloćudne novotvorine (>90% svih endokrinih malignoma).

Prema zadnjim službenim podacima Registra za rak HZJZ, u Republici Hrvatskoj je godine 2013. dijagnosticirano 574 novooboljelih od raka štitnjače, 431 žena i 143 muškarca (5), što čini incidenciju od 13,4/100.000 stanovnika (6,9/100.000 muškaraca i 19,4/100.000 žena). Rak štitnjače je 2013. godine, zajedno s karcinomom želuca, bio na 7. mjestu po učestalosti u žena u Hrvatskoj. U dobnim skupinama djevojčica od 10 do 19 godina te mladih žena u dobi od 20 do 29 godina bio je na prvom mjestu po učestalosti, te na drugom mjestu kod žena u dobi 30 - 39 godina i 40 - 49 godina. Kod muškaraca, rak štitnjače bio je na drugom mjestu po učestalosti u dobi od 20 do 29 godina, te od 30 do 39 godina.

Epidemiološki podaci u svijetu slični su onima u Hrvatskoj. Vrhunac incidencije je s 49 godina života (4), ali postoji značajan broj bolesnika s juvenilnim, prvenstveno papilarnim karcinomima štitnjače. U dobnoj skupini od 15 do 24 godine, na karcinome štitnjače otpada 7,5% do 10% svih zloćudnih tumora (6-8).

Incidencija raka štitnjače zadnjih desetljeća kontinuirano raste (9), no bez porasta mortaliteta, koji iznosi oko 0,5/100 000. Od 1950. do 2004. godine, incidencija karcinoma štitnjače porasla je gotovo 310%.. Stope mortaliteta od karcinoma štitnjače prilagođene prema dobi i spolu stabilne su tijekom niza godina, te iznose oko 0,5/100 000, za razliku od ostalih solidnih zloćudnih tumora kod odraslih, gdje one značajno padaju (10). Razlog porasta incidencije u cijelom svijetu je nejasan, i po nekima je riječ samo o otkrivanju većeg broja okultnih karcinoma štitnjače, tzv. incidentaloma (11, 12), kao rezultat poboljšanje dijagnostike i većeg broja pretraga, osobito ultrazvuka vrata, no neki misle da je riječ o stvarnom porastu uzrokovanom okolišnim čimbenicima. Porast incidencije prvenstveno je nastao dijagnosticiranjem većeg broja papilarnih karcinoma štitnjače. Papilarni karcinomi štitnjače (PKŠ) čine oko 85% svih malignih bolesti štitnjače, a folikularni karcinomi štitnjače (FKŠ) čine oko 11% svih malignih bolesti štitnjače. I PKŠ i FKŠ nastaju od folikularnih stanica štitnjače, osjetljivi su na stimulaciju s TSH, nakupljaju jod i sintetiziraju tireoglobulin (Tg). Stoga, premda su PKŠ i FKŠ zasebni patološki entiteti, njihove biološke, kao i kliničke osobine i ishod slični su ukoliko ne nastupi hematogena diseminacija bolesti, pa je i pristup njihovu liječenju istovjetan. Stoga se o njima skupno govori kao o diferenciranim karcinomima štitnjače (DKŠ), jer njihove stanice, premda maligno promijenjene, pokazuju u

određenoj mjeri sposobnost metaboliziranja joda, poput normalnih folikularnih stanica (tirociti). Ova njihova značajka ključna je za liječenje i postoperacijsko scintigrafsko praćenje koji se temelje na radioaktivnom izotopu joda, ¹³¹I.

Diskrepancija koja postoji između učestalosti karcinoma štitnjače (više od 90% malignih tumora endokrinih žlijezda) i smrtnosti koja nastupa kao njihova posljedica (oko 65% smrtnosti uzrokovanih malignim endokrinih tumorima) upućuje na njihov najčešće spori rast, povoljan tijek i dugotrajno preživljenje.

Učestalost pojedinih patohistoloških tipova diferenciranih karcinoma štitnjače ovisi o unosu joda na razini populacije. U područjima s dostatnim i povećanim unosom joda, veći je udio papilarnih karcinoma štitnjače, oko 80%, a udio folikularnih karcinoma štitnjače iznosi 10-15%. Međutim, u zemljopisnim područjima s nedostatnim unosom joda, učestalost FKŠ značajno raste te iznosi oko 25-30% svih karcinoma štitnjače. Svega 3% bolesnika ima prisutne hematogene presadnice u trenutku postavljanja dijagnoze, a ukupno će ih u nekom trenutku tijekom života dobiti oko 10% bolesnika s DKŠ. Procjena je da će oko 20% bolesnika koji u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lokoregionalno proširenu bolest, razviti udaljene metastaze u nekom trenutku tijekom života (13). Udaljene metastaze najčešće nastaju u plućima, potom u kostima, a rjeđe u drugim sijelima. Takvi bolesnici ipak imaju 5-godišnje preživljenje oko 50% zbog osjetljivosti metastaza na terapiju radioaktivnim jodom (14).

Oko 50% malignih čvorova otkrije se tijekom rutinskog fizikalnog pregleda ili kao slučajan nalaz kod neke slikovne pretrage ili operacije štitnjače zbog drugih, benignih uzroka. Ostalih 50% malignih čvorova otkrije sam bolesnik.

Zbog tipično indolentnog tijeka bolesti diferenciranih karcinoma štitnjače, dijagnoza se ponekad postavi i kasno, u uznapredovaloj fazi bolesti, što može imati negativan učinak na prognozu (15).

1.1.1.2. Etiološki čimbenici za razvoj diferenciranih karcinoma štitnjače

Izloženost ionizirajućem zračenju jedini je poznati čimbenik okoliša koji uzrokuje karcinome štitnjače, obično papilarne. Štitnjača u djece osobito je osjetljiva na ionizirajuće zračenje. Dječja štitnjača jedan je od organa pod najvećim rizikom za nastanak zloćudne novotvorine. Štitnjača je jedini organ gdje rizik za razvoj raka postoji već kod oko 0,10 Gy apsorbirane doze zračenja (3). Rizik od radijacijski induciranog karcinoma štitnjače veći je

kod ženskog spola, nekih populacija Židova, te kod bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom na karcinom štitnjače (16). Navedeno ukazuje i na značaj genetičkih čimbenika u razvoju karcinoma štitnjače. Počevši od unutar pet godina od izloženosti ionizirajućem zračenju u djetinjstvu, novi čvorovi u štitnjači nastaju stopom od oko 2% godišnje, uz vrh incidencije unutar 30 godina od zračenja, ali uz postojanje rizika i unutar 40 godina od izloženosti ionizirajućem zračenju (3).

Kod odraslih je rizik od nastanka karcinoma štitnjače nakon izloženosti ^{131}I vrlo mali (17). Nakon nesreće u nuklearnom reaktoru u Černobilu godine 1986., kod mnoge djece i adolescenata razvio se papilarni karcinom štitnjače nakon što su bili izloženi ^{131}I (18). Stoga je nakon nesreće u nuklearnom reaktoru u Fukushimi odlučeno da se sva djeca mlađa od 19 godina u trenutku nesreće, koja su potencijalno bila izložena zračenju, moraju podvrgavati redovitim probirima na DKŠ (19). Postalo je razvidno da su ^{131}I i drugi kratkoživi radioizotopi joda potencijalni karcinogeni za štitnjaču kod te djece, osobito onih mlađih od 10 godina u trenutku izloženosti (20). Nedostatak joda povećava rizik od radijacijski inducirano karcinoma štitnjače (21). Premda radijacijski inducirani PKŠ histološki djeluje agresivnije i ima visoke stope povrata bolesti, prognoza za preživljenje bolesnika je slična onoj kod karcinoma koji nisu inducirani zračenjem (22-24). Nedostatak joda povezan je s većom učestalošću folikularnih i anaplastičnih karcinoma štitnjače.

Molekularna patogeneza

Kod 80% papilarnih karcinoma štitnjače otkrivene su aktivirajuće mutacije gena koji kodiraju za signalne molekule MAPK-signalnog puta, koje se smatraju inicijacijskim događajem u nastanku PKŠ. Ovo uključuje tzv. rearanžmane RET-a, nazvane rearanžmanima RET/PTC-a, kao i točkaste mutacije RAS-a i BRAF-a, s time da prisutnost jedne mutacije u primarnom tumoru isključuje prisutnost druge (tj. među njima nema preklapanja). Rearanžmani RET/PTC-a češći su kod klasičnog oblika PKŠ, dok su mutacije gena RAS češće u folikularnim varijantama papilarnog karcinoma štitnjače, a mutacije BRAF-a kod papilarnih karcinoma visokih stanica. Mutacije BRAF-a često se povezuju s nepovoljnijim kliničkim tijekom PKŠ. Kod folikularnih karcinoma glavne genetske abnormalnosti su mutacije RAS-a i rearanžmani PPAR γ -PAX8. Kod FKŠ nisu nađene mutacije RET/PTC niti BRAF. Kod slabo diferenciranih karcinoma štitnjače, mutacija NRAS otkrivena je u 25% slučajeva (25, 26). Fosfatidil-inozitol-3-kinazni (PI3K) signalni put može također ponekad biti aktiviran kod papilarnih i folikularnih karcinoma (27, 28), te je nastanak dodatnih

mutacija i amplifikacija gena koji aktiviraju ovaj signalni put čest događaj kod slabo diferenciranih karcinoma štitnjače (29-31). Ovi podaci dobiveni su iz primarnih karcinoma štitnjače, dok su istraživanja na tkivu metastaza još uvijek oskudna.

Različiti vaskularni endotelni čimbenici rasta (VEGF) i receptori za VEGF (VEGFR-1 i VEGFR-2), kao i receptori za čimbenik rasta fibroblasta (FGF) te čimbenik rasta koji proizlazi iz trombocita (PDGF), često pokazuju prekomjernu ekspresiju u vaskularnom endotelu tkiva raka štitnjače, što je također okidač za MAPK-signalni put (32, 33). Angiogeneza, dakle, predstavlja još jednu potencijalnu metu za ciljanu terapiju. U eksperimentalnim modelima, VEGF-terapija koči rast diferenciranih karcinoma štitnjače (34).

1.1.1.3. Patohistološka obilježja diferenciranih karcinoma štitnjače

Velika većina karcinoma štitnjače su dobro diferencirani karcinomi folikularnog epitela. U dobro diferencirane karcinome folikularnog epitela ubrajamo papilarne karcinome i folikularne karcinome sa svim njihovim patohistološkim varijantama.

1.1.1.3.1. Patohistološka obilježja papilarnih karcinoma štitnjače

Papilarni karcinomi štitnjače čine oko 80% zloćudnih novotvorina štitnjače. Makroskopski je riječ uglavnom o solidnim, glatkim čvorovima, koji su obično bez čahure ili su samo djelomično očahureni, no u 8-13% slučajeva makroskopski se registrira inkapsulirani papilarni karcinom koji makroskopski nalikuje adenomu. U oko 70% slučajeva papilarni karcinomi štitnjače ograničeni su na štitnjaču. Međutim, neki papilarni karcinomi štitnjače veliki su tumorski čvorovi promjera većeg od 5 cm koji se makroskopski šire izvan čahure štitnjače invadirajući okolne strukture vrata. Unutar njih ponekad se nalaze kalcifikati, a ponekad veća ili manja cistična žarišta. Mogu se naći i područja krvarenja i kolesterolske nakupine, dok je nekroza rijedak nalaz kod uobičajenih oblika papilarnih karcinoma štitnjače.

Mikroskopski se kod većine papilarnih karcinoma štitnjače nalaze papile, međutim, one mogu činiti tek mali dio novotvorine (35). Papile su dobro izražene, s dobro razvijenom fibrovaskularnom stromom i prekrivene jednim slojem karakterističnih tumorskih stanica. Ponekad su papile mnogobrojne i gusto poredane jedna do druge; tada se tumor čini gotovo solidnim.

Najznačajnije dijagnostičko obilježje papilarnog karcinoma štitnjače je epitelna stanica kuboidnog do nisko cilindričnog oblika koja sadrži izraženu jezgru (36). Jezgra je obično velika i nepravilna, s naborima, uleknućima i citoplazmatskim inkluzijama. Jezgrica

(nukleolus) obično je smještena tik uz jezgrinu membranu te je stoga teže uočljiva. Nuklearni heterokromatin obično je koncentriran uz jezgrinu membranu, uzrokujući karakterističan izgled centralnog dijela jezgre, koji se doima blijed, prazan ili poput mutnog stakla, engl. *ground glass* jezgra. Kad tumorske stanice formiraju papile ili folikule, često je većina citoplazme smještena u apikalnom ili bazalnom dijelu stanica, te se jezgre susjednih stanica doimaju kao da se međusobno dodiruju ili preklapaju (37). Mnogi od ovih tumora sastavljeni su većinom od papilarnih područja, no u mnogima od njih može se naći i određeni broj folikula. Pojedini papilarni karcinomi sastavljeni su gotovo u potpunosti od širokih, koloidom ispunjenih folikula, vrlo sličnih patohistološkom uzorku adenomatoidnih čvorova. Kod ovakvih slučajeva dijagnoza se postavlja nalazom rijetkih papila ili mjestimičnih fokusa infiltracije na periferiji te karakterističnih svijetlih jezgara. Kod oko jedne trećine do polovice papilarnih karcinoma štitnjače nalazimo psamomska tjelešca (kalcificirane ovalne laminarne strukture) promjera 50 – 100 μm , koje vjerojatno nastaju u oštećenoj ili umirućoj stanici (38). Progresivna infarkcija papile i prisutnost nakupina kalcija dovode do stvaranja laminarnih struktura. U slučaju nalaza psamomskog tjelešca u tkivu normalne štitnjače ili limfnog čvora vrata, potrebno je dodatno pretražiti uzorke odstranjenog tkiva na papilarni karcinom štitnjače.

Mnogi papilarni karcinomi štitnjače sadrže zone skvamozne diferencijacije, a često se mogu naći i područja fibroze unutar ili u okolini tumora (39). Razbacani limfociti čest su nalaz na invazivnim rubovima tumora, a tek se rijetko nađe intenzivna infiltracija limfocitima. Pojedina istraživanja ukazuju na bolju prognozu kod papilarnih karcinoma koji sadrže veći broj limfocita. PKŠ su obično infiltrativni, uz često nepravilne i nejasne granice prema okolnom tkivu. Inkapsulirani PKŠ, koji čine oko 10%, povezuju se s boljom prognozom, tj. manjim postotkom limfogenih presadnica. Širenje u limfne prostore štitnjače uzrokuje visok postotak intraglandularne diseminacije primarnog tumora unutar štitnjače, kao i visok postotak limfogenih presadnica u cervikalnim limfnim čvorovima. Rijetko se nalazi invazija krvnih prostora papilarnim karcinomom štitnjače. Imunohistokemijski se kod PKŠ nalazi pozitivna reakcija na tireoglobulin. Okultni papilarni karcinomi štitnjače, tzv. papilarni mikrokarcinomi, nalaze se kao slučajan nalaz kod obdukcije kod 5% do čak 35% osoba. Papilarni mikrokarcinomi definirani su kao papilarni karcinomi štitnjače promjera ≤ 1 cm. Više od 95% papilarnih karcinoma štitnjače su prema stupnju diferencijacije gradusa 1 (G1). Znakovi koji ukazuju na mogući agresivniji oblik papilarnog karcinoma štitnjače su prisutnost brojnih mitozna, povećane i hiperkromatske jezgre, abnormalni sadržaj DNA, odstupanja od

uobičajenog patohistološkog uzorka, te područja neobičnih neoplastičnih stanica tj. znakovi dediferencijacije. Navedeno se češće susreće kod starijih osoba i većih primarnih tumora.

Podvrste papilarnih karcinoma štitnjače

Folikularna podvrsta papilarnog karcinoma štitnjače doima se kao očajureni čvor, kako makroskopski, tako i patohistološki. Tumor se u potpunosti sastoji od folikula, a rijetke papile, karakteristične svijetle jezgre i psamomska tjelešca omogućuju postavljanje dijagnoze u ovim slučajevima. Prognoza je slična prognozi papilarnog karcinoma štitnjače bez posebnih obilježja (NOS).

Solidni podtip papilarnog karcinoma štitnjače je većinom ili isključivo solidni, a povezuje se s dediferencijacijom i agresivnijim kliničkim tijekom te lošijom prognozom. Navedeno je utvrđeno kod PKŠ nastalih kod djece nakon černobilske nesreće. Papile ili folikuli mogu biti rijetki u primarnom tumoru, no češće se nađu u limfogenim presadnicama. Prisutnost psamomskih tjelešaca, karakterističnih jezgara i limfocitna infiltracija unutar i u okolini tumora pomaže u razlikovanju ove varijante PKŠ od medularnog karcinoma, solidnog folikularnog karcinoma ili inzularnog karcinoma. Žarišno se može naći pozitivna imunohistokemijska reakcija na tireoglobulin, uz negativnu reakciju na kalcitonin.

Difuzno sklerozirajući podtip rijedak je podtip PKŠ, češći kod djece i mlađih osoba. Tumor difuzno zahvaća sve limfne prostore jednog režnja ili čitave štitnjače, a udružen je s izrazitim limfocitnim tireoiditisom ili intersticijskom fibrozom, uz brojna psamomska tjelešca. Ovaj je podtip često udružen s limfogenim presadnicama u regionalnim limfnim čvorovima vrata i hematogenim presadnicama u plućima.

Papilarni karcinom visokih stanica (engl. *tall cell*) rijedak je podtip papilarnog karcinoma štitnjače agresivnijeg kliničkog tijeka. Većinom se javlja kod starijih osoba, uz visoku stopu smrtnosti. Stanice su uske, izduljene (najmanje dvostruko dulje visoke nego široke), s eozinofilnom citoplazmom. Kod ovog podtipa često se nalazi prodor kapsule štitnjače s invazijom okolnih struktura vrata te invazijom vaskularnih struktura.

Papilarni karcinom cilindričnih stanica izrazito je rijedak. Uglavnom se javlja kod muškaraca, agresivnog je kliničkog tijeka uz nisku stopu 5-godišnjeg preživljenja. Histološki se nalazi izrazita papilarnost i visoke kolumnarne stanice.

1.1.1.3.2. Patohistološka obilježja folikularnih karcinoma štitnjače

Folikularni karcinomi štitnjače dijele se na minimalno invazivne FKŠ i široko invazivne FKŠ (40). Široko invazivni folikularni karcinomi su tumori koji se i klinički i patohistološki prepoznaju kao zloćudni (karcinomi). Prezentiraju se prstolikim prodorom kapsule i invazijom okolnog tkiva štitnjače, a ako su veliki, prisutna je i invazija okolnih struktura na vratu. Hematogene presadnice često se nalaze kod široko invazivnih FKŠ, najčešće u kosti i pluća, dok je limfogeno diseminacija bolesti rijetka (41).

Minimalno invazivni folikularni karcinomi su oni koji invadiraju samo dvije do tri male krvne žile, te folikularni karcinomi koji djelomično invadiraju kapsulu štitnjače, no bez zahvaćanja krvnih žila. Povrat bolesti ili presadnice su rijetki kod minimalno invazivnih FKŠ, stoga im je prognoza uglavnom dobra. Makroskopski, ali i mikroskopski, minimalno invazivni FKŠ nalikuju folikularnim adenomima (FA), što otežava postavljanje točne dijagnoze (42). Izgledaju kao solidne, inkapsulirane mesnate mase, ponekad sa žarišnom fibrozom ili kalcifikatima. Mogu se naći i područja krvarenja, nekroze, čak i infarkcije tumora, a mogu biti prisutne i mitoze, ponekad čak brojne. Mikroskopski, minimalno invazivni FKŠ obično imaju mikrofolikularni ili trabekularni uzorak i slične folikularnom adenomu. Stanice FKŠ nešto su veće u usporedbi s folikularnim adenomima ili adenomatoidnim čvorovima, no ostala su obilježja stanica slična.

Razlikovanje folikularnih adenoma od folikularnih karcinoma temelji se na prisutnosti kapsularne ili vaskularne invazije, te prisutnosti hematogenih metastaza, što su sve kriteriji za postavljanje dijagnoze folikularnog karcinoma. Invazija krvnih žila općenito je prihvaćen ključni kriterij u razlikovanju zloćudnih od dobroćudnih inkapsuliranih folikularnih tumora. Kriterij vaskularne invazije primjenjuje se isključivo na vene smještene u kapsuli ili ispod nje, dok ulazak tumorskih stanica u kapilare unutar tumorskog čvora nema dijagnostički niti prognostički značaj. Definicija kapsularne invazije bila je predmet opsežnih rasprava i prijepora među patolozima. Neki autori navode vaskularnu invaziju kao neophodan kriterij za postavljanje dijagnoze folikularnog karcinoma štitnjače. Za potvrdu kapsularne invazije

potrebno je analizirati veći broj presjeka ruba tumora. Neki autori čak dijagnosticiraju folikularne tumore s kapsularnom invazijom kao atipične adenome, jer pretpostavljaju benigni klinički tijek kod tih bolesnika. Promjenom patohistološke klasifikacije 1988. godine, svi folikularni karcinomi s papilarnom komponentom uvršteni su u skupinu papilarnih karcinoma štitnjače, te čine tzv. folikularnu varijantu papilarnog karcinoma štitnjače (FVPKŠ). Nedavno je predložena promjena klasifikacije tj. definicije inkapsulirane folikularne varijante papilarnog karcinoma štitnjače, te se predlaže da se bolesnici koji pripadaju u ovu skupinu nazivaju neinvazivnom folikularnom neoplazmom štitnjače s papilama sličnim jezgrenim osobinama, NIFTP (engl. *noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features*) (43).

Onkocitni karcinomi štitnjače ili karcinomi Hürthleovih stanica čine podskupinu folikularnih karcinoma štitnjače (35). Naime, Hürthleove, onkocitne, oksifilne ili Askanazijeve stanice, kako se sve nazivaju, podrijetla su folikularnog epitela. Riječ je o velikim, oštro ograničenim stanicama s voluminoznom zrnatom citoplazmom i velikom prominentnom jezgrićom. Ultrastrukturalna su istraživanja pokazala da je granuliranost citoplazme posljedica postojanja velikih mitohondrija koji ispunjavaju unutrašnjost stanice. Hürthleove stanice mogu se naći kod mnogih bolesti štitnjače, kao što je nodozna struma, kronični limfocitni (Hashimotov) tireoiditis, dugogodišnja hipertireoza, te kod neoplazmi, i one nisu specifične za pojedinu bolest. Slijedom navedenog, svi čvorovi koji sadrže onkocitne, Hürthleove stanice nisu neoplazme, već samo predstavljaju oksifilnu promjenu u adenomatoznom čvorovima ili tireoiditisu. Onkocitne novotvorine štitnjače dijele se na benigne i maligne. Većinom su benigne (u oko 80%), s folikularnim uzorkom. Invazija kapsule tumora i krvnih žila kriterij je za određivanje malignosti tumora. Većina tumora Hürthleovih stanica solidne su lezije, u potpunosti ili tek djelomično inkapsulirane. Vrlo rijetko, papilarni karcinom štitnjače može biti sastavljen od Hürthleovih stanica koje nalazimo u štitnjačama zahvaćenim limfocitnim tireoiditisom. Zbog sličnosti s Warthinovim tumorom žlijezda slinovnica, ovaj oblik papilarnog karcinoma štitnjače naziva se i Warthinu sličan (engl. *Warthin like*) papilarni karcinom štitnjače, a klinički se ponaša poput papilarnog karcinoma štitnjače bez posebnih obilježja.

1.1.1.4. Klinička slika diferenciranih karcinoma štitnjače

Diferencirani karcinomi štitnjače obično su asimptomatski tijekom dugih vremenskih perioda i najčešće se prezentiraju kao solitarni čvor u štitnjači. Međutim, ogromna većina čvorova u štitnjači je dobroćudna, dok su zloćudni tumori štitnjače rijetki, stoga je nepotrebno sve čvorove u štitnjači evaluirati s obzirom na malignost (44). Nadalje, i dobroćudni i zloćudni čvorovi štitnjače najčešće su asimptomatski (44). Karcinom štitnjače najčešće se klinički prezentira kao bezbolni palpabilni solitarni čvor štitnjače. Solitarni čvorovi su češće zloćudni kod bolesnika starijih od 60 ili mlađih od 30 godina. Čvorovi u štitnjači kod muškaraca imaju veću vjerojatnost malignosti no čvorovi kod žena. Čvorovi koji su tvrdi na palpaciju i fiksirani za podlogu češće su maligni od palpacijski mekanih i pomičnih. Palpacijski tvrde cervikalne mase često su znak regionalnih presadnica u vratne limfne čvorove. Rast čvora može biti znak maligne alteracije, a brzi rast čvora loš je prognostički znak. Maligni čvorovi štitnjače obično su bezbolni. Nagla pojava boli obično je povezana s benignom bolešću (poput hemoragije u benignoj cisti ili subakutnog tireoiditisa). Promuklost upućuje na zahvaćenost povratnog laringealnog živca i paralizu glasnice. Disfagija može biti znak zahvaćenosti gornjeg dijela probavnog sustava. Klinički simptomi uznapredovale bolesti mogu biti perzistirajući kašalj, otežano disanje i/ili gutanje, no oni se rijetko vidaju. Ostali simptomi poput boli, stridora, paralize glasnice, hemoptize, naglog rasta čvora, još su rjeđi. Bolesnici s hematogenim presadnicama mogu se inicijalno klinički prezentirati pulmonalnim ili osteoartikularnim simptomima (primjerice koštanim bolovima, patološkom koštanom frakturom).

1.1.1.5. Dijagnostičke metode kod diferenciranih karcinoma štitnjače

1.1.1.5.1. Laboratorijske metode kod diferenciranih karcinoma štitnjače

Kod DKŠ, 2-3 mjeseca nakon provedenog primarnog liječenja određuju se serumske vrijednosti T4 (FT4) i TSH radi baždarenja terapije L-T4, a potom svakih 6-12 mjeseci tijekom praćenja. **Tireoglobulin (Tg)** je specifični tumorski biljeg DKŠ, međutim nema vrijednost u prijeoperacijskoj dijagnostici DKŠ. Koristi se u praćenju bolesnika nakon totalne tireoidektomije. Tg ima visoku osjetljivost i specifičnost u otkrivanju recidiva DKŠ kod bolesnika u kojih je provedena totalna tireoidektomija i radiojodna ablacija ostatnog tkiva

štitnjače (45). Tireoglobulin se može određivati uz terapiju L-tiroksinom ili uz stimulaciju TSH. Određivanje Tg-a uz stimulaciju TSH koja se postiže prekidom terapije L-T4 ili uz rekombinantni humani TSH (rhTSH) (46, 47) osjetljivija je metoda za otkrivanje recidiva ili perzistirajuće bolesti jer može otkriti recidiv u bolesnika s malom količinom tumorskog tkiva (48). Pri svakom određivanju Tg-a potrebno je odrediti TSH i **antitireoglobulinska protutijela (Tg-At)**. Ukoliko su pozitivna Tg-At tada je vrijednost Tg-a kao tumorskog biljega nepouzdana. Neophodno je dugoročno koristiti istu metodu određivanja Tg-a kako bi se osigurao kontinuitet praćenja bolesnika. Određivanje serumske vrijednosti Tg-a ima manju osjetljivost kod slabije diferenciranih tumora. Povišen titar Tg-At moguć je znak aktivnosti bolesti, tj. prisutnosti lokalnih/regionalnih ili hematogenih presadnica DKŠ-a.

U ranom postoperacijskom razdoblju nakon operativnog odstranjenja štitnjače neophodno je kontrolirati serumsku **razinu kalcija**, a u slučaju trajne jatrogene hipokalcemije potrebne su redovite kontrole kalcija u serumu radi praćenja terapije hipokalcemije. Ionizirani serumski kalcij, kao aktivni oblik kalcija, pouzdaniji je pokazatelj vrijednosti kalcemije od ukupnog serumskog kalcija.

Određivanje **TSH**, a po potrebi i **(F)T4**, služi za baždarenje hormonske nadomjesne ili supresijske terapije levotiroksinom nakon totalne tireoidektomije, kao i za procjenu mogućnosti primjene terapije radioaktivnim jodom. Naime, smatra se da je za uspješnu radiojodnu terapiju potrebna vrijednost TSH iznad 30 mU/L, jer u slučaju nižih vrijednosti nema adekvatnog nakupljanja radiojoda u ostatnom tkivu štitnjače ili/i radioavidnim presadnicama DKŠ-a.

1.1.1.5.2. Ultrasonografija kod diferenciranih karcinoma štitnjače

Ultrazvučna dijagnostika najpreciznija je slikovna dijagnostička metoda za otkrivanje čvorova u štitnjači (2). Ultrazvučni pregled vrata neophodno je učiniti u svih bolesnika s palpabilnim čvorom štitnjače ili kada je čvor slučajno otkriven drugim metodama slikovnog prikaza. Ultrazvučna obilježja čvora koja upućuju na malignost su hipoehogenost, mikrokalcifikati, nepravilni rubovi, anteroposteriorni promjer čvora veći od transverzalnog, te pojačana prokrvljenost unutar čvora metodom obojenog Dopplera (CD) (49). Ultrazvučnom pretragom vrata može se postaviti sumnja i na metastatski promijenjene limfne čvorove.

Ultrazvuk vrata uz određivanje Tg u serumu ima ključnu ulogu u praćenju bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače (45). Uz ultrazvučni pregled ležišta štitnjače, analiziraju se ultrazvučna obilježja limfnih čvorova vrata, a kod ultrazvučno suspektih čvorova neophodna je citološka punkcija pod kontrolom ultrazvuka s određivanjem tireoglobulina u punktatu. Bolesnike s vrlo niskim rizikom u kojih je učinjena lobektomija potrebno je kontrolirati periodično - ultrazvukom vrata i mjerenjem tireoglobulina.

1.1.1.5.3. Citološka punkcija štitnjače – FNA (engl. *fine needle aspiration*)

Glavni cilj citološke punkcije štitnjače jest razlučiti čvorove štitnjače koji zahtijevaju kirurško liječenje od onih kod kojih to nije potrebno. Osjetljivost aspiracijske citologije štitnjače varira između 65% i 99%, a specifičnost između 72% i 100%. Preporuča se provoditi je uz nadzor ultrazvuka, posebno kod malih, dublje smještenih čvorova.

Svaki pacijent s čvorom štitnjače kandidat je za citološku punkciju štitnjače, ali prije toga treba proći kliničku procjenu koja će utvrditi je li punkcija doista indicirana. Prije odluke o upućivanju na citološku punkciju potrebno je uzeti kompletnu anamnezu, izvršiti fizikalni pregled vrata i limfnih čvorova vrata, odrediti razinu TSH u serumu te učiniti UZV štitnjače, a po potrebi (ovisno o nalazu TSH) i scintigrafiju štitnjače.

Ultrazvukom otkriveni ili potvrđeni čvorovi trebaju biti punktirani ukoliko su najvećeg promjera većeg od 1,5 cm, ili ako pokazuju ultrazvučno suspektne karakteristike bez obzira na veličinu čvora. Ultrazvučno suspektne karakteristike uključuju mikrokalcifikate, hipoehogene solidne čvorove, nepravilne rubove, intranodularnu prokrvljenost i metastaze na vratu. Punktirati treba i čvorove kod pacijenta kod kojih anamnestički podaci ili rezultati fizikalnog pregleda, kao što su npr. obiteljska anamneza raka štitnjače, prethodno zračenje glave i vrata ili tvrd čvor pri palpaciji, ukazuju na veći rizik od malignosti. Čvorovi štitnjače otkriveni metodom ¹⁸FDG-PET ili scintigrafijom sestamibijem te potvrđeni ultrazvukom štitnjače nose povišen rizik malignosti te je stoga indicirana njihova punkcija.

Citološka dijagnoza bolesti štitnjače zapravo je kliničko-citološka dijagnoza, jer se temelji na korelaciji citomorfološke slike i dostupnih kliničkih podataka.

Na osnovi rizika od malignosti u smjernicama Hrvatskog društva za kliničku citologiju predložena je sljedeća kategorizacija promjena štitnjače (50):

- **benigne promjene** (nodozna struma, adenomatoidni čvor, Hashimotov tireoiditis);

- **promjene neodređenog značaja u pogledu malignosti** (atipija neodređenog značaja, celularna folikularna promjena, hiperplazija Hürthleovih stanica, suspektni folikularni tumor, folikularni tumor, tumor Hürthleovih stanica, suspektni papilarni karcinom, suspektni medularni karcinom, ostali suspektni primarni i sekundarni maligni tumori);
- **maligni tumori** (papilarni karcinom, medularni karcinom, anaplastični karcinom);
- **nedijagnostički nalazi** (koloidna cista, pseudocistična promjena, moguća nodozna struma, moguća fibroza tkiva štitnjače).

Postoje i druge, slične citološke podjele promjena štitnjače, poput primjerice poznate Bethesda-kategorizacije (51).

Ponekad se u sklopu aspiracijske citologije koriste dodatne metode, koje pomažu u određivanju vrste tumora, razlikovanju primarnog od metastatskog tumora i diferencijalnoj dijagnostici suspektnih promjena. Najčešće primjenjivane dodatne metode su imunocitokemijska, PCR i protočna citometrija.

Najveći izazov predstavljaju promjene štitnjače neodređenog značaja u pogledu malignosti. Niti jedan klinički ni laboratorijski test nije dovoljno osjetljiv ni specifičan da bi pouzdano razlučio maligne od benignih citološki dijagnosticiranih folikularnih tumora štitnjače (52).

Istraživani su imunocitokemijskom i metodom RT-PCR brojni tumorski biljezi, od kojih su najbolje rezultate u pogledu senzitivnosti i specifičnosti postigli galektin-3, CD44v6, HBME-1, CK19 i PAX8-PPAR γ (53-55). Upotreba najmanje dvaju od navedenih biljega preporučuje se kod citomorfoloških promjena koje ukazuju na promjene štitnjače neodređenog značaja u pogledu malignosti, osobito ukoliko se radi o promjenama niskog rizika malignosti (celularna folikularna promjena ili suspektni folikularni tumor).

1.1.1.5.4. Scintigrafija cijelog tijela ¹³¹I kod diferenciranih karcinoma štitnjače

I PKŠ i FKŠ nastaju od folikularnih stanica štitnjače, osjetljivi su na stimulaciju s TSH, sintetiziraju tireoglobulin i nakupljaju jod. Potonja je njihova značajka ključna za liječenje i postoperacijsko scintigrafsko praćenje koji se temelje na radioaktivnom izotopu joda, ¹³¹I.

Dijagnostička radiojodna scintigrafija cijelog tijela obično prethodi radiojodnoj terapiji, a omogućuje evaluaciju ostatnog tkiva štitnjače i eventualne prisutnosti presadnica. Dijagnostička scintigrafija cijelog tijela izvodi se uz primjenu 37-111 MBq (1-3 mCi), rjeđe 185 MBq (5 mCi) aktivnosti ¹³¹I, a snima se gama-kamerom 2-3 dana kasnije. Danas se često

izbjegava dijagnostička scintigrafija cijelog tijela prije terapije ^{131}I , jer su pojedini autori uočili negativan učinak dijagnostičke primjene ^{131}I na kasniju terapiju ^{131}I (56-59). Naime, opisano je da je nakupljanje terapijske doze radiojoda sniženo nakon prethodnog dijagnostičkog snimanja primjenom ^{131}I . Ovaj se učinak pripisuje privremenoj disfunkciji tkiva štitnjače, što se u anglosaksonskoj literaturi naziva *stunning*. Vjeruje se da ovaj fenomen ima potencijal smanjenja terapijske učinkovitosti ^{131}I . Taj je učinak osobito zabilježen kod primjene viših dijagnostičkih doza ^{131}I (185 – 370 MBq, tj. 5-10 mCi) (58).

Novija su istraživanja, međutim, poboljšala naše razumijevanje ovog učinka te tvrde drukčije. Naime, osim *stunninga*, i drugi su mehanizmi odgovorni, možda i predominantni, za smanjeni terapijski unos radiojoda (60-62). Novije studije nisu potvrdile negativni učinak predterapijskog snimanja jodom-131 na ishod naknadne ablacijske terapije (60, 62).

Smatra se da je ^{123}I manje učinkovit kao dijagnostički biljeg u odnosu na ^{131}I , a i višestruko je skuplji, stoga se rijetko koristi u dijagnostičkoj radiojodnoj scintigrafiji (63).

Optimalna priprema bolesnika ključna je za uspjeh radiojodne scintigrafije i terapije, a obuhvaća povišenje razine TSH bilo uskratim hormona štitnjače, bilo primjenom rhTSH. Dijeta s malo joda pomaže nakupljanju joda u ostatnom tkivu štitnjače (64, 65).

Dijagnostička scintigrafija ^{131}I nije rutinski indicirana u praćenju bolesnika bez znakova bolesti, a u niskorizičnih bolesnika s negativnim stimuliranim tireoglobulinom (Tg) i urednim ultrazvukom vrata nakon provedene ablacijske terapije ^{131}I često se ne preporučuje (66). Dijagnostička scintigrafija cijelog tijela ^{131}I primjenjuje se prije ablacije kada je upitan opseg provedenog operativnog zahvata ili kada je nalaz potreban za odluku o terapiji ili dozi radiojoda. Postterapijska scintigrafija cijelog tijela izvodi se 5-8 dana nakon terapijske primjene radiojoda. Ona je znatno osjetljivija od dijagnostičke scintigrafije cijelog tijela, osobito u otkrivanju presadnica, te omogućuje bolju procjenu proširenosti bolesti (67-69), kako u inicijalnoj dijagnostičkoj obradi tako i tijekom praćenja bolesnika. Radiojodna scintigrafija, osobito postterapijska (67, 70), može se kombinirati sa SPECT-om (71), što poboljšava lokalizaciju presadnica (72). Nakupljanje radiojoda u presadnicama, kao i njihova manja veličina, ima povoljan prognostički značaj. Primjerice, stope preživljenja kod bolesnika s malim plućnim presadnicama koje nakupljaju radiojod značajno su bolje no kod velikih presadnica koje su neavidne za radiojod (73). Nakupljanje radiojoda u tumorskom tkivu nešto je lošije kod starijih bolesnika, što je u skladu sa sniženom ekspresijom NIS-a i agresivnijim tijekom bolesti kod bolesnika starije životne dobi (13, 74).

1.1.1.5.5. PET/CT kod diferenciranih karcinoma štitnjače

FDG-PET/CT, tj. PET/CT koji koristi ^{18}F -fluorodeoksiglukoza kao kontrast, pretraga je koja ima važno mjesto u evaluaciji presadnica i recidiva diferenciranih karcinoma štitnjače (75-77). Ponekad naime, presadnice DKŠ-a prestanu nakupljati radioaktivni jod te se više ne mogu vizualizirati na radiojodnoj scintigrafiji. Takve presadnice u pravilu nakupljaju FDG, nalazimo ih kod agresivnijih tumora ili slabije diferencijacije, odnosno dediferencijacije DKŠ-a, te su znak lošije prognoze, lošijeg ishoda bolesti. FDG-PET/CT pretraga komplementarna je s radiojodnom scintigrafijom u evaluiranju proširenosti DKŠ-a kod sumnje na aktivnu bolest, a osobito je bitna kod visokorizičnih bolesnika, koji imaju veću vjerojatnost povrata i/ili proširenosti bolesti. Tradicionalno se FDG-PET/CT provodio bez prekida nadomjesne/supresijske terapije L-tiroksinom, no nedavne su studije pokazale da visoke razine TSH značajno poboljšavaju dijagnostičku učinkovitost (78-80), stoga bi priprema za FDG-PET/CT trebala biti slična kao za radiojodnu scintigrafiju. FDG-PET/CT i radiojodna scintigrafija mogu se učiniti sekvencijski nakon uskrate hormona štitnjače ili primjene rhTSH.

1.1.1.5.6. CT i MR kod diferenciranih karcinoma štitnjače

Kod visokorizičnih bolesnika po potrebi se u evaluaciji proširenosti DKŠ-a može koristiti CT ili MR. Makroskopska invazija struktura na vratu evaluira se CT-om ili MR-om kako bi se procijenila eventualna proširenost tumora štitnjače u područje larinksa, traheje, ezofagusa ili velikih krvnih žila i živaca (81, 82). CT-om se mogu dobro evaluirati eventualno prisutne plućne presadnice (75). Lezije u kralješcima, koje potencijalno mogu uzrokovati kompresiju leđne moždine, kao i sumnja na moždane presadnice, zahtijeva provođenje MR-a područja od interesa, osobito imajući na umu da nakon radiojodne terapije može nastupiti edem tumorskog tkiva uz pojavu simptoma kompresije (83). Edem tumorskog tkiva može se pojaviti i kod primjene rhTSH. CT ili MR se, prema kliničkoj indikaciji, provode u inicijalnoj evaluaciji proširenosti bolesti ili tijekom praćenja bolesnika.

1.1.1.6. Liječenje diferenciranih karcinoma štitnjače

1.1.1.6.1. Kirurško liječenje diferenciranih karcinoma štitnjače

Standard kirurškog liječenja diferenciranog karcinoma štitnjače je totalna (ili skoro totalna) tireoidektomija (15, 84-87). Uz totalnu tireoidektomiju indicirana je disekcija vrata koja uključuje regije VI i VII, a prema potrebi (88) može uključivati i modificiranu radikalnu disekciju vrata (tip I, II, III) (89). Kod invazivnijeg oblika bolesti može biti indicirana i radikalna (proširena) disekcija vrata uz odstranjenje dodatnih nelimfatičkih struktura (90-93). Kod operativnog zahvata zbog benignih promjena, ukoliko se intraoperativnim patohistološkim nalazom kao slučajan nalaz otkrije karcinom, također se izvodi totalna tireoidektomija. Od dovršenja operativnog zahvata (reoperacije) mogu se izuzeti niskorizični bolesnici s izoliranim papilarnim karcinomom manjim od 1 cm bez zahvaćenosti limfnih čvorova i proboja kapsule štitnjače (94). Kao alternativa dovršetku operativnog zahvata može se razmotriti radiojodna ablacija ostatnog tkiva štitnjače (95, 96).

1.1.1.6.2. Liječenje radioaktivnim jodom diferenciranih karcinoma štitnjače

1.1.1.6.2.1. Ablacija ostatnog tkiva na vratu

Stanice diferenciranih karcinoma štitnjače, premda maligno promijenjene, pokazuju u određenoj mjeri sposobnost metaboliziranja joda poput normalnih folikularnih stanica (tireocita), što omogućuje njihovo liječenje radioaktivnim izotopom joda, ^{131}I .

Nakon kirurškog zahvata (totalne tireoidektomije sa ili bez disekcije vrata, ovisno o proširenosti bolesti) slijedi ablacija ostatnog tkiva štitnjače primjenom radioaktivnog joda (^{131}I) (97). Ablacijom ostatnog tkiva štitnjače ^{131}I uništava se ostatno tkivo štitnjače, te moguće mikrometastaze diferenciranog karcinoma štitnjače. Ablacijskom radiojodnom terapijom postižu se tri bitna cilja – uništavaju se moguća mikroskopska žarišta DKŠ-a, čime se može smanjiti lokalni i regionalni recidiv bolesti, a vjerojatno i smrtnost od karcinoma štitnjače (15).

Nakon ablacije ostatnog tkiva štitnjače olakšano je praćenje bolesnika, te je omogućeno rano otkrivanje recidiva bolesti koje se temelji na praćenju serumske vrijednosti tumorskog biljega tireoglobulina (Tg) i scintigrafiji cijelog tijela ^{131}I . Naime, nakon kirurške i radiojodne

ablacije štitnjače, u slučaju potpunog odgovora na terapiju i kod odsutnosti bolesti, vrijednost tumorskog biljega tireoglobulina bit će nemjerljivo niska. Primjena visoke aktivnosti ^{131}I omogućava nam i izvođenje dodatne, postterapijske scintigrafije cijelog tijela 5-8 dana po primjeni ^{131}I , čime se značajno povećava osjetljivost pretrage u otkrivanju potencijalnih prethodno nedetektiranih žarišta tumora (98-101).

Ablacija je indicirana u svih bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače osim u onih s vrlo niskim rizikom od recidiva (102). Povišeni TSH (>30 mU/L) stimulira nakupljanje ^{131}I u ostatnom tkivu štitnjače. Kako bi se postiglo povišenje razine TSH, bolesnicima se uskraćuje terapija L-tiroksinom oko 4 tjedna prije planirane ablacije, ili se, alternativno, može aplicirati rhTSH. Dijeta s malo joda preporuča se u periodu 3 tjedna prije terapijske primjene radiojoda (manje od 50 $\mu\text{g}/\text{dan}$), osobito u osoba s velikim unosom joda.

Razlikujemo tri pristupa terapiji ^{131}I : empirijske fiksne doze (103, 104), najveće sigurne doze temeljene na dozimetriji cijelog tijela i krvi te kvantitativnu tumorsku dozimetriju (105, 106). Do danas nema sigurnih dokaza prednosti jedne metode određivanja doze ^{131}I nad drugom (105, 106).

1.1.1.6.2.2. Liječenje hematogenih metastaza diferenciranih karcinoma štitnjače radioaktivnim jodom

Hematogene presadnice kod DKŠ najčešće zadržavaju sposobnost zdravog tkiva štitnjače da nakuplja jod, time i radioaktivni jod (RAI, ^{131}I), što predstavlja vrijednu terapijsku opciju u liječenju metastatske bolesti, koja može dovesti i do potpune regresije presadnica, osobito sitnih presadnica u plućima, kakve su najčešće kod juvenilnih oblika metastatskih DKŠ. U slučaju pojave hematogenih metastaza, višestruke terapije radiojodom kod oko 40% bolesnika dovode do potpune regresije bolesti unutar 5 godina, sa stopom povrata bolesti od svega 7% (107). Međutim, bolesnici koji ne odgovore adekvatno na radiojodnu terapiju imaju 5-godišnje preživljenje od svega 19%. U bolesnika s bolesti koja perzistira nakon primjene kumulativne doze od 22 GBq (600 mCi) radiojoda, primjena narednih ciklusa radiojodne terapije temelji se na individualiziranoj procjeni, uzimajući u obzir dotadašnju dobit od RAI i vjerojatnost daljnje radiosenzitivnosti bolesti. RAI-refraktorna bolest češća je u bolesnika starijih od 40 godina, onih s velikim metastazama ili s manje diferenciranim karcinomima štitnjače, kao i onih kod kojih postoji intenzivno nakupljanje FDG-glukoze na PET/CT-u

(107, 108). RAI-refraktorna bolest najčešće je agresivna (107), te predstavlja terapijski problem.

Postoji korelacija između primijenjene doze radiojoda i rizika od razvoja sekundarnih zloćudnih tumora, uključujući različite solidne tumore i leukemije, osobito akutnu mijeloičnu leukemiju (109). Temeljem ovih i drugih terapijskih rizika radioaktivnog joda (plućna fibroza, kserostomija, poremećaji rada suznih žlijezda), preporuka je da se radiojodna terapija može ponavljati do postizanja kumulativne doze od oko 600 mCi, nakon čega je treba primjenjivati temeljem individualne procjene za svakog pojedinog bolesnika, uzimajući u obzir procijenjenu dobit i moguće rizike (109-111). Nastavak terapije radiojodom treba tada ograničiti samo na bolesnike koji na navedenu terapiju imaju jasan odgovor.

1.1.1.6.3. Supresija TSH u liječenju diferenciranih karcinoma štitnjače

Zbog nepostojanja funkcionalnog tkiva štitnjače nakon totalne tireoidektomije, neophodno je potrebno nadoknađivati hormone štitnjače, što se provodi primjenom levotiroksina (L-tiroksina, L-T4). Međutim, osim nadoknade tj. supstitucije hormona štitnjače, L-tiroksin služi i za supresiju tireotropina (TSH) kod visokorizičnih ili bolesnika s perzistirajućim diferenciranim karcinomima štitnjače. Više kliničkih studija dokazalo je pozitivan učinak na sprječavanje povrata bolesti kod visokorizičnih DKŠ (112-116). Međutim, niskorizični bolesnici nemaju korist od supresije TSH (117). Svega oko 20% bolesnika s liječenim DKŠ koji nemaju znakova bolesti, tj. kod kojih bolest nije prisutna, spadaju u skupinu visokorizičnih bolesnika, dok ostalih 80% ubrajamo u skupinu niskorizičnih bolesnika, tj. onih kojima nije potrebna supresija TSH. No i kod visokorizičnih bolesnika prije definitivne odluke o primjeni terapije supresijom TSH treba razmotriti značajke bolesnika, osobito dob, popratne bolesti, napose kardiološke ili izraženu osteoporozu. Ukoliko je riječ o (osobito starijim) bolesnicima s kardiološkim tegobama, osteopenijom ili već izraženom osteoporozom, jatrogena hipertireoza će pogoršati ili izazvati fibrilaciju atriya i razvoj ili pogoršanje osteoporoze, što može predstavljati veći zdravstveni rizik od rizika od povrata DKŠ-a, osobito uzimajući u obzir i očekivano trajanje života bolesnika (118). Preporuča se individualizirani pristup svakom bolesniku uzimajući u obzir ne samo rizične čimbenike diferenciranog karcinoma štitnjače od kojeg je pojedini bolesnik

liječen, već i njegovu dob i popratne bolesti, kako bi se procijenila dobit i potencijalna šteta od primjene supresijskih doza L-tiroksina (119).

1.1.1.6.4. Radioterapija vanjskim snopovima i ostali lokalni oblici liječenja diferenciranih karcinoma štitnjače

Zračenje vrata vanjskim snopovima, tzv. eksterna radioterapija (ERT), primjenjuje se, osim za lokoregionalnu kontrolu bolesti, i za palijaciju simptoma kod hematogenih metastaza (120).

Indicirana je kod lokalno neresektabilnih ili nepotpuno resektabilnih tumora štitnjače ili/i regionalnih presadnica u vratnim limfnim čvorovima, osobito ako ne nakupljaju radiojod ili su simptomatske, te stalnih lokalnih recidiva (100). Uloga adjuvantnog zračenja u visokorizičnih bolesnika nakon radikalne operacije zbog karcinoma štitnjače kontroverzna je, no njegova primjena može se razmotriti, osobito kod bolesti koja recidivira, jer postoje podaci u literaturi koji ukazuju na moguću bolju lokalnu/lokoregionalnu kontrolu bolesti nakon adjuvantne radioterapije vanjskim snopovima (121).

Bolesnici s asimptomatskim ili sporoprogredirajućim presadnicama se samo prate, no simptomatske ili brzoprogredirajuće presadnice, koje je potrebno liječiti, predstavljaju terapijski problem.

Radioterapija vanjskim snopovima (ili kirurška ekscizija) obično se primjenjuje za metastaze koje se povećavaju te prijete, ili su već izazvale, simptomatsku bolest, za palijaciju simptoma – prvenstveno boli ili smetnji disanja te za prevenciju patološke frakture kosti.

Ostale mogućnosti lokalnog liječenja hematogeno proširene bolesti jesu: operacija, radiofrekvencijska ili krioablacija (prvenstveno za jetrene presadnice), drenaža pleuralnih izljeva, (kemo)embolizacija, radiofrekvencijska ablacija. Moguće je i kombinirati nekoliko vrsta palijativnog liječenja, lokalnog i/ili sustavnog. U liječenju vrlo rijetkih moždanih presadnica, važnu ulogu ima ciljana radioterapija gama-nožem ili tzv. radiokirurgija, po potrebi uz zračenje cijelog mozga. Stereotaksijskom radioterapijom isporučuju se visoke doze zračenja na male volumene sijela presadnica izvan mozga.

1.1.1.6.5. Standardna kemoterapija u liječenju diferenciranih karcinoma štitnjače

Ponekad presadnice DKŠ postanu refraktorne na radioaktivni jod. Procjena je da oko 5% svih kliničkih oblika raka štitnjače postane refraktorno na RAI (107, 122). Između 7% i 23% bolesnika s DKŠ razvije hematogene presadnice (14), a od toga će ih 30% do 50%, po nekima čak i 66%, postati refraktorni na terapiju radioaktivnim jodom (14, 54, 107, 122). Definicija rezistencije na radioaktivni jod uključuje prisutnost barem jednog tumorskog žarišta koje nimalo ne nakuplja RAI ili progresiju bolesti unutar godine dana nakon terapijske aplikacije radiojoda (123).

RAI-refraktorna bolest najčešće je agresivna (107), te predstavlja terapijski problem. Bolesnici s udaljenim presadnicama diferenciranog karcinoma štitnjače koje su osjetljive na terapiju radiojodom imaju srednje 10-godišnje preživljenje od 20%, često i preko 50% (124), a kad presadnice postanu refraktorne na terapiju radioaktivnim jodom, medijan 10-godišnjeg preživljenja pada, po nekima na još uvijek povoljnih 25-40% (122, 125), no po drugim autorima na svega 10% (107). Smatra se, primjerice, da kod bolesnika s plućnim metastazama koje često intenzivno nakupljaju radioaktivni jod, 5-godišnje preživljenje pada sa 60-80% na oko 30% kada bolest postane refraktorna na terapiju radiojodom (126).

Međutim, vrlo je važno imati na umu da metastatski DKŠ može dugo vremena biti stabilan, tj. bez progresije i asimptomatski, te takvi bolesnici nisu kandidati za terapiju, jer njezina toksičnost prevladava nad pozitivnim terapijskim učincima (14, 107).

Bolesnici s asimptomatskim ili sporoprogredirajućim presadnicama samo se prate, no simptomatske ili brzoprogredirajuće presadnice, koje je potrebno liječiti, predstavljaju terapijski problem.

Kemoterapija ima ograničenu ulogu kod DKŠ. Sustavna terapija uključuje standardne kemoterapijske protokole – monokemoterapiju doksorubicinom, koji se smatra najučinkovitijim konvencionalnim citostatikom u liječenju KŠ, kombinaciju doksorubicina i cisplatine (127), ili neki drugi, obično polikemoterapijski protokol (citostatici koji se koriste, osim doksorubicina i cisplatine jesu: bleomicin, vinkristin, taksani) (128). Stopa odgovora na standardnu kemoterapiju je niska (10-20%), a nema pouzdanih podataka da produljuje ukupno preživljenje (129), jer nedostaju podaci prospektivnih randomiziranih studija o učinkovitosti pojedinih terapijskih protokola (130).

1.1.1.6.6. Ciljana terapija u liječenju diferenciranih karcinoma štitnjače

Otkriće novih, ciljanih terapija i poboljšano razumijevanje karcinogeneze u štitnjači (54, 131-134) dovelo je do velikog interesa za primjenu bioloških ciljanih lijekova i u liječenju raka štitnjače, prvenstveno u liječenju medularnih karcinoma štitnjače, kao i diferenciranih karcinoma štitnjače refraktornih na radioaktivni jod (135).

Ciljane terapije kod RAI-refraktornog DKŠ djeluju putem dvaju glavnih mehanizama – inhibicije angiogeneze te inhibicije stanične proliferacije i preživljenja. Inhibicija angiogeneze učinkovito je terapijsko oružje, jer su karcinomi štitnjače visoko vaskularizirani, te ovise o adekvatnoj vaskularizaciji za osiguravanje hranjivih tvari i kisika što je preduvjet njihova tumorskog rasta. VEGF je glavni pokretač tumorske vaskularizacije te je njegova povećana ekspresija povezana s većom tumorskom masom i lošijom prognozom kod DKŠ (33). PDGF je drugi čimbenik rasta čija se aktivnost nadopunjuje s onom VEGF-a u neoangiogenezi (136). MAPK/ERK/AKT signalni putevi ključni su regulatori stanične proliferacije i preživljenja. Mutacije i abnormalna aktivacija gena koji kodiraju za sastavne dijelove ovih signalnih puteva česti su kod DKŠ (137, 138).

Dva su lijeka do sada odobrena od strane EMA i FDA za liječenje brzoprogridirajućih ili agresivnih simptomatskih diferenciranih karcinoma štitnjače refraktornih na radiojod u bolesnika s metastatskom ili/i lokalno/lokoregionalno uznapredovalom neresektabilnom bolešću. Riječ je o multikinaznim inhibitorima sorafenibu (139-141) i lenvatinibu (142).

Sorafenib je peroralni multikinazni inhibitor koji cilja kako na tirozin-kinazne receptore na staničnoj površini, tako i na nizvodne intracelularne serin/treonin kinaze u RAS/MAPK kaskadi. Ovaj lijek inhibira VEGFR-1, -2, i -3, RET (uključujući RET/PTC), RAF (uključujući BRAFV600E), PDGFR-B, FLT3 i c-KIT. Na taj način sorafenib suzbija ne samo neoangiogenezu, već i proliferaciju tumorskih stanica. Lenvatinib je oralni multikinazni inhibitor VEGFR-1, -2 i -3, FGFR-1-4, PDGFR- α , RET i KIT.

Oba su se lijeka pokazala učinkovitima kod bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače refraktornima na terapiju radioaktivnim jodom (143). Međutim, kako je riječ o terapiji s dosta nuspojava, što često dovodi do potrebe za modifikacijom doze ili čak trajnim prekidom terapije i može utjecati na kvalitetu života bolesnika, a imajući na umu da je riječ o terapiji koja se primjenjuje do pojave progresije bolesti ili neprihvatljive toksičnosti, što može trajati i više godina, te uzimajući u obzir činjenicu da velik broj bolesnika s metastatskim DKŠ ima

asimptomatsku i dugo vremena stabilnu, neprogresivnu bolest, potrebna je stroga selekcija bolesnika i odluka o pravom trenutku, ni prerano ni prekasno, započinjanja sustavne ciljane terapije (144). Bolesnici kojima je zaista potrebno započeti terapiju sorafenibom ili lenvatinibom su samo oni koji imaju brzoprogredirajući ili agresivni simptomatski RAI-refraktorni DKŠ, dok je kod ostalih potrebno samo pažljivo i redovito praćenje.

1.1.1.7. Prognostički čimbenici i sustavi stupnjevanja diferenciranih karcinoma štitnjače

Ishod bolesti kod bolesnika adekvatno liječenih zbog DKŠ obično je povoljan. Ukupno 10-godišnje preživljenje kod odraslih s DKŠ iznosi 80-90%. Međutim, kod 5-20% bolesnika nastupi lokalni ili regionalni povratak bolesti, a kod 10-15% udaljene metastaze. Stoga je procjena rizika, kako od povrata bolesti, recidiva, tako i od smrti od DKŠ, bitna, te postoje različiti sustavi njegove procjene. Navedeno omogućuje točniju prognozu kliničkog tijeka bolesti i donošenje adekvatnih terapijskih odluka.

1.1.1.7.1. Prognostički čimbenici

Za nekoliko se čimbenika konzistentno, u više različitih istraživanja, utvrdio značaj u predviđanju rizika povrata bolesti u velikim multivarijantnim analizama velikih kohorti bolesnika.

Dob bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze bitan je prognostički čimbenik kod DKŠ. Rizik od povrata bolesti i smrti od DKŠ raste s dobi, osobito nakon 40. godine života (15, 99). Djeca mlađa od 10 godina pod većim su rizikom od recidiva od starije djece i adolescenata (145).

Muški **spol** pokazao se lošim neovisnim prognostičkim čimbenikom u nekim, no ne i u svim studijama (86, 146-148).

Histološki tip diferenciranog karcinoma štitnjače također je prognostički čimbenik (86, 147, 149, 150). PKŠ imaju bolju prognozu od FKŠ. Međutim, ako se eliminiraju čimbenici dobi i proširenosti bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, stope preživljenja su slične. Unutar skupine papilarnih karcinoma štitnjače postoje specifični histološki podtipovi s lošijom

prognozom, primjerice visokostanični i kolumnarni, a slabiji stupanj diferencijacije i limfovaskularna invazija također su čimbenici lošije prognoze. Osobine FKŠ povezane s lošijom prognozom su „širokoinvazivni“ i „vaskularno invazivni“. Onkocitni folikularni karcinomi štitnjače, obično nazvani karcinomima Hürthleovih stanica, također imaju nešto lošiju prognozu.

Proširenost bolesti najbitniji je prognostički čimbenik kod DKŠ. Rizik od povrata bolesti povezan je s veličinom primarnog tumora (15, 146, 147), probojem čahure štitnjače tj. tzv. ekstrakapsularnom invazijom (ETE) (15, 151), prisutnošću presadnica u područnim limfnim čvorovima (151, 152), te prisutnošću udaljenih, hematogenih presadnica (124, 153, 154).

1.1.1.7.2. Sustavi stupnjevanja

Tijekom godina predlagani su različiti sustavi stupnjevanja DKŠ, te se razvijaju i dalje (155, 156). Najčešće upotrebljavani su: TNM-klasifikacija po AJCC/UICC (157), AGES (158), MACIS (153), AMES (146), EORTC (159). U tablici 1. navedeni su parametri koji se uzimaju u obzir kod pojedinog sustava stupnjevanja DKŠ. Najviše informacija o prognozi pružaju TNM-sustav i MACIS.

Tablica 1. Sustavi stupnjevanja i sheme vrednovanja za procjenu rizika u bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače

	Sustavi stupnjevanja i sheme vrednovanja				
	TNM (PKŠ, FKŠ)	EORTC (PKŠ, FKŠ)	AMES (PKŠ, FKŠ)	AGES (PKŠ)	MACIS (PKŠ)
Dob	X	X	X	X	X
Spol	X	X	X		
Stanični tip	X	X			
Veličina tm	X		X	X	X
Gradus				X	
ETE	X	X	X	X	X
N+	X				
M+	X	X	X	X	X
Nepotpuna resekcija					X

TNM-sustav AJCC/UICC široko je rasprostranjen u cijelom svijetu te se najčešće koristi, a naveden je u tablicama 2. i 3. (157). Njegova je specifičnost kod karcinoma štitnjače (u odnosu na stupnjevanje zloćudnih tumora drugih lokalizacija) što se uzima u obzir dob bolesnika kod stupnjevanja u stadije. Tako se bolesnici mlađi od 45 godina svrstavaju u stadije bolesti I. ili II., ovisno o odsutnosti ili prisutnosti udaljenih metastaza, dok tek bolesnici u dobi od 45 godina ili stariji mogu imati III. ili IV. stadij bolesti; navedeno je proizašlo iz podataka o puno boljoj prognozi bolesti kod mlađih bolesnika, čak i kod prisutnosti udaljenih metastaza, uslijed velike učinkovitosti radiojodne terapije i povoljnijeg biološkog ponašanja DKŠ-a u mlađoj životnoj dobi (155).

S kliničkog stajališta, sustavi stupnjevanja rizičnosti od povrata bolesti i agresivnijeg kliničkog tijeka omogućuju individualizaciju terapije, te njezino prilagođavanje pojedinom bolesniku ovisno o njegovim rizičnim čimbenicima. Osim što to omogućuje primjenu optimalnog liječenja u optimalnom trenutku, jednako je bitno da se izbjegava nepotrebno i pretjerano liječenje kod bolesnika s dobrom prognozom, jer svako liječenje može imati nuspojave i posljedice, ponekad i dugoročne, te utjecati na kvalitetu života bolesnika. Principi personalizirane medicine sve se više upotrebljavaju i u zbrinjavanju bolesnika s karcinomima štitnjače. Daljnje spoznaje u području molekularne medicine sigurno će dodatno poboljšati i sofisticirati pristup bolesniku, no još uvijek su konvencionalni patohistološki i klinički parametri ključni u donošenju terapijskih odluka.

Tablica 2. TNM - klasifikacija diferenciranih karcinoma štitnjače prema AJCC/UICC (7. izdanje, 2010. godine) (157)

Definicija	
T0	nema znakova primarnog tumora
T1a	tumor ≤ 1 cm, bez širenja izvan štitnjače
T1b	tumor >1 cm, ali ≤ 2 cm u najvećem promjeru, bez širenja izvan štitnjače
T2	tumor >2 cm, ali ≤ 4 cm u najvećem promjeru, bez širenja izvan štitnjače
T3	tumor >4 cm u najvećem promjeru, ograničen na štitnjaču <u>ili</u> tumor bilo koje veličine s minimalnim širenjem izvan štitnjače (npr. širenje u sternotireoidni mišić ili u peritireoidna meka tkiva)
T4a	tumor bilo koje veličine koji se širi izvan kapsule štitnjače i invadira supkutana meka tkiva, larinks, traheju, ezofagus ili povratni laringealni živac
T4b	tumor bilo koje veličine koji invadira prevertebralnu fasciju ili okružuje karotidnu arteriju ili medijastinalne krvne žile
N0	nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1a	metastaze u limfnim čvorovima regije VI (pretrahealni, paratrahealni i prelaringealni/delfijski limfni čvorovi)
N1b	metastaze u unilateralnim, bilateralnim ili kontralateralnim vratnim (regije I, II, III, IV ili V) ili retrofaringealnim ili gornjim medijastinalnim limfnim čvorovima (regija VII)
M0	nema udaljenih metastaza
M1	prisutne udaljene metastaze

Tablica 3. Klasifikacija stadija bolesti diferenciranih karcinoma štitnjače prema AJCC/UICC (7. izdanje, 2010. godine) (157)

<i>Bolesnici <u>mlađi od 45 godina</u> u trenutku postavljanja dijagnoze</i>			
Stadij I	bilo koji T	bilo koji N	M0
Stadij II	bilo koji T	bilo koji N	M1
<i>Bolesnici u dobi od <u>45 god. ili stariji</u> u trenutku postavljanja dijagnoze</i>			
Stadij I	T1	N0	M0
Stadij II	T2	N0	M0
Stadij III	T3	N0	M0
	T1-T3	N1a	M0
Stadij IVa	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1-T4a	N1b	M0
Stadij IVb	T4b	bilo koji N	M0
Stadij IVc	bilo koji T	bilo koji N	M1

Smjernice svih relevantnih društava za štitnjaču veliku pozornost posvećuju rizičnim čimbenicima i sustavima stupnjevanja bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače.

Hrvatsko društvo za štitnjaču (HDSŽ) također je, 2008. godine, objavilo dijagnostičke i terapijske smjernice za diferencirani karcinom štitnjače (160). U našim smjernicama se bolesnici s DKŠ dijele u tri rizične skupine. Skupina vrlo niskog rizika obuhvaća bolesnike s diferenciranim karcinomom štitnjače kod kojih je prisutno sve navedeno - proveden potpuni

operativni zahvat, unifokalni tumor manji od 1 cm i povoljan histološki nalaz, nema širenja tumora izvan kapsule štitnjače niti regionalnih ili udaljenih metastaza (N0, M0).

Visokorizična skupina obuhvaća bolesnike s jednim od navedenog - s udaljenim metastazama (M1) ili kod kojih primarni tumor nije u potpunosti odstranjen, ili ako je tumor u potpunosti odstranjen, ali u bolesnika postoji visok rizik recidiva ili mortaliteta zbog jedne od sljedećih činjenica - tumor se širi izvan kapsule štitnjače (T3 ili T4) ili su zahvaćeni limfni čvorovi (N1) ili je nepovoljnog histološkog nalaza. Niskorizična skupina obuhvaća sve ostale bolesnike.

Smjernice Američkog društva za štitnjaču (ATA) iz 2015. godine (98) koriste **stratifikaciju bolesnika prema rizičnim kategorijama** ovisno o kombinaciji patohistoloških i kliničkih parametara (tablica 4.), kao i podjelu bolesnika prema odgovoru na terapiju tj. kliničkom ishodu bolesti (tablica 5.). Ovisno o svrstavanju bolesnika u pojedinu kategoriju, može se intenzivirati ili ublažiti učestalost i opseg dijagnostičkih postupaka tijekom inicijalne obrade i praćenja, te individualizirati terapija – primjerice opsežnost operacijskog zahvata, doza radiojoda u ablaciji ostatnog tkiva ili njezino izostavljanje, odluka o provođenju supresije TSH ili samo supstitucije L-tiroksinom.

Tablica 4. Stratifikacija rizika bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače prema smjernicama ATA (engl. *American Thyroid Association*) 2015. (98)

ATA-niskorizični:

- **Papilarni karcinom štitnjače (sa svim dolje navedenim):**
 - bez lokalnih ili udaljenih presadnica;
 - potpuna resekcija makroskopske bolesti;
 - bez tumorske invazije u lokoregionalna tkiva ili strukture;
 - bez agresivne histologije (npr. visokostanični, kolumnarni);
 - ako je primijenjen ¹³¹I, bez RAI-avidnih metastatskih sjela izvan ležišta štitnjače na 1. postterapijskoj radiojodnoj scintigrafiji cijelog tijela;
 - bez vaskularne invazije;
 - klinički N0 ili ≤5 pN1 mikrometastaza (najveća - dimenzija <0,2 cm);

- Intratireoidna, inkapsulirana **folikularna varijanta papilarnog** karcinoma štitnjače;
- Intratireoidni, dobro diferencirani **folikularni** karcinom štitnjače s kapsularnom invazijom, ali bez ili s minimalnom (<4 fokusa) vaskularnom invazijom;
- intratireoidni, **papilarni mikrokarcinom**, unifokalni ili multifokalni, isključujući one koji su BRAF V600E mutirani (ako je učinjena analiza)

ATA-srednjerizični:

- Mikroskopska invazija tumora u peritireoidna meka tkiva;
- RAI-avidna metastatska sijela na vratu na 1. postterapijskoj radiojodnoj scintigrafiji cijelog tijela;
- Agresivna histologija (npr. visokostanični, kolumnarni ca.);
- PKŠ s vaskularnom invazijom;
- Klinički N1 ili >5 pN1 s time da su svi <3 cm u najvećem promjeru;
- Multifokalni papilarni mikrokarcinom s ETE i BRAFV600E mutirani (ako je učinjena analiza)

ATA-visokorizični:

- Makroskopska invazija tumora u peritireoidna meka tkiva (makroskopska ETE);
- Nepotpuna resekcija tumora;
- Udaljene metastaze;
- Postoperacijski serumski tireoglobulin sugerira udaljene metastaze;
- pN1 s bilo kojim metastatskim limfnim čvorom ≥ 3 cm u najvećem promjeru;
- Folikularni karcinom štitnjače s ekstenzivnom vaskularnom invazijom (> 4 fokusa vaskularne invazije)

Tablica 5. Podjela bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače prema odgovoru na terapiju (kliničkom ishodu) po smjernicama ATA (*American Thyroid Association*) 2015. (98)

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

1.1.2. Adenomi štitnjače

Folikularni adenomi (FA) benigni su inkapsulirani tumori štitnjače (161). Tumorsko tkivo je gumasto, homogeno, okruglo ili ovalno te okruženo tankom fibroznom čahuricom. Folikularni adenomi česte su neoplazme štitnjače. U dvije serije obdukcija, incidencija adenoma štitnjače iznosila je 3% i 4,3% (162, 163). Omjer folikularnih adenoma prema folikularnim karcinomima u kirurškim uzorcima iznosi približno 5 prema 1.

Većina bolesnika s folikularnim adenomima nalaze se klinički i biokemijski u eutireozu. Oko 1% folikularnih adenoma su tzv. „toksični adenomi“, koji uzrokuju hipertireozu. Hipertireoza se obično ne pojavljuje dok funkcionalni folikularni adenom ne dosegne 3 cm u promjeru. Na radiojodnoj scintigrafiji štitnjače funkcionalni folikularni adenomi intenzivno nakupljaju radiojod te mogu suprimirati nakupljanje joda u ostatku štitnjače. Za razliku od toga, većina folikularnih adenoma su hipofunkcionalni na tehnecijskoj scintigrafiji štitnjače.

Citološki se u pravilu ne može razlikovati folikularne adenome od folikularnih karcinoma, stoga se obično postavlja dijagnoza folikularne neoplazme. Zbog dijagnostičkih ograničenja, mnogi bolesnici koji u konačnici imaju benigne folikularne lezije nepotrebno su podvrgnuti operacijskim zahvatima. Naime, folikularni adenomi su benigne lezije, a ne prekursori karcinoma (164).

1.2. Proteini visoke pokretljivosti A, HMGA (engl. *High Mobility Group A*)

Stanična proliferacija i diferencijacija visoko su koordinirani procesi tijekom razvoja organizma, te zahtijevaju preciznu regulaciju genske ekspresije. Jedan od procesa koji olakšava orkestraciju ovih promjena u obrascima genske ekspresije jest remodeliranje kromatinske strukture, koje potom modulira interakciju transkripcijskih regulacijskih proteina s DNA (165). Na ove trodimenzionalne promjene kromatinske strukture utječu takozvani “arhitektonski (strukturni, građevni) transkripcijski faktori” (166, 167).

Skupina proteina visoke pokretljivosti, tzv. proteini HMG (engl. *High Mobility Group*) čine brojne heterogene, nehistske komponente kromatina (168), koji djeluju kao takvi arhitektonski čimbenici (169), doprinoseći regulaciji transkripcije (170, 171). Proteini visoke pokretljivosti (HMG) ubrajaju se među najveće i najbolje opisane skupine nehistskih kromosomskih proteina (172).

Proteini HMG otkriveni su godine 1973. (168). Definiramo ih kao jezgrine proteine visoke elektroforetske pokretljivosti u poliakrilamidnim gelovima, a mogu biti ekstrahirani iz jezgre ili kromatina pomoću 0,35 M natrijevog klorida, i topljivi su u 5%-tnoj perklornoj ili trikloro-octenoj kiselini. Imaju visoki sadržaj nabijenih aminokiselina te molekulsku masu <30 kDa. Obitelj proteina HMG podijeljena je u tri podskupine – HMGA, HMGB i HMGN, prethodno označavani kao HMGI/Y, HMG1/2, te HMG14/17 (173).

Proteini HMG vežu se na DNA i nukleosome i mijenjaju strukturu kromatina lokalno i globalno. Dostupnost DNA unutar kromatina središnji je čimbenik koji utječe na procese u jezgri ovisne o DNA, kao što su transkripcija, replikacija, rekombinacija, te stanični popravak. Proteini HMG udružuju se s različitim multiproteinskim kompleksima kako bi regulirali spomenute procese mijenjajući dostupnost DNA (174).

1.2.1. Struktura gena *HMGA* i proteina *HMGA*

Godine 1983., nova skupina proteina visoke pokretljivosti otkrivena je u stanicama HeLa (175), a kasnije je označena kao HMGA. Obitelj HMGA čine tri proteina - HMGA1a (prethodno zvan HMGI) i HMGA1b (prethodno zvan HMGY), koji su kodirani istim genom i rezultat su alternativnog prekrajanja, te HMGA2 (prethodno zvan HMGI-C) (176).

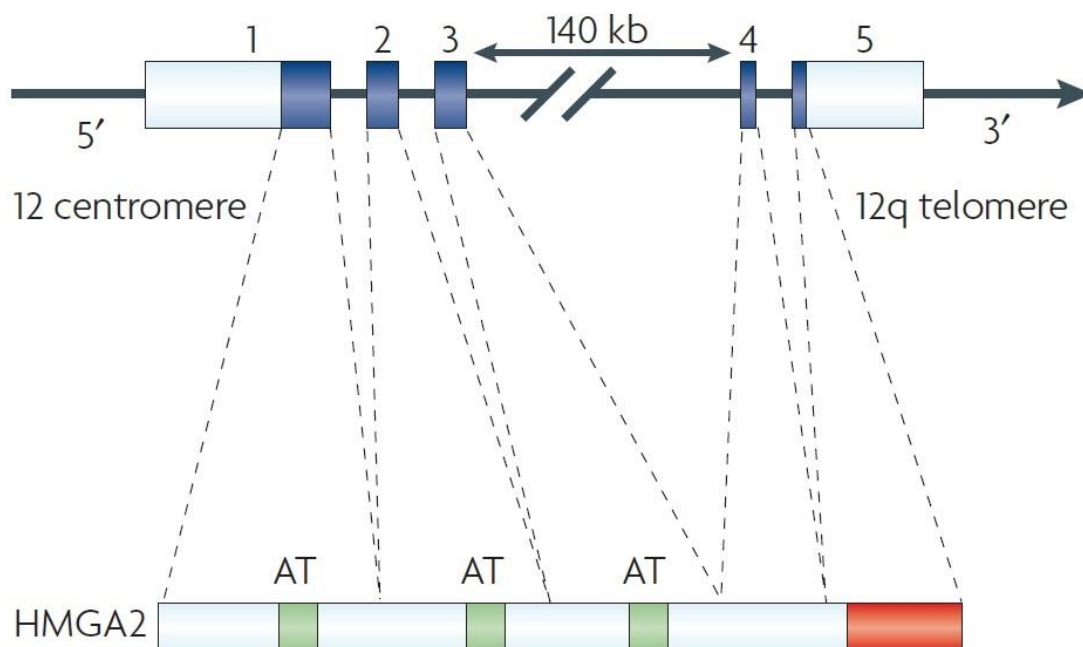
Gen *HMGA2* (NG_016296.1) smješten je u q13-15 segmentu kromosoma 12 i sadrži pet eksona koji su raspršeni po genomskoj regiji ≥ 160 kb. Gen *HMGA2* kodira protein

HMGA2 koji postoji u dvije izoforme, pri čemu je izoforma a (NP_003474.1) dulja od izoforme b (NP_003475.1 – 106 aminokiselina) (Slika 1.)

U normalnim stanicama, transkripti gena *HMGA2* kodiraju prvenstveno dulju izoformu proteina od 109 aminokiselina (12 kDa).

Proteini visoke pokretljivosti (168) skupine A, HMGA, mali su kromatinski nehistski strukturni proteini koji djeluju kao transkripcijski regulacijski čimbenici (169, 170, 172). U blizini njihova amino-kraja nalaze se tri kratka ponavljanja baza, nazvana “kuke AT”, pomoću kojih se ti proteini vežu na mali utor DNA u područjima bogatima adeninom i timinom (177). “Kuke AT” čine karakteristični funkcionalni pojavljujući slijed pomoću kojih se proteini HMGA mogu vezati za specifične strukture u DNA ili kromatinu neovisno o slijedu nukleotida, jer prepoznaju strukturu svojih vežućih “partnera”, a ne određeni slijed nukleotida. Vezivanjem dolazi do konformacijskih promjena koje omogućavaju organiziranje transkripcijskih faktora u kompleks zvan “pojačivač”.

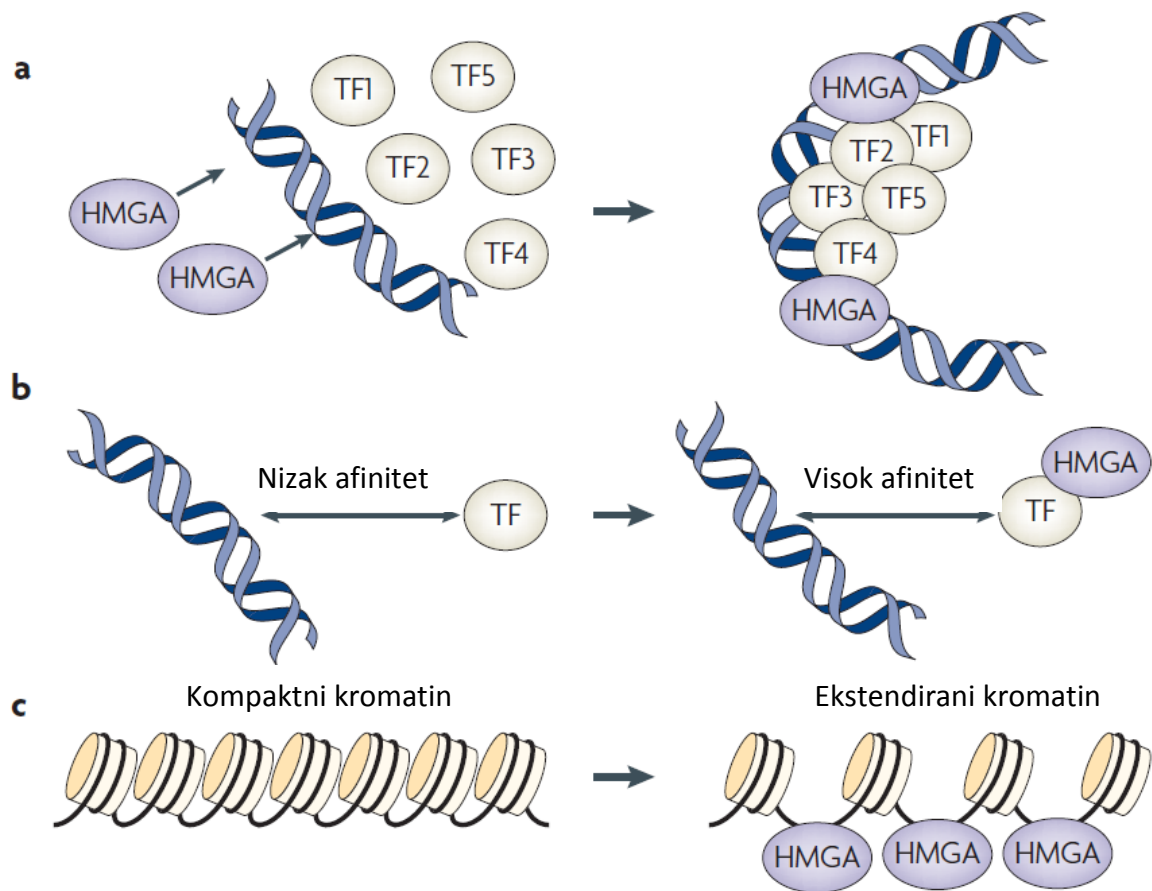
Proteini HMGA djeluju stoga kao arhitektonski elementi koji modificiraju strukturu svojih vežućih “partnera” kako bi generirali konformaciju koja omogućuje i olakšava različite aktivnosti ovisne o DNA poput transkripcije, replikacije, rekombinacije i staničnog popravka.



Slika 1. Struktura humanog gena *HMGA2* (178)

S druge strane, karboksi-kraj proteina HMGA bogat je kiselim aminokiselinama i odgovoran je za ostvarivanje interakcija HMGA s drugim proteinima, tzv. proteinsko-proteinskih interakcija. Takve interakcije dovode do strukturnih promjena vezanih proteina te omogućavaju udruživanje tih proteina u pojačivač (179, 180).

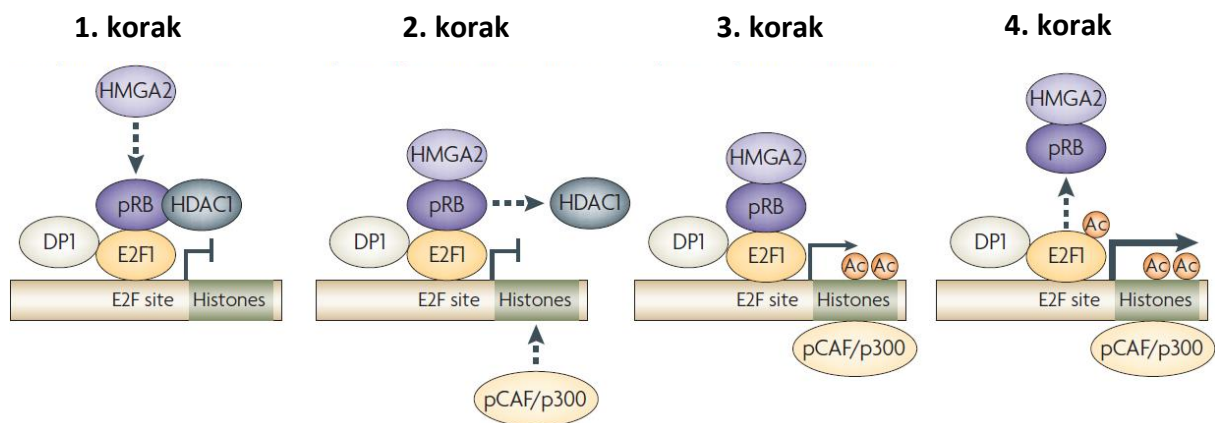
Proteini HMGA djeluju kao strukturni čimbenici i bitne su sastavnice pojačivača, a reguliraju transkripcijsku aktivnost gena različitim mehanizmima (181). Vežući se na DNA mogu mijenjati njezinu konformaciju modulirajući time jačinu vezanja histona H1 kao i sposobnost vezanja DNA drugih transkripcijskih faktora. Osim toga, proteini HMGA mogu se izravno vezati na transkripcijske faktore mijenjajući i njihovu konformaciju i posljedično sposobnost vezanja DNA. Međudjelovanjem s transkripcijskom mašinerijom, proteini HMGA mijenjaju strukturu kromatina i time reguliraju transkripcijsku aktivnost više gena, bilo pojačavajući ili smanjujući sposobnost nekih drugih (češćih) transkripcijskih aktivatora i supresora za vezanjem DNA. Oni međutim, sami po sebi ne posjeduju kapacitet za intrinzičku transkripcijsku aktivnost (169). Primjeri mogućih mehanizama djelovanja proteina HMGA i HMGA2 navedeni su na slici 2., odnosno na slici 3.



Slika 2. Mehanizmi djelovanja proteina HMGA (178)

Proteini HMGA sudjeluju u formiranju i moduliranju makromolekularnih kompleksa koji su uključeni u različite biološke procese. To čine na neki od sljedećih načina:

- a) vežući se izravno s DNA, čime mijenjaju njezinu konformaciju i posljedično olakšavaju vezanje skupina transkripcijskih faktora (TF). Proteini HMGA ulaze u interakcije i s DNA i s TF čime nastaju multiproteinski stereospecifični kompleksi vezani na DNA;
- b) vežući se za transkripcijske faktore koji posjeduju nizak afinitet za DNA izravnim proteinsko-proteinskim interakcijama, čime mijenjaju njihovu konformaciju i povećavaju afinitet njihova vezivanja za DNA;
- c) mijenjajući strukturu kromatina, vežući se za specifična područja na DNA koja omogućuju transkripciju izmještanjem histona H1.



Slika 3. Primjer utjecaja prekomjerne ekspresije HMGA2 na transkripcijske mehanizme (aktivacija transkripcijskog faktora E2F1 putem HMGA2) (178)

Jedan od načina kako proteini HMGA mogu provoditi svoju tumorigensku aktivnost je djelovanjem na stanični ciklus. pRB jedan je od glavnih proteina koji služe kao regulatori staničnog ciklusa i održavaju transkripcijski faktor E2F1 inaktivnim u kompleksu s histon-deacetilazom 1 (HDAC1), što rezultira kočenjem transkripcije.

Kao posljedica prekomjerne ekspresije HMGA2, aktivira se transkripcija posredovanjem E2F1 u četiri koraka: 1. korak – HMGA2 veže se za pRB, koji je spojen u kompleks s E2F1 i histonskom deacetilazom 1 (HDAC1); (kompleks E2F1 i HDAC1 aktivno koči transkripciju); 2. korak – interakcija HMGA2 s pRB izmješta HDAC1 iz kompleksa; 3. korak – u odsutnosti HDAC1, histonska deacetilaza (pCAF/p300) biva „regrutirana“, te putem acetilacije histona, oslabljuje represiju transkripcije; 4. korak – histonska acetilaza acetilira i E2F1, stabilizirajući ga u „slobodnom“ aktivnom obliku. Posljedično se HMGA2 i pRB oslobađaju od E2F1.

Proteini HMGA široko su rasprostranjeni u prirodi i homolozi proteina HMGA sisavaca otkriveni su kod kvasaca, insekata, biljaka, ptica, kao i u svim istraživanim skupinama sisavaca (182, 183).

Oba gena *HMGA* široko su eksprimirana tijekom embriogeneze, dok je njihova ekspresija odsutna ili niska u diferenciranim tkivima odraslih (184, 185). Tijekom normalnog razvoja, ekspresija HMGA2 ograničena je na mezenhim (186). Ekspresija HMGA2 nije detektirana ni u jednom od nekoliko različitih analiziranih tkiva odraslih miševa niti u zrelim ljudskim tkivima (187), osim rijetkih iznimaka (testis, masno tkivo, skeletni mišići) (188). Niska ekspresija HMGA2 uočena je u CD34-pozitivnim hematopoetskim matičnim stanicama (189), u mišjim preadipocitnim proliferirajućim stanicama (190) te u mejotičnim i

postmejotičnim stanicama testisa (sekundarnim spermatocitima i spermatidima) (191, 192). Navedeno ukazuje na ulogu HMGA2 u hematopoezi, regulaciji tjelesne mase i adipogenezi (190, 193), te spermatogenezi (191). Za razliku od toga, HMGA1 je eksprimiran, premda u niskim razinama, u odraslim ljudskim tkivima (184). Proteini HMGA u organima odraslih osoba uključeni su u održavanje i aktiviranje matičnih/progenitorskih stanica u različitim tkivima (194, 195).

1.2.2. Uloga HMGA u nastanku nekih neneoplastičnih bolesti

Kao jedni od glavnih nehistsonskih kromosomskih proteina, proteini HMGA su multifunkcionalni te su uključeni u mnoge ključne stanične procese, kao što su regulacija gena, stanični ciklus, diferencijacija, te viralna integracija (196). Stoga ne začuđuje što su mutacije *HMGA* povezane s brojnim bolestima, uključujući benigne i maligne novotvorine (166), pretilost (190), dijabetes (197) i aterosklerozu (198). Proteini HMGA visoko su eksprimirani tijekom embriogeneze (184, 185, 199), kada stanice brzo proliferiraju. Postoje jasni dokazi da su geni *HMGA* uključeni, između ostalog, u regulaciju rasta (185, 200-202). U tkivima odraslih njihova ekspresija postaje niska ili nedetektabilna (166). *HMGA* predstavljaju jedinstveni primjer gena koji su putem različitih mehanizama uključeni u razvoj kako malignih, tako i benignih neoplazmi.

1.2.3. Uloga HMGA u nastanku novotvorina

Korelacija između proteina HMGA i neoplastičnog fenotipa prvi je put zamijećena kada su dvodimenzijском електроforezom utvrđene promjene u jezgrinim proteinima nakon transformacije stanične linije štitnjače štakora (FRTL5) djelovanjem mišjeg virusa Kirstenovog sarkoma (KiMSV, engl. *Kirsten murine sarcoma virus*) (203). Nakon stanične transformacije zamijećena su tri fosforilirana proteina, koji su kasnije označeni kao HMGA2, HMGA1a i HMGA1b. Kasnija su istraživanja potvrdila povezanost ovih proteina s visoko malignim fenotipom; nisu bili prisutni u neinficiranim, niti u retroviralno inficiranim štakorskim staničnim linijama štitnjače koje nisu posjedovale potpuno maligni fenotip, a bile su konstantno prisutne u onim stanicama koje su, nakon retroviralne infekcije, prošle potpunu malignu transformaciju (204). Nakon toga, izravna uloga proteina HMGA u tumorigenezi bila

je dokazana tako što je s gubitkom funkcije HMGA2 u normalnim štakorskim stanicama štitnjače bila spriječena retroviralno inducirana neoplastična transformacija (205).

Kasnija su istraživanja utvrdila postojanje velikih količina proteina HMGA u eksperimentalnim malignim neoplazmama (206). Korelacija između količine proteina HMGA i malignog fenotipa ukazala je na važnost određivanja njihove uloge u procesu stanične transformacije, te osobito istraživanja je li njihov porast samo granično povezan sa staničnom transformacijom ili postoji uzročna povezanost s malignim fenotipom.

Proteini HMGA prvenstveno su, no ne i isključivo, pojačano eksprimirani u novotvorinama mezenhimalnog podrijetla. Pojačana regulacija proteina HMGA često nastaje uslijed genskih alteracija poput amplifikacije i translokacije gena. Rearanžmani gena *HMGA2* osobito putem recipročnih translokacija (207), često su uočeni kod dobroćudnih novotvorina poput lipoma (208-215), uterinih leiomioma (216-221), plućnih hamartoma (222, 223), hondroma (224), endometroidnih polipa (225, 226), pleomorfnih adenoma žlijezda slinovnica (227-230), fibroadenoma (231) i adenolipoma dojke (207), te još nekih drugih mezenhimalnih novotvorina (232-237). Rearanžmani i prekomjerna ekspresija gena *HMGA2* opisani su i kod nekih nemezenhimalnih benignih humanih novotvorina, poput pituitarnih adenoma (238-243).

Međutim, ekspresija oba gena *HMGA* jaka je u malignim stanicama, kako *in vitro* (203), tako i *in vivo* (206, 244). Prekomjerna ekspresija proteina HMGA česta je osobina humanih zloćudnih novotvorina. Predstavlja loš prognostički čimbenik, jer njihova prekomjerna ekspresija često korelira s prisutnošću presadnica i lošijim preživljenjem. Nekoliko je studija naznačilo da proteini HMGA posjeduju onkogene aktivnosti, te da su uzročno povezani s neoplastičnom transformacijom. Neki stoga smatraju da se gen *HMGA2* može čak smatrati pravim onkogenom, koji je pojačano eksprimiran kod mnogih tumora (245). Drugi su skloniji mišljenju da *HMGA2* djeluje kao protoonkogen, koji negativno regulira neke tumorske supresore (178).

1.2.3.1. Uloga HMGA kod drugih zloćudnih novotvorina

Kod **planocelularnih karcinoma glave i vrata**, ekspresija proteina **HMGA1** bila je statistički značajno viša no kod uzoraka okolne zdrave mukoze. Utvrđena je korelacija visoke ekspresije HMGA1 i recidiva bolesti, no nije bilo značajne razlike u ekspresiji HMGA1 temeljem drugih kliničkih parametara kao što je klinički stadij bolesti, patološki gradus, te postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (246).

U istraživanju kod planocelularnih karcinoma usne šupljine, ekspresija **HMGA2** bila je prisutna u tkivima karcinoma, ali ne u okolnom zdravom tkivu, a korelirala je s povratom bolesti, smrću od posljedica tumora, te se u multivarijantnoj analizi pokazala kao neovisni prognostički čimbenik preživljenja ovisnog o bolesti (engl. *disease-specific overall survival*). Autori su zaključili da je ekspresija HMGA2 povezana s agresivnošću ovog tipa karcinoma te da bi mogla poslužiti kao koristan prediktivni i prognostički čimbenik (247).

Proteini **HMGA1** i **HMGA2** prekomjerno su eksprimirani u **karcinomima pluća nemalih stanica (NSCLC)**, kako planocelularnih tako i adenokarcinoma, što nije slučaj sa zdravim plućnim tkivom i tkivom kod benignih bolesti (248, 249). Intenzivna nuklearna ekspresija HMGA2 bila je jasno povezana s prisutnošću metastaza i lošom prognozom, te je temeljem multivarijantne Cox-analize, HMGA2 predstavljao neovisni prognostički čimbenik (249). Visoka ekspresija HMGA2 kod metastatskih adenokarcinoma, bila je povezana s progresijom karcinoma i metastaza, te lošijim preživljenjem (250, 251).

Nekoliko je istraživanja utvrdilo jaku ekspresiju **HMGA1** i **HMGA2** kod **pankreatičnih adenokarcinoma**, a njezin izostanak u zdravom tkivu pankreasa (252, 253). Ekspresija HMGA1 kod pankreatičnih adenokarcinoma korelirala je s uznapredovalim gradusom bolesti (253, 254). Prekomjerna ekspresija HMGA1 i HMGA2 bila je povezana s gubitkom diferencijacije i prisutnošću limfogenih presadnica, što bi ukazivalo na njihovu ulogu u neoplastičnoj transformaciji i progresiji (253, 255).

U nekoliko je istraživanja potvrđena izrazita ekspresija proteina **HMGA1** u tkivima karcinoma **kolorektuma**, te, za razliku od toga, gotovo nedetektibilna ekspresija u normalnoj mukozni. Ekspresija HMGA1 (postotak i intenzivnost pozitivnosti stanica) postupno se povećavala iz premalignih stadija preko adenoma do kolorektalnog karcinoma, kao i s invazivnošću, uznapredovalijim stadijem i prisutnošću hematogenih presadnica (256-262). Neneoplastični polipi nisu pokazivali prekomjernu ekspresiju HMGA1 (256, 259).

Uloga gena za **HMGA2** kod kolorektalnih karcinoma još je uvijek kontroverzna. Premda je jedna studija pokazala da je HMGA2 bio prekomjerno eksprimiran u tek 50% tkiva karcinoma kolona u usporedbi s prosječnom ekspresijom u okolnoj normalnoj mukozi (263), druga je studija pokazala da se ekspresija HMGA2 progresivno povećavala s porastom gradusa karcinoma (od Dukesa A prema D). U neneoplastičnim i ranim adenomima, nema ekspresije HMGA2 (264). Postoji izvješće o prekomjernoj ekspresiji HMGA2 kao o promotoru stvaranja metastaza i čimbeniku lošijeg preživljenja kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom (265).

Povišene razine **HMGA1** korelirale su s različitim stupnjevima patoloških promjena kod **adenokarcinoma jednjaka** – od displazije niskog, preko displazije visokog stupnja do adenokarcinoma (266). Visoka ekspresija **HMGA2** uočena je kod **planocelularnih karcinoma jednjaka**, a bila je odsutna u zdravim tkivima jednjaka (267).

U jednoj je studiji sugerirano da ekspresija **HMGA1** može biti povezana s malignim fenotipom kod **karcinoma želuca** (268). Kod karcinoma želuca ekspresija **HMGA2** u tkivima karcinoma bila je značajno viša no u nekanceroznim tkivima, a korelirala je s invazijom seroze i lošom kliničkom prognozom, te se u multivarijantnoj analizi pokazala kao neovisni prognostički čimbenik (269). Ekspresija HMGA2 bila je negativno regulirana putem let-7 miRNA.

Zanimljivo je da kod **hepatocelularnih karcinoma** nije zamijećena ekspresija **HMGA1** (270), međutim, ona je prisutna i povišena kako kod intrahepatičnih i ekstrahepatičnih **presadnica** HCC-a, intrahepatičnog kolangiokarcinoma, te u jetrenim presadnicama podrijetla kolorektalnog i pankreatičnog karcinoma (271). To bi se moglo iskoristiti za razlikovanje primarnih jetrenih karcinoma od presadnica u jetri. Ekspresija **HMGA2** pokazala se neovisnim čimbenikom loše prognoze kako kod hepatocelularnog karcinoma (272), tako i kod **intrahepatičnog kolangiokarcinoma** (273).

HMGA1 nije bio detektabilan u normalnom tkivu dojke, ali je u velikoj većini analiziranih uzoraka tkiva **karcinoma dojke**, prvenstveno duktalnih, bio prekomjerno eksprimiran u jednom istraživanju, no nije bila utvrđena povezanost s kliničko-patološkim parametrima. Prekomjerna ekspresija HMGA1 bila je u pozitivnoj korelaciji s prekomjernom ekspresijom HER-2 i progesteronskih receptora, dok je, iznenađujuće, bila negativno povezana s ekspresijom estrogenih receptora. Ovi su rezultati potvrdili prethodne (274), koji su pokazali da je bojenje na HMGA1 bilo vrlo intenzivno u oko 40% hiperplastičnih lezija

dojke koje karakterizira stanična atipija i u oko 60% duktalnih karcinoma dojke, dok je bojenje bilo slabo izraženo kod fibroadenoma i kod hiperplastičnih lezija bez celularne atipije. Pokazano je i da je ekspresija HMGA1 bila nedetektabilna u normalnom tkivu dojke, da je prekomjerna ekspresija HMGA1 korelirala s histološkim gradusima duktalnog karcinoma dojke, te da je bila povezana s ekspresijom HER-2 (274, 275). Na malom broju uzoraka lobularnih karcinoma dojke, bojenje na HMGA1 bilo je uvijek intenzivno (274, 276).

U jednoj je studiji analizirana ekspresija **HMGA2** u uzorcima karcinoma dojke iz različitih zemljopisnih područja. Jaka nuklearna ekspresija HMGA2 bila je uočena samo kod trostruko negativnih karcinoma dojke, ali ne i kod trostruko pozitivnih, kao niti u zdravom tkivu dojke iz neposredne blizine trostruko negativnih analiziranih uzoraka, te je bila povezana s preživljenjem (277). Zanimljivo je da je HMGA2 također detektiran kod filoidnih karcinoma dojke, te da je u slučaju kad je bila riječ o malignim ili granično malignim neoplazmama bio uvijek prekomjerno eksprimiran, a samo rijetko kod benignih neoplazmi (278), što sugerira njegovu uključenost u malignu transformaciju. Razina ekspresije proteina HMGA2 povezuje se s histološkim gradusom karcinoma dojke (279).

HMGA1 nije bio eksprimiran u zdravom epitelnom tkivu ovarija, ali je bio visoko eksprimiran kod invazivnih **karcinoma ovarija**, te slabo eksprimiran kod karcinoma ovarija niskog invazivnog potencijala (280).

HMGA2 bio je obilno i prekomjerno eksprimiran kod papilarnih seroznih karcinoma jajnika visokog gradusa i **karcinosarkoma** (281). Osim toga, prekomjerna ekspresija HMGA2 korelirala je s niskim razinama let-7, miRNA sposobne da cilja i potiskuje HMGA2, te je korelirala s p53 (281). Otkrivena je jaka povezanost i s indeksom tjelesne mase, BMI, te je kombinirana analiza ovih dviju varijabli predviđala kraći period bez prisutnosti bolesti (282). Druga studija, međutim, nije pokazala povezanost ekspresije HMGA2 s odgovorom na kemoterapiju i preživljenjem kod bolesnica s karcinomom ovarija (283). Uloga HMGA2 u indukciji i progresiji karcinoma ovarija bila je jasno pokazana u studiji u kojoj je pokazano da HMGA2 može povećati proliferaciju, migraciju i metastatski potencijal stanica karcinoma ovarija (284). U nedavnoj je studiji u visokom postotku bolesnica s karcinomom ovarija u njihovoj plazmi dokazana cirkulirajuća mRNA specifična za HMGA2, što nije bio slučaj kod zdravih dobrovoljki (285). U svih bolesnica kod kojih je u plazmi dokazana mRNA, u tkivima karcinoma ovarija utvrđena je prekomjerna ekspresija proteina HMGA2. Navedeno bi moglo biti korisno sredstvo za ranu dijagnostiku karcinoma ovarija.

Testikularni tumori zametnih stanica čine zanimljiv primjer gdje se određivanje ekspresije proteina HMGA pokazalo korisnom u diferencijalnoj dijagnozi. **HMGA2** bio je eksprimiran kod embrionalnih karcinoma i karcinoma žumanjčane vreće, ali ne kod seminoma i teratoma (286). Kod **HMGA1** ta je ekspresija bila nešto drugačija; bio je eksprimiran kod seminoma i embrionalnih karcinoma, ali ne kod karcinoma žumanjčane vreće niti kod teratoma (286).

Prekomjerna ekspresija **HMGA1** korelira s metastatskim potencijalom na kulturama stanica **karcinoma prostate** (287), a naknadno je dokazano i da korelira s visokim gradusom kod bolesnika s karcinomom prostate (288). U studijama na kulturama stanica karcinoma prostate, podaci ukazuju na povezanost **HMGA2** s invazivnošću, a smanjenje ekspresije poticalo je apoptozu (289).

Zanimljivo je da je kod **neoplazmi podrijetla glijalnih stanica**, ekspresija **HMGA1** i **HMGA2** suprotnog trenda porasta; ekspresija HMGA2 postupno pada od benignih astrocitoma prema malignom glioblastomu (290), dok za HMGA1 vrijedi suprotno (291).

Rezultati jedne nedavne studije pokazuju da je imunohistokemijska analiza **HMGA2** bila korisna pomoć u dijagnosticiranju **atipičnih lipomatoznih tumora i nediferenciranih liposarkoma** i njihovu razlikovanju od sličnih tvorbi, no u kombinaciji s imunohistokemijskom ekspresijom još nekih proteina (292). Signalni put u koji je uključen HMGA2 (HMGA2-IGF2BP2-NRAS) predstavlja ključni onkogeni čimbenik za razvitak **embrionalnog rabdiosarkoma** (293).

Nedavno je povezanost prekomjerne ekspresije **HMGA2** i agresivnosti (višeg gradusa i višeg kliničkog stadija karcinoma), utvrđena i kod **karcinoma mokraćnog mjehura** (294).

1.2.3.2. Ekspresija HMGA i zloćudne novotvorine štitnjače

Kod neoplazmi štitnjače isprva se istraživala ekspresija proteina **HMGA1** (244). U istraživanju Chiappette i sur., iz 1998. godine (295), protein HMGA1 bio je detektiran kod 18 od 19 folikularnih karcinoma štitnjače, 92 od 96 papilarnih, te 11 od 11 anaplastičnih karcinoma štitnjače. Također, njegova detekcija bila je utvrđena kod samo jednog od 20 hiperplastičnih čvorova štitnjače, 44 od 200 folikularnih adenoma, te niti u jednom od 12

uzoraka normalnog tkiva štitnjače. Uz to je sugerirana i korelacija između razina ekspresije HMGA1 i agresivnosti tumora, jer su najveće razine ekspresije bile registrirane kod anaplastičnih karcinoma, koji predstavljaju jedan od najagresivnijih karcinoma uopće, te su praktički neizbježno letalni. U navedenom istraživanju Chiappette i sur., korelacija između ekspresije HMGA1 i dijagnoze karcinoma bila je statistički visoko značajna ($P < 0.0001$).

Malobrojna su istraživanja o korelaciji **HMGA2** s neoplazmama štitnjače, bilo na razini proteina (metodom imunohistokemijskih analiza), bilo na razini mRNA (metodom kvantitativne reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu, qRT-PCR).

U istraživanju koje su 2008. godine proveli Belge i sur. (296), metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije gena *HMGA2* izoliranim iz 64 parafinska bloka tkiva štitnjače (3 uzorka normalnog tkiva štitnjače, 2 uzorka s tireoiditisom, 19 folikularnih adenoma, 9 folikularnih karcinoma, 28 papilarnih karcinoma, te 3 anaplastična karcinoma štitnjače). Između benignih i malignih tumora štitnjače zabilježena je razlika u ekspresiji do 400 puta. Temeljem ekspresije HMGA2 bilo je moguće razlikovati benigna i maligna tkiva štitnjače s osjetljivošću od 95,9% i specifičnošću od 93,9%, što je bilo visoko statistički značajno ($P < 0.001$). Ovo je bila jedna od prvih naznaka da ekspresija *HMGA2* ima potencijal poboljšanja dijagnoze neoplazmi štitnjače.

U istraživanju Chiappette i sur. iz 2008. godine (297), analizirana je ekspresija gena *HMGA2* (metodom qRT-PCR) usporedno s analizom ekspresije proteina HMGA2 (metodom imunohistokemije) u uzorcima zdravog i neoplastičnog tkiva štitnjače kod ukupno 128 ispitanika. Neki uzorci DKŠ koji su analizom qRT-PCR bili pozitivni, bili su negativni imunohistokemijskom analizom, što ukazuje na veću osjetljivost qRT-PCR. Posljedično je, za razliku od imunohistokemijske analize, gdje nije bila uočena statistički značajna razlika između ekspresije proteina HMGA2 između FKŠ i FA, ta razlika bila statistički značajna kod provođenja qRT-PCR. U tom istraživanju nije utvrđena korelacija između pozitivnosti na HMGA2 i histoloških obilježja ili kliničkog tijeka ni kod folikularnih ni kod papilarnih karcinoma štitnjače. Zaključak tog rada bio je da je analiza putem qRT-PCR osjetljivija metoda od imunohistokemije za određivanje prisutnosti HMGA2 kod bolesnika s neoplazmama štitnjače, te bi se mogla koristiti kao potencijalna dijagnostička pretraga u razlikovanju benignih od malignih novotvorina štitnjače.

Nakon toga, pokušalo se predoperacijski analizirati mogućnost razlikovanja benignih od malignih čvorova štitnjače iz citoloških razmaza osoba koje su u nalazu citološke punkcije imale dijagnozu citološkog nalaza suspektnog na malignost. Lappinga i sur. (298) iz Klinike Mayo su godine 2010. metodom qRT-PCR analizirali 125 takvih slučajeva. U 115 slučajeva analiza je uspjela. Kao pozitivna kontrola korištena je kultura stanica karcinoma štitnjače. Istraživanje je pokazalo osjetljivost 71%, specifičnost 97%, pozitivnu prediktivnu vrijednost 94%, te negativnu prediktivnu vrijednost 84% u otkrivanju malignih čvorova u štitnjači analiziranjem prekomjerne ekspresije *HMGA2*. Međutim, kod karcinoma Hürthleovih stanica senzitivnost je bila vrlo niska (33%). Autori zaključuju da je riječ o obećavajućoj dodatnoj analizi u predoperacijskom razlikovanju benignih od malignih citoloških razmaza štitnjače, no smatraju da je negativna prediktivna vrijednost od 84% preniska kako bi se otklonila potreba za operacijom kod bolesnika koji imaju neodređeni tj. suspekti citološki nalaz i izostanak prekomjerne ekspresije *HMGA2*.

God. 2011., Jin i sur. su metodom qRT-PCR pokazali značajno višu ekspresiju gena *HMGA2* u usporedbi s benignim lezijama (osim kod karcinoma Hürthleovih stanica) sa specifičnošću 97,5% (za PH-uzorke), odnosno 95,2% (za FNA-uzorke), te osjetljivošću od 79,8% (za PH-uzorke), odnosno 88,6% (za FNA-uzorke) (299).

Međutim, nisu sva naknadna istraživanja u potpunosti potvrdila ove rezultate. Tako u analizi Nagara i sur. iz 2014. godine, premda na malom broju bolesnika (N=52), evaluacija triju potencijalnih genskih biomarkera za razlikovanje benignih od malignih neoplazmi štitnjače nije utvrdila statistički značajnu prekomjernu ekspresiju *HMGA2* metodom RT-PCR u razlikovanju benignih od malignih neoplazmi štitnjače, osim za podskupinu folikularne varijante papilarnog karcinoma štitnjače (300).

Odnedavno se pokušava kombinirati nekoliko različitih potencijalnih tumorskih biljega za lakše razlikovanje benignih od malignih neoplazmi štitnjače, jer se tada obično povećava osjetljivost ili negativna prediktivna vrijednost. Tako su Foukakis i sur. iz Instituta Karolinska analizirali panel od čak 26 potencijalnih biljega za malignost folikularnih karcinoma štitnjače, no zanimljivo, niti jedan od njih nije bio *HMGA2* (ni *HMGA1*). Od 26 analiziranih, pet je gena uključeno u algoritam za predviđanje visokog rizika malignosti (301). Analizom ekspresije triju različitih gena, od kojih je jedan bio *HMGA2*, Prasad i sur. su detektirali malignost u čvorovima štitnjače s osjetljivošću od 71% te specifičnošću od 84% na uzorcima dobivenima putem FNA (302).

Odlični rezultati kombinacijom dvaju potencijalnih biljega za razlikovanje benignih od malignih neoplazmi štitnjače, od kojih je jedan od tih dvaju biljega bio *HMGA2*, objavljeni su nedavno, godine 2015., od strane Jina i sur. iz, ponovno iz Klinike Mayo (303). Cilj je bio evaluirati kombinaciju ekspresije *HMGA2* i *IMP3* metodom qRT-PCR-a na uzorcima dobivenima ciljanom citološkom punkcijom (120 bolesnika – 56 benignih, od čega 20 s folikularnim adenomima, te 64 diferencirana karcinoma štitnjače), uz dodatnu analizu iz parafinskih blokova na malo više od polovice bolesnika, njih 66. U uzorcima FNA, ekspresija oba biljega bila je viša kod malignih neoplazmi no kod benignih u svim podgrupama bolesnika osim onih s neoplazmama Hürthleovih stanica, pa su oni isključeni iz statističke analize. Autori su zaključili da *HMGA2* s visokom specifičnošću može pomoći u klasifikaciji uzoraka štitnjače, osim kad je riječ o neoplazmama Hürthleovih stanica, te da kombinacija *HMGA2* i *IMP3* ima još veću osjetljivost i negativnu prediktivnu vrijednost od 96,4% te da je korisna u probiru citoloških uzoraka štitnjače.

Nedostatak svih ovih istraživanja jest što su provođena na relativno malom broju bolesnika - osobito se to odnosi na veličinu uzoraka zdravog tkiva štitnjače ili neneoplastičnog tkiva (poput nodozne strume), veličinu uzoraka folikularnih adenoma, pa i veličinu uzoraka diferenciranih karcinoma štitnjače, a ponegdje su analizirani i bolesnici s anaplastičnim karcinomima štitnjače, koji predstavljaju potpuno zasebne patohistološke i kliničke entitete. U nekim su istraživanjima iz statističke analize eliminirani neki podtipovi neoplazmi štitnjače koji su „kvarili“ statističke podatke, poput maloprije navedenih Hürthleovih neoplazmi.

Također, prema dostupnim nam podacima iz literature, do sada nema podataka o eventualnoj korelaciji između ekspresije gena *HMGA2* i kliničke uznapređovalosti te kliničkog tijeka kod diferenciranih karcinoma štitnjače, a o eventualnoj povezanosti patohistoloških čimbenika s ekspresijom *HMGA2* podaci su vrlo oskudni i nekonzistentni.

2. HIPOTEZA

Razina ekspresije gena *HMGA2* viša je kod diferenciranih karcinoma nego kod benignih neoplazmi i zdravog tkiva štitnjače, a povezana je s klinički uznapredovalijim oblicima diferenciranih karcinoma štitnjače te je najviša kod bolesnika s hematogenim presadnicama, a najniža kod karcinoma ograničenih na štitnjaču.

3. CILJEVI RADA

- 1.) odrediti razinu ekspresije gena *HMGA2* iz tumorskog tkiva bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače različite kliničke uznapređovalosti (ograničeni na štitnjaču, s limfogenim presadnicama, s hematogenim presadnicama), te kod benignih neoplazmi štitnjače i zdravih tkiva štitnjače;
- 2.) utvrditi postoji li razlika u razini ekspresije gena *HMGA2* između diferenciranih karcinoma štitnjače, benignih neoplazmi štitnjače (folikularnih adenoma) i zdravog tkiva štitnjače;
- 3.) utvrditi postoji li razlika u razini ekspresije gena *HMGA2* kod različitih stupnjeva kliničke uznapređovalosti diferenciranih karcinoma štitnjače (ograničeni na štitnjaču, s limfogenim presadnicama, s hematogenim presadnicama).

4. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

4.1. Ispitanici

Ovo je istraživanje retrospektivno i provedeno je na uzorku od ukupno 222 ispitanika. Od toga je 113 ispitanika izabrano iz baze podataka bolesnika liječenih zbog karcinoma štitnjače u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC „Sestre milosrdnice“, Zagreb, u razdoblju od 2003. do 2016. godine, kojima su prethodnom patohistološkom analizom (PHD-om) utvrđeni diferencirani karcinomi štitnjače (papilarni, folikularni), različitog kliničkog stadija – bolesnici s karcinomom ograničenim na štitnjaču tj. T+N0M0, bolesnici s limfogenim presadnicama tj. T+N1M0, te bolesnici s hematogenim presadnicama tj. T+N+/-M1. Preostalih 109 bolesnika izabrano je iz baze podataka bolesnika operiranih zbog folikularnog adenoma ili nodozne strume u KBC „Sestre milosrdnice“, Zagreb. Bolesnici s operiranom nodoznom strumom koristili su se kao kontrolna skupina u koje se očekuje niska razina ekspresije HMGA2.

Svi su ispitanici ispunili obrazac sastavljen po pravilima Helsinške deklaracije, koji predstavlja informirani pristanak i suglasnost za sudjelovanje u istraživanju uz poštivanje anonimnosti bolesnika. U slučaju smrti bolesnika, najbliži srodnik bolesnika ispunio je navedeni obrazac tj. informirani pristanak uz suglasnost za korištenje uzoraka tkiva u navedenom istraživanju.

Analizirano je:

- 45 uzoraka tkiva diferenciranih karcinoma štitnjače (papilarnih, folikularnih) ograničenih na štitnjaču - T+N0M0
- 45 uzoraka tkiva diferenciranih karcinoma štitnjače (papilarnih, folikularnih) s limfogenim presadnicama - T+N1M0
- 23 uzorka tkiva diferenciranih karcinoma štitnjače (papilarnih, folikularnih) s hematogenim presadnicama - T+N+/-M1
- 55 uzoraka tkiva benignih tumora štitnjače (folikularnih adenoma)
- 54 uzorka tkiva nodoznih struma, koji su poslužili kao kontrolna skupina.

4.2. Prikupljanje uzoraka i podataka

Nakon potpisivanja informiranog pristanka prikupljeni su klinički podaci o ispitanicima, koji su uključivali podatke o dobi, spolu, datumu operacije štitnjače, te patohistološkoj dijagnozi.

Kod bolesnika sa zloćudnim novotvorinama, dodatno su prikupljeni sljedeći podaci: detalji iz patohistološkog nalaza - podtip diferenciranog karcinoma štitnjače, veličina primarnog tumora, podatak je li, ukoliko je bila riječ o papilarnom karcinomu štitnjače, on bio papilarni mikrokarcinom, je li primarni tumor bio multicentričan, te eventualna prisutnost sljedećih čimbenika - proboja kapsule štitnjače tumorskim tkivom, tzv. ekstratireoidne ekstenzije (ETE), infiltracije kapsule štitnjače, infiltracije okolnog masnog i vezivnog tkiva, invazije dalje u okolinu, limfovaskularne invazije, a u slučaju pozitivnih cervikalnih limfnih čvorova - podaci o njihovoj lokalizaciji po regijama vrata, broju pozitivnih limfnih čvorova, te eventualnom proboju kapsule limfnog čvora.

Iz medicinske dokumentacije i baze podataka o bolesnicima dodatno su, kod bolesnika sa zloćudnim novotvorinama, prikupljeni i klinički podaci, i to kako slijedi: eventualna prisutnost hematogenih presadnica u trenutku postavljanja dijagnoze, te u slučaju njihova postojanja - njihova sijela, radikalnost operativnog zahvata, postoperacijska vrijednost tumorskog biljega tireoglobulina (Tg) iz seruma ispitanika, te vrijednost tireoglobulina kod zadnje kontrole, postoperacijska vrijednost antitireoglobulinskih protutijela (Tg-At) iz seruma ispitanika, te ista vrijednost kod zadnje kontrole, aplicirana kumulacijska doza radioaktivnog joda, avidnost/neavidnost na radioaktivni jod, eventualno provođenje kemoterapije, radioterapije vanjskim snopovima, ili neke druge terapije zbog karcinoma štitnjače, eventualna pojava lokoregionalnog recidiva ili hematogene diseminacije bolesti tijekom praćenja bolesnika, svrstavanje bolesnika u rizične kategorije prema sustavu stratifikacije rizičnosti diferenciranih karcinoma štitnjače po preporuci Američkog društva za štitnjaču (ATA) iz njihovih smjernica za 2015. godinu, odgovor na provedenu terapiju tj. klinički ishod bolesti prema podjeli ATA iz smjernica za 2015. godinu, podatak je li bolesnik živ, a ako je umro - je li umro od posljedica karcinoma štitnjače, prati li se bolesnik i dalje ili je izgubljen u praćenju. Bolesnici su klasificirani i prema TNM – klasifikaciji diferenciranih karcinoma štitnjače prema AJCC/UICC, te prema stadiju bolesti diferenciranih karcinoma štitnjače prema AJCC/UICC.

Ispitanici su izabrani među bolesnicima Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC "Sestre milosrdnice", Zagreb, a uzorci su preuzeti iz arhivskog materijala Kliničkog zavoda za patologiju "Ljudevit Jurak".

Kirurški uzorak obrađen je standardnim postupkom za dobivanje patohistoloških preparata koji uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu, dehidriranje u uzlaznom nizu alkohola, uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniranje u ksilolu i bojenje standardnom metodom hemalaunom i eozinom (H&E). Na HE-prerezima označeno je područje koje će se koristiti za analizu.

Iz parafinske kocke svakog ispitanika pripremljena su dva reza debljine 5 µm, koja su potom odmah korištena za izolaciju ukupne RNA.

4.3. Uzgoj stanične kulture

U radu je korištena stanična linija humanog folikularnog karcinoma štitnjače FTC-133 podrijetla iz presadnica limfnog čvora a ne iz primarnog tumora (Sigma). Stanična linija korištena je kao uzorak za normaliziranje genske ekspresije u svim analiziranim uzorcima bolesnika kako bi se oni mogli međusobno uspoređivati.

Stanice su kultivirane u sterilnim uvjetima u plastičnim Petri zdjelicama za adherentne stanične kulture (Nunc) u termostatu pri 37°C u struji zraka s 5% CO₂, relativne vlažnosti 95%. Kao hranidbeni medij korišten je Dulbecov modificirani minimalni medij DMEM:Ham's F12 (1:1), uz dodatak 2 mM glutamina, obogaćen s 10% telećeg fetalnog seruma, 115 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina. Stanice su kultivirane do 70% konfluentnosti. Za presađivanje stanica medij je odsisan, stanice dva puta isprane PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ × 7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄) nakon čega je dodana 0,25% otopina tripsina-EDTA te su stanice inkubirane u termostatu 1 minutu. Proteolitički je učinak tripsina dokinut dodatkom medija sa serumom. Stanice su brojane automatskim brojačem stanica (Coulter), a vijabilnost stanica provjerena je pod svjetlosnim mikroskopom u hemocitometru nakon bojanja tripanskim modrilom. Za izolaciju RNA korištene su stanice šestog ciklusa presađivanja čija je vijabilnost bila veća od 99%.

4.4. Izolacija ukupne RNA iz stanica stanične linije FTC-133

Ukupna RNA izolirana je iz stanica stanične linije FTC-133 uporabom kompleta Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), sukladno napucima proizvođača. Ukratko, stanice (3×10^6) su sakupljene, oprane u PBS te lizirane dodatkom 350 μ l pufera za lizu/1% β -merkaptetanol. Lizat je filtriran kroz RNAspin Mini Filter kolonu, te je u njega potom dodano 350 μ l 70% etanola u vodi kako bi se podesili uvjeti vezanja na kolonu te je tako priređena smjesa nanijeta na RNAspin Mini kolonu. Nakon centrifugiranja 30 sekundi pri 8000g filtrat je odbačen, kroz kolonu je propušten pufer za uklanjanje soli, nakon čega je kolona osušena. Na kolonu je dodana otopina DNaze I te je razgradnja vezane DNA provedena tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Kolona je potom isprana puferom za ispiranje I te dva puta puferom za ispiranje II (nakon dodatka svakog pojedinog pufera uslijedilo je centrifugiranje 1 min pri 11000g i odbacivanje filtrata). Ukupna RNA s kolone je eluirana RNase-slobodnom vodom (55 μ l) uz centrifugiranje 1 min pri 11000g. Alikvot 15 μ l odvojen je za mjerenje koncentracije, čistoće i integriteta RNA, a ostatak izolata korišten je za reverznu transkripciju. Oba izolata pohranjena su na -80°C do uporabe.

4.5. Izolacija ukupne RNA iz tkiva uklopljenog u parafin

Ukupna RNA izolirana je iz po dva reza tkiva uklopljenog u parafin debljine 5 μ m uporabom kompleta RNeasy[®] FFPE Kit, sukladno napucima proizvođača. Ukratko, na rezove tkiva dodano je 1 mL ksilena za deparafinizaciju. Nakon uklanjanja ksilena s parafinom, na rezove je dodan 100%-tni etanol za ispiranje, a nakon njegova uklanjanja na talog je dodana otopina proteinaze K u puferu za lizu kako bi se omogućilo oslobađanje RNA iz stanica. Razgradnja proteina je provedena pri 56°C tijekom 15 minuta, a praćena je inkubacijom pri 80°C 15 minuta kako bi se eliminirao učinak formaldehida na nukleinske kiseline. Nakon hlađenja na ledu i centrifugiranja, supernatant koji sadrži nukleinske kiseline je odijeljen od taloga te je u njega dodana otopina DNaze I u odgovarajućem puferu. Razgradnja DNA provedena je pri sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Potom je u otopinu dodan pufer RBC i 100%-tni etanol kako bi se podesili uvjeti vezanja na kolonu te je uzorak propušten kroz RNeasy MinElute kolonu. Kolona je potom isprana dva puta puferom RPE, a potom je ukupna RNA eluirana s kolone u 30 μ L RNase-slobodne vode. Postupak eluiranja ponovljen je nanošenjem eluata na

kolonu kako bi se povećalo iskorištenje izolacije i izolirala čim veća količina RNA. Svi spomenuti postupci praćeni su kratkim centrifugiranjima pri odgovarajućim brzinama. Alikvot 15 μ l odvojen je za mjerenje koncentracije, čistoće i integriteta RNA, a ostatak izolata korišten je za reverznu transkripciju. Oba izolata pohranjena su na -80°C do uporabe.

4.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i čistoće izolirane ukupne RNA

Koncentracija i čistoća izolirane ukupne RNA određena je mjerenjem apsorbancije 2 μ L izolata RNA pri 260 nm, odnosno omjera apsorbancija pri 260 nm i 280 nm, te omjera apsorbancija pri 260 i 230 nm na spektrofotometru Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Koncentraciju RNA u izolatima uređaj preračunava temeljem Lambert-Beerovog zakona koji opisuje linearnu povezanost apsorbancije i koncentracije te činjenice da RNA koncentracije 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ima vrijednost apsorbancije 1. Omjer A_{260}/A_{280} otopine čiste RNA je između 1,9 i 2,1, što je i bio slučaj kod svih analiziranih uzoraka. Omjer A_{260}/A_{230} za uzorke koji ne sadrže tragove gvanidin-izotiocijanata ili soli je oko 2, premda odstupanja od navedene vrijednosti ne moraju nužno utjecati na uspješnost reakcija koje se provode na izolatima RNA.

4.7. Određivanje čistoće i integriteta izolirane ukupne RNA elektroforezom u agaroznom gelu s formaldehidom

Uzorak za elektroforezu priređen je na sljedeći način: u 8 μ L otopljene RNA dodano 2 μ L 5 x pufera za nanošenje uzoraka RNA na elektroforezu (0,25% bromfenol plavo, 2,6% formaldehid, 20% glicerol, 20 mM natrijev acetat, 8 mM MOPS, 8 mM EDTA, 3% formamid, 1% otopina boje za bojanje nukleinskih kiselina GelRed), otopina je inkubirana 5 minuta pri 65°C i ohlađena na ledu. Uzorci su nanijeti u jažice 1,2% agaroznog gela priređenog u puferu konačnog sastava: 20 mM MOPS, 5 mM natrijev-acetat, 1 mM EDTA, pH 7,0 te 6,66% formaldehid. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu RNA (konačnog sastava: 20 mM MOPS, 5 mM natrijev acetat, 1 mM EDTA, 0,74% formaldehid, pH 7,0) i provodi se pri jakosti struje 5V/cm. Nakon što je boja bromfenol plavo dosegla 2/3 duljine gela, elektroforeza je prekinuta te je gel izložen UV-svjetlosti $\lambda = 254$ nm na transiluminatoru. Vizualizacija dviju jakih vrpca koje odgovaraju položajima 28 S i 18 S

rRNA (omjera intenziteta približno 2:1) dokaz je da je RNA intaktna, dočim nejasne vrpce i dodatne vrpce koje odgovaraju položajima manjih RNA ukazuju da je izolirana RNA djelomično ili u cijelosti degradirana.

4.8. Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *qRT-PCR, quantitative reverse transcription- real-time polymerase chain reaction*)

Reverzna transkripcija provedena je pomoću M-MLV reverzne transkriptaze (Invitrogen), sukladno napucima proizvođača, uz uporabu svih potrebnih reagensa istog proizvođača. Konačna reakcijska smjesa volumena 20 µL sadržavala je 10 µL izolata RNA (250 ng – 3,5 µg RNA), 100 ng nasumičnih heksanukleotidnih početnica, 0,5 mM deoksinukleozid-trifosfate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 50 mM Tris-HCl (pH 8,4), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40 U rekombinantnog inhibitora RNaze i 100 U reverzne transkriptaze M-MLV.

Reverzna transkripcija u konačnici je provedena inkubiranjem reakcijskih smjesa pri 25°C 10 min, pri 37°C 60 min te pri 70°C 15 min, uz završno hlađenje na +4°C. Uzorci cDNA pohranjeni su na -20°C do priređivanja reakcijskih smjesa za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

Reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu priređene su u ukupnom volumenu 20 µL u pločicama s 96 jažica i u konačnici su sadržavale: 1 x reagens za umnažanje TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 x TaqMan smjesu početnica i proba za umnažanje gena od interesa ili referentnog gena te 4 µL cDNA prethodno razrijeđene 5 x s RNaze, DNaze-slobodnom vodom. Smjese početnica i proba za umnažanje gena od interesa, *HMGA2*, te referentnog gena (*GAPDH*) pribavljene su od proizvođača Applied Biosystems kao već validirani reagensi čije koncentracije i reakcijske uvjete nije potrebno dodatno optimirati. Početnice su neobilježene a probe su obilježene fluorescentnom bojom FAM kao izvještavačem (engl. *reporter*) te kao prigušivač (engl. *quencher*) sadrže nefluorescentni prigušivač MGB, te obuhvaćaju granicu dvaju eksona kako bi se izbjegla detekcija mogućih zaostalih molekula DNA umjesto cDNA. Reakcija umnažanja gena od interesa i referentnog gena za svaki pojedini uzorak provedene su u odvojenim jažicama, u triplikatu, a svaka je reakcijska pločica sadržavala osim uzoraka za analizu i usporedni uzorak

u odnosu na koji je izražavana ekspresija (uzorak cDNA iz stanične linije FTC-133) te kao negativnu kontrolu uzorak koji je umjesto kalupa cDNA sadržavao vodu. Reakcija umnažanja i detekcije fluorescencije provedena je na instrumentu ABI PRISM 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems). Kvantitativni PCR odvijao se pri sljedećim uvjetima: 2 min pri 50°C, zatim 10 min pri 95°C (aktivacija DNA-polimeraze) i potom 45 ciklusa od po 15 sek pri 95°C (denaturacija dvolančane DNA) i po 1 min pri 60°C (sparivanje lanaca i sinteza DNA, korak u kojem se mjeri fluorescencija). U svrhu procjene jačine ekspresije svakog gena, aritmetičke sredine vrijednosti Ct (engl. *threshold cycle*), dobivene za gen *HMGA2* normirane su na vrijednosti aritmetičke sredine Ct dobivene za kontrolni gen *GAPDH* za isti uzorak cDNA (ΔCt). Kako bi se mogle međusobno uspoređivati jačine ekspresije *HMGA2* kod različitih ispitanika i na različitim reakcijskim pločicama, broj dva potenciran je na negativnu razliku vrijednosti ΔCt uzorka ispitanika i usporednog uzorka stanične linije ($\Delta\Delta Ct$). Dakle, razine ekspresije (engl. *relative fold ratio*, RFR) gena *HMGA2* svakog pojedinog ispitanika u odnosu na razinu ekspresije istog gena u staničnoj liniji FTC-133 izračunata je prema formuli:

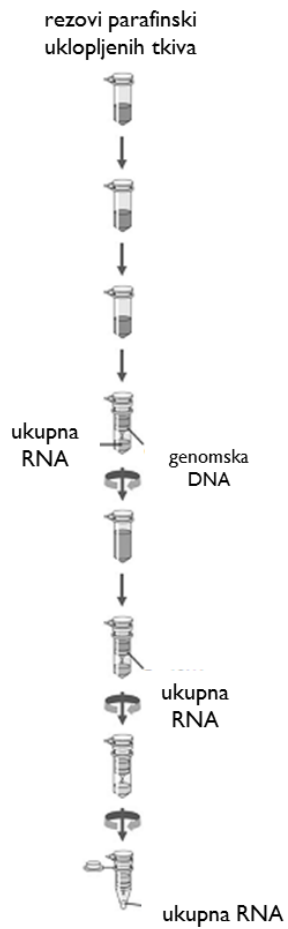
$$RFR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

pri čemu je

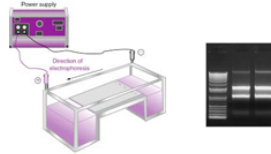
$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{testirani gen}} - Ct_{\text{referentni gen}})_{\text{uzorak}} - (Ct_{\text{testirani gen}} - Ct_{\text{referentni gen}})_{\text{usporedni uzorak}}$$

Shematski prikaz postupaka prikazan je na slici 4.

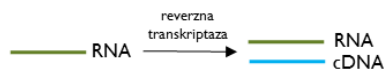
Isolacija RNA



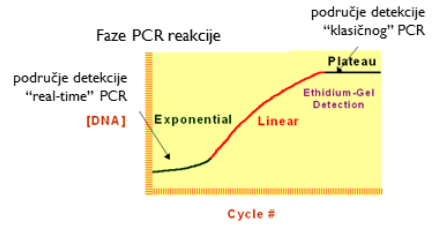
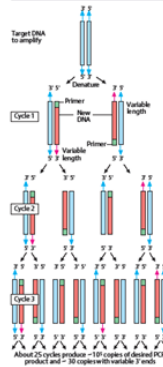
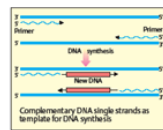
Elektroforeza RNA u agaroznom gelu



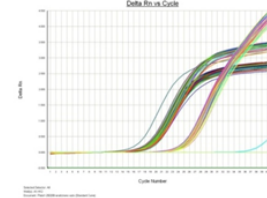
Reverzna transkripcija



qRT-PCR ("real-time RT-PCR")



detekcija produkata u ranoj fazi reakcije



Relativna razina ekspresije

$$= 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ HMGA2} - C_t \text{ GAPDH})_{\text{bolesni}} - (C_t \text{ HMGA2} - C_t \text{ GAPDH})_{\text{kontr.}}$$

Slika 4. Shematski prikaz postupaka

4.4. STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijske i nominalne vrijednosti prikazane su kroz odgovarajuće frekvencije i udjele, dok su se kvantitativne vrijednosti prikazale kroz medijane i interkvartilne raspone. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kvantitativnih podataka te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Usporedbe između kvantitativnih vrijednosti analizirane su Kruskal-Wallisovim testom, uz post-hoc analizu Mann-Whitney U testom s Bonferronijevom korekcijom kod ispitivanja razine ekspresija *HMGA2* između pojedinih skupina diferenciranih karcinoma štitnjače, folikularnih adenoma i nodoznih struma. Sve značajne razlike grafički su prikazane Box i Whiskerovim plotovima.

Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su X^2 testom, odnosno Fisher-Freeman-Halton egzaktnim testom u slučaju da je uzorak bio manji od 5. Povezanost pojedinih kliničkih parametara s ekspresijom *HMGA2* procijenjena je Spearmanovim koeficijentima korelacije. Načinjena je ROC-analiza predikcije malignosti u kojoj je navedena granična (*cut-off*) vrijednost ekspresije *HMGA2* s najvećom osjetljivošću i specifičnošću obzirom na Youdenov indeks.

Sve P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. U analizi se koristila statistička podrška StatsDirect statistical software (<http://www.statsdirect.com>. England: StatsDirect Ltd. 2013) verzija 3.0.171.

5. REZULTATI

5.1. Razina ekspresije gena *HMGA2* kod zloćudnih (diferenciranih karcinoma) i dobroćudnih (folikularnih adenoma) neoplazmi štitnjače te nodoznih struma

Kod bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače (N=113), medijan ekspresije gena *HMGA2* iznosio je 19,03, kod bolesnika s folikularnim adenomima (N=55) 0,76, a s nodoznom strumom (N=54) 0,74.

Usporedbom razine ekspresije gena *HMGA2* između svih bolesnika s malignim tumorima, tj. diferenciranim karcinomima štitnjače naspram svih bolesnika s benignim tumorima štitnjače, tj. folikularnim adenomima, uočena je statistički značajno veća ekspresija gena *HMGA2* kod bolesnika s malignim tumorima ($P < 0,001$).

Usporedbom razine ekspresije gena *HMGA2* između svih bolesnika s malignim tumorima, tj. diferenciranim karcinomima štitnjače naspram svih bolesnika s nodoznim strumama štitnjače, uočena je statistički značajno veća ekspresija gena *HMGA2* kod bolesnika s DKŠ naspram nodoznih struma ($P < 0,001$).

Nije uočena značajna razlika razine ekspresije gena *HMGA2* između uzoraka tkiva bolesnika s benignim tumorima štitnjače tj. folikularnim adenomima, naspram bolesnika s nodoznim strumama.

Sve navedeno prikazano je u tablici 6. i na slici 5.

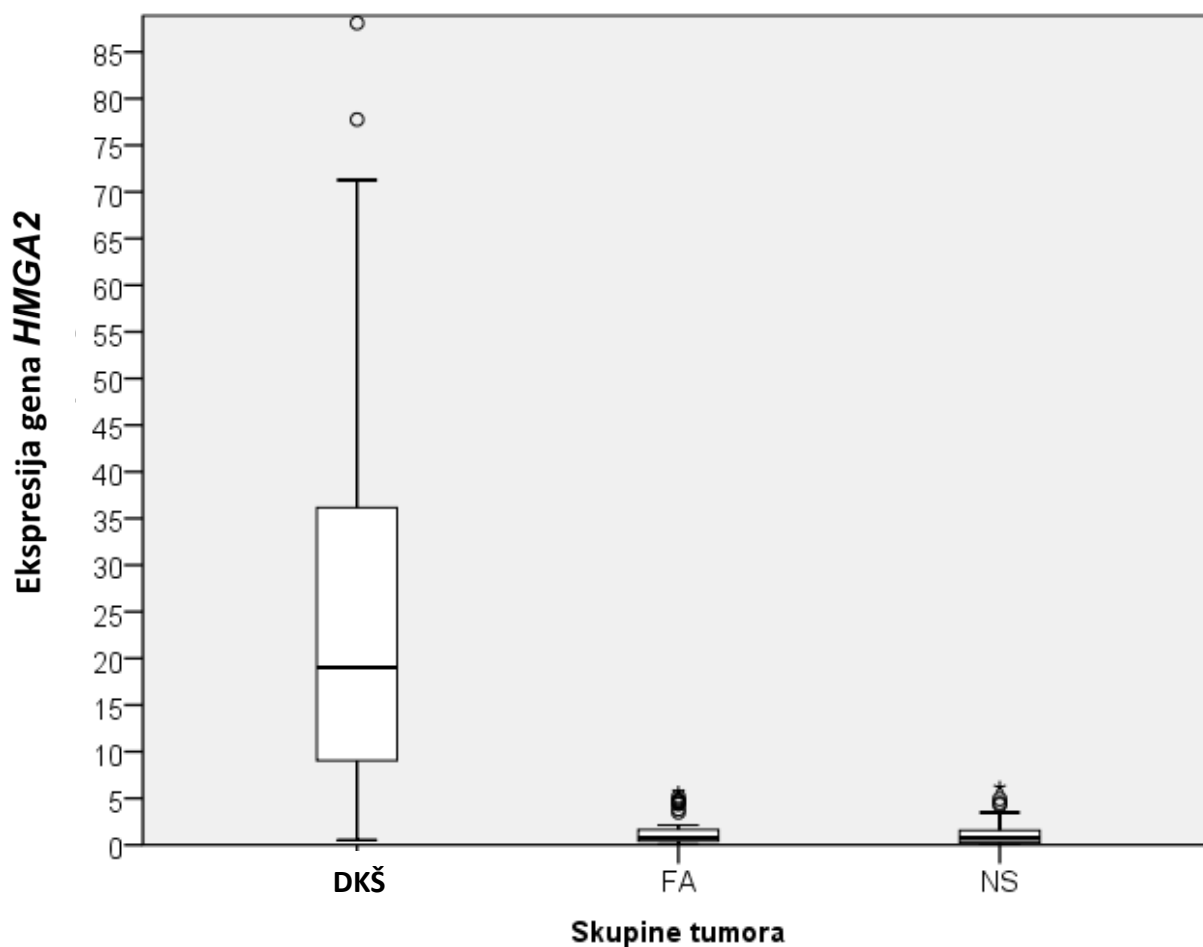
Tablica 6. Razina ekspresije gena *HMGA2* kod zloćudnih (diferencirani karcinomi) i dobroćudnih (folikularni adenomi) neoplazmi štitnjače i nodoznih struma te usporedba razine ekspresije *HMGA2* između DKŠ naspram FA te između DKŠ i NS: Mann-Whitney U test.

		Skupine					
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila
HMGA2 ekspresija	DKŠ	113	0,52	407,70	19,03	9,06	36,15
	FA	55	0,07	5,67	0,76	0,40	1,74
	NS	54	0,05	6,18	0,74	0,23	1,55

DKŠ vs. FA	HMGA2 ekspresija
Mann-Whitney U	211,000
Wilcoxon W	1751,000
Z	-9,790
P	<0,001

DKŠ vs. NS	HMGA2 ekspresija
Mann-Whitney U	170,000
Wilcoxon W	1655,000
Z	-9,857
P	<0,001

FA vs. NS	HMGA2 ekspresija
Mann-Whitney U	1377,000
Wilcoxon W	2862,000
Z	-,655
P	0,513



Slika 5. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* između ispitivanih skupina

5.2. Razina ekspresije gena *HMGA2* između različitih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače u ovisnosti o njihovoj kliničkoj uznapređovalosti

U tablici 7. i na slici 6. prikazana je razlika u ekspresiji gena *HMGA2* između pojedinih podskupina zloćudnih novotvorina prema njihovoj kliničkoj uznapređovalosti. Najveće vrijednosti ekspresije *HMGA2* zabilježene su kod tumora bolesnika s udaljenih metastazama, nakon toga kod tumora bolesnika sa zahvaćenošću regionalnih limfnih čvorova, a najniže kod bolesnika koji su imali karcinom ograničen na štitnjaču, tj. bez limfogenih ili hematogenih presadnica. Razlika u razini ekspresije *HMGA2* statistički je značajna između svih podskupina (bolesnici s udaljenim presadnicama naspram samo limfogenim – $P < 0,001$, bolesnici s udaljenim presadnicama naspram lokalizirane bolesti – $P < 0,001$, bolesnici s limfogenim presadnicama naspram lokalizirane bolesti – $P = 0,002$).

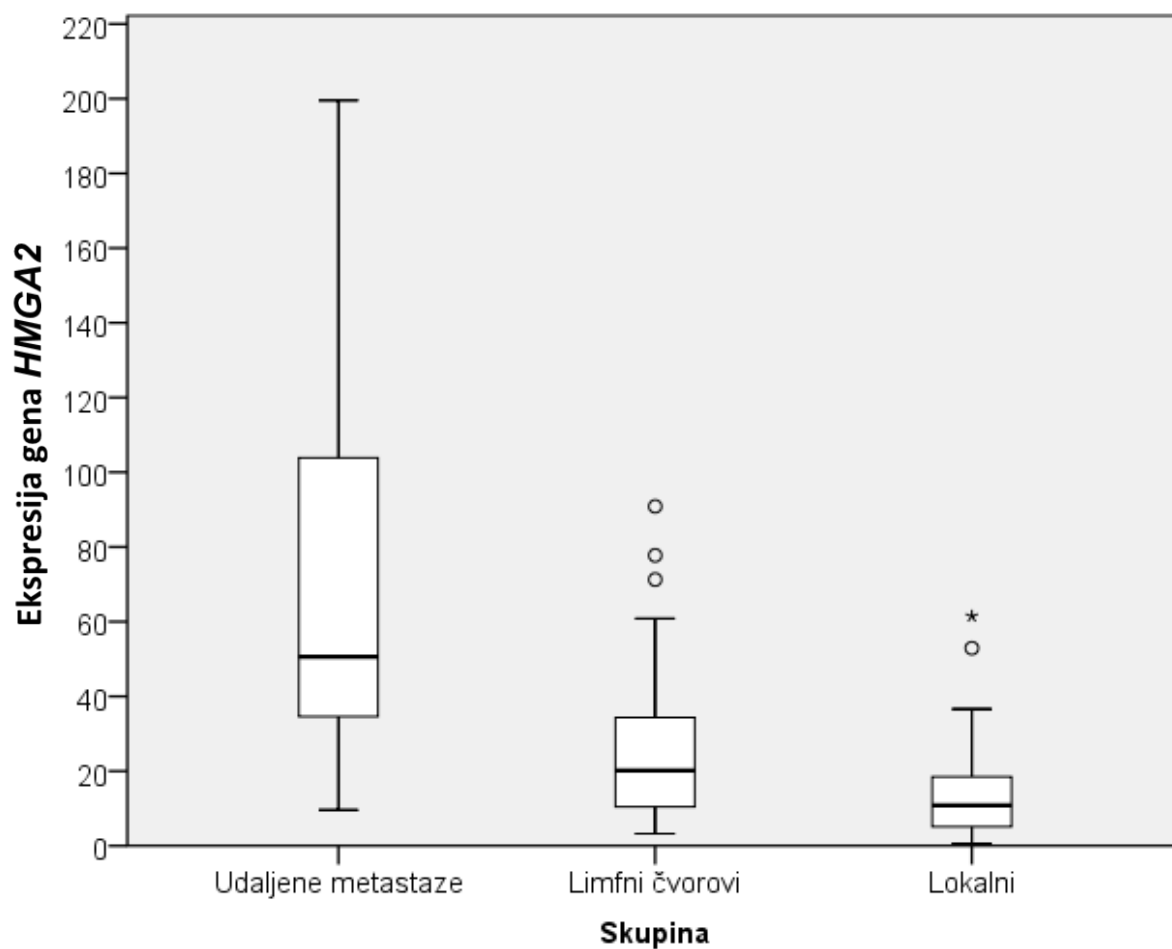
Tablica 7. Razlika u ekspresiji *HMGA2* između podskupina DKŠ prema kliničkoj uznapređovalosti: Mann-Whitney U test

		Skupina					
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila
<i>HMGA2</i> ekspresija	Udaljene metastaze	23	9,62	407,70	50,61	32,24	108,47
	Limfni čvorovi	45	3,27	90,85	20,15	10,42	34,34
	Lokalni	45	0,52	61,46	10,82	5,15	18,48

Udaljene metastaze vs. LČ	<i>HMGA2</i> ekspresija
Mann-Whitney U	183,500
Wilcoxon W	1218,500
Z	-4,330
P	<0,001

Udaljene metastaze vs. Lokalni	<i>HMGA2</i> ekspresija
Mann-Whitney U	93,000
Wilcoxon W	1128,000
Z	-5,503
P	<0,001

LČ vs. Lokalni	<i>HMGA2</i> ekspresija
Mann-Whitney U	633,000
Wilcoxon W	1668,000
Z	-3,062
P	0,002



Slika 6. Razlika u ekspresiji *HMGA2* između podskupina DKŠ prema kliničkoj uznapređovalosti

5.3. Razina ekspresije gena *HMGA2* između različitih podskupina bolesnika prema njihovim demografskim obilježjima

Nije uočena statistički značajne razlika u ekspresiji gena *HMGA2* s obzirom na dob bolesnika (bolesnici u dobi ≤ 45 god. naspram bolesnika u dobi > 45 god.) (tablice 8. i 9.), kao niti s obzirom na spol (tablice 10. i 11.),

Tablica 8. Razlika u ekspresiji *HMGA2* između dobnih skupina: Kruskal-Wallisov test

	Dob						P	
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila		
HMGA2 ekspresija	≤45 godina	49	0,59	199,52	20,50	8,96	47,10	0,390
	>45 godina	64	0,52	407,70	17,51	9,27	33,26	

Tablica 9. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u pojedinim podskupinama DKŠ, te kod FA i NS u odnosu na dobne skupine: Kruskal-Wallisov test

		Dob (skupine)						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	≤45 godina	10	28,20	199,52	50,16	47,10	99,24	0,535
	>45 godina	13	9,62	407,70	54,27	25,48	108,47	
Limfni čvorovi	≤45 godina	25	3,27	90,85	20,50	8,49	35,36	0,909
	>45 godina	20	7,28	60,84	19,66	12,12	31,48	
Lokalni	≤45 godina	14	0,59	61,46	10,46	4,59	17,00	0,941
	>45 godina	31	0,52	52,92	10,82	5,15	20,18	
FA	≤45 godina	24	0,07	4,74	0,65	0,37	1,60	0,368
	>45 godina	31	0,12	5,67	1,08	0,43	1,92	
NS	≤45 godina	14	0,05	4,92	0,63	0,38	1,72	0,859
	>45 godina	40	0,08	6,18	0,91	0,20	1,53	

Tablica 10. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na spol: Kruskal-Wallisov test

	Spol						P	
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila		
HMGA2 ekspresija	Muški	44	0,52	407,70	18,97	9,34	38,16	0,506
	Ženski	69	0,59	90,85	19,03	8,96	35,93	

Tablica 11. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u pojedinim podskupinama DKŠ, te kod FA i NS u odnosu na spol: Kruskal-Wallisov test

		Dob (skupine)						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	Muški	11	9,62	407,70	108,47	32,24	171,66	0,056
	Ženski	12	12,60	88,09	48,24	32,59	52,44	
Limfni čvorovi	Muški	21	6,23	71,27	20,15	12,11	33,76	0,716
	Ženski	24	3,27	90,85	20,02	9,72	35,48	
Lokalni	Muški	12	0,52	20,60	7,42	4,22	14,17	0,174
	Ženski	33	0,59	61,46	11,46	7,46	20,18	
FA	Muški	14	0,10	4,74	0,55	0,15	0,76	0,142
	Ženski	41	0,07	5,67	1,08	0,43	1,74	
NS	Muški	8	0,05	4,92	0,60	0,21	1,40	0,543
	Ženski	46	0,08	6,18	0,77	0,23	1,63	

5.4. Razina ekspresije gena *HMGA2* kod diferenciranih karcinoma štitnjače u ovisnosti o prisutnim patohistološkim čimbenicima bolesti

Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *HMGA2* prema patohistološkom podtipu DKŠ, niti kad su se promatrali zasebno PKŠ, FKŠ, FVPKŠ i ca. Hürthleovih stanica, niti kad su se dva potonja pribrojili u skupinu PKŠ, odnosno FKŠ (tablice 12. i 13.).

Tablica 12. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na podtipove diferenciranih karcinoma štitnjače: Kruskal-Wallisov test

		PHD						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
<i>HMGA2</i> ekspresija	Papilarni ca.	91	0,59	407,70	19,85	9,49	36,97	0,210
	Folikularni ca.	9	0,52	141,50	25,48	7,46	36,60	
	Hurthle cell ca.	3	0,67	13,14	1,57	0,67	13,14	
	FVPKŠ	10	5,15	58,34	15,52	9,96	21,51	

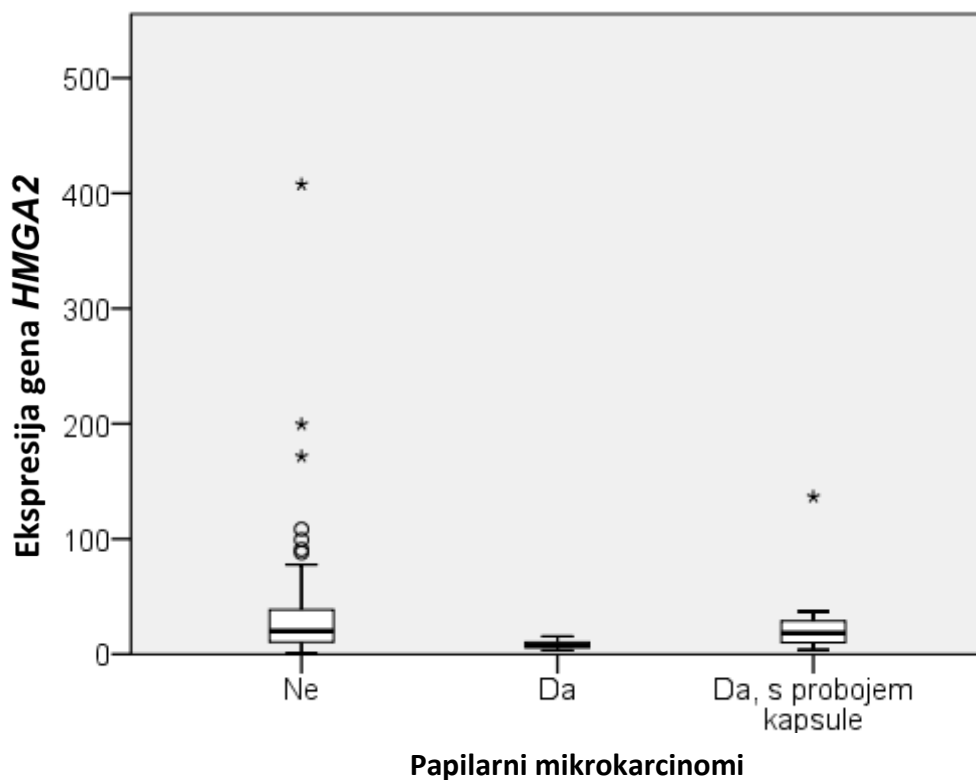
Tablica 13. Razlika u ekspresiji *HMGA2* između papilarnih i folikularnih karcinoma štitnjače:
Kruskal-Wallisov test

		PHD						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Papilarni ca.	101	0,59	407,70	19,46	9,49	36,15	0,310
	Folikularni ca.	12	0,52	141,50	12,78	2,16	36,27	

Značajna razlika u ekspresiji *HMGA2* zabilježena je kod papilarnih mikrokarcinoma štitnjače u usporedbi s onima koji to nisu bili ($P=0,021$), osobito kod bolesnika koji su bili stadija bolesti T1a, tj. bez proboja čahure štitnjače (tablica 14 i slika 7.).

Tablica 14. Razlika u ekspresiji *HMGA2* kod papilarnih mikrokarcinoma štitnjače (zasebno su prikazani oni sa i bez proboja kapsule) u usporedbi s papilarnim nemikrokarcinomima:
Kruskal-Wallisov test

		Papilarni mikrokarcinomi						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Ne	86	0,59	407,70	20,18	10,42	40,17	0,021
	Da – T1a	7	3,32	15,57	7,97	4,06	11,78	
	Da, s probojem kapsule (T3)	8	3,84	136,68	18,44	9,99	28,74	



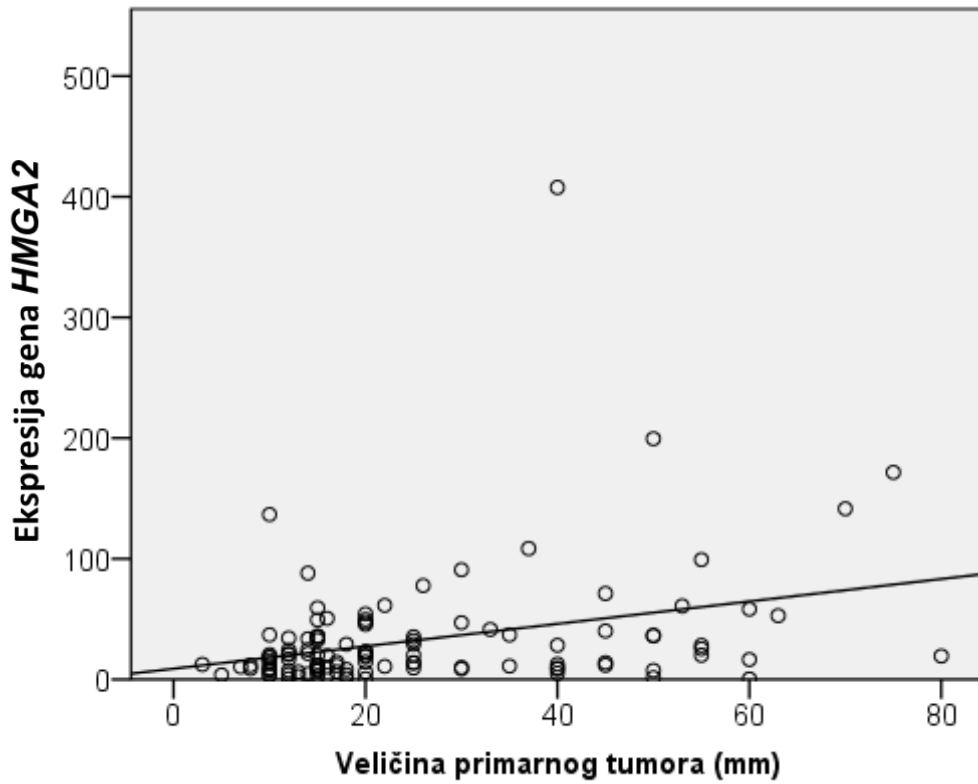
Slika 7. Razlika u ekspresiji *HMGA2* kod papilarnih mikrokarcinoma štitnjače (zasebno su prikazani oni sa i bez proboja kapsule) u usporedbi s papilarnim nemikrokarcinomima

U tablici 15. te na slikama od 8. do 12., prikazane su korelacije ekspresije gena *HMGA2* s pojedinim patohistološkim parametrima. Značajna pozitivna korelacija, odnosno veća ekspresija *HMGA2* povezana je s većim promjerom primarnog tumora, većim T-stadijem po AJCC/UICC, većim brojem patohistoloških čimbenika lošije prognoze (ovdje su promatrani ekstrakapsularna ekstenzija, nepovoljna histologija, limfovaskularna invazija, te pozitivni limfni čvorovi), kao i većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova.

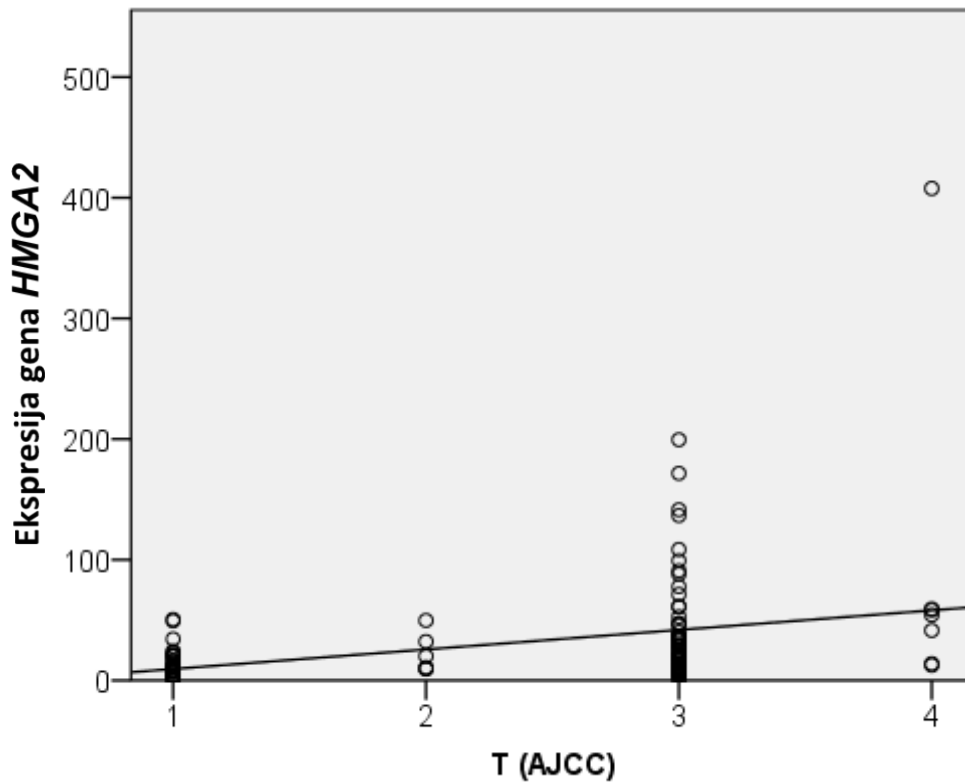
Zanimljivo, uočena je tek slaba pozitivna korelacija između ekspresije *HMGA2* bolesnika različitog stadija bolesti prema AJCC/UICC.

Tablica 15. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s promatranim patohistološkim čimbenicima:
Spearmanov koeficijent korelacije

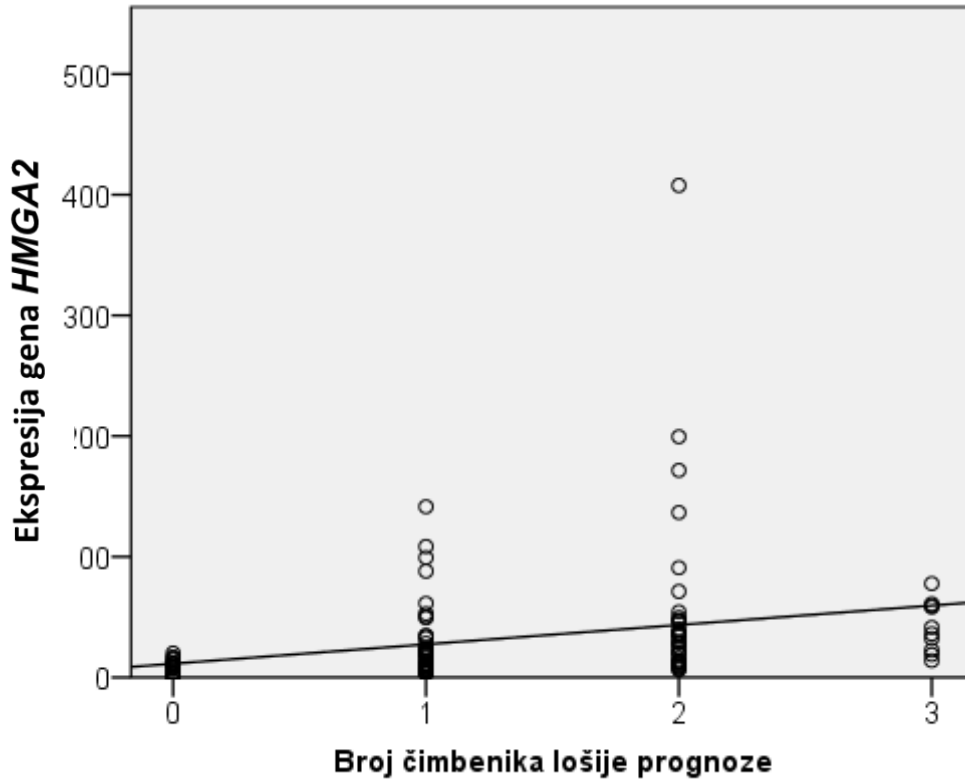
		<i>HMGA2</i> ekspresija
Veličina primarnog tumora (mm)	Korelacijski koeficijent rho	0,318
	P	0,001
	N	113
T (AJCC)	Korelacijski koeficijent rho	0,409
	P	<0,001
	N	113
Broj PH-čimbenika lošije prognoze	Korelacijski koeficijent rho	0,550
	P	<0,001
	N	113
Broj zahvaćenih limfnih čvorova	Korelacijski koeficijent rho	0,400
	P	<0,001
	N	113
Stadij bolesti prema AJCC	Korelacijski koeficijent rho	0,261
	P	0,005
	N	113



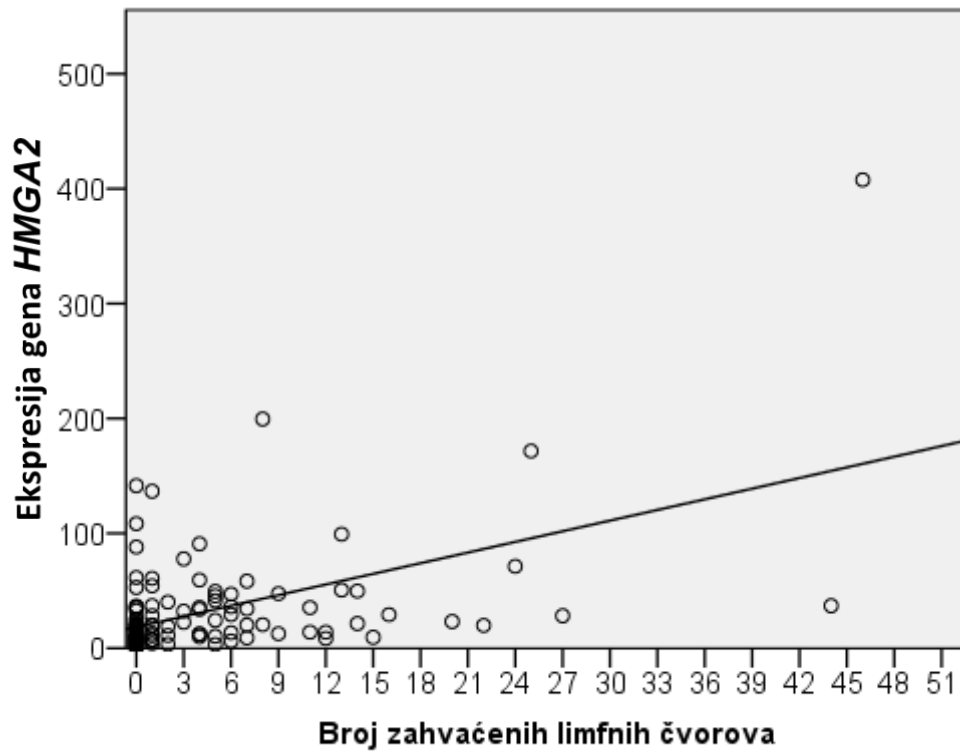
Slika 8. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s veličinom primarnog tumora



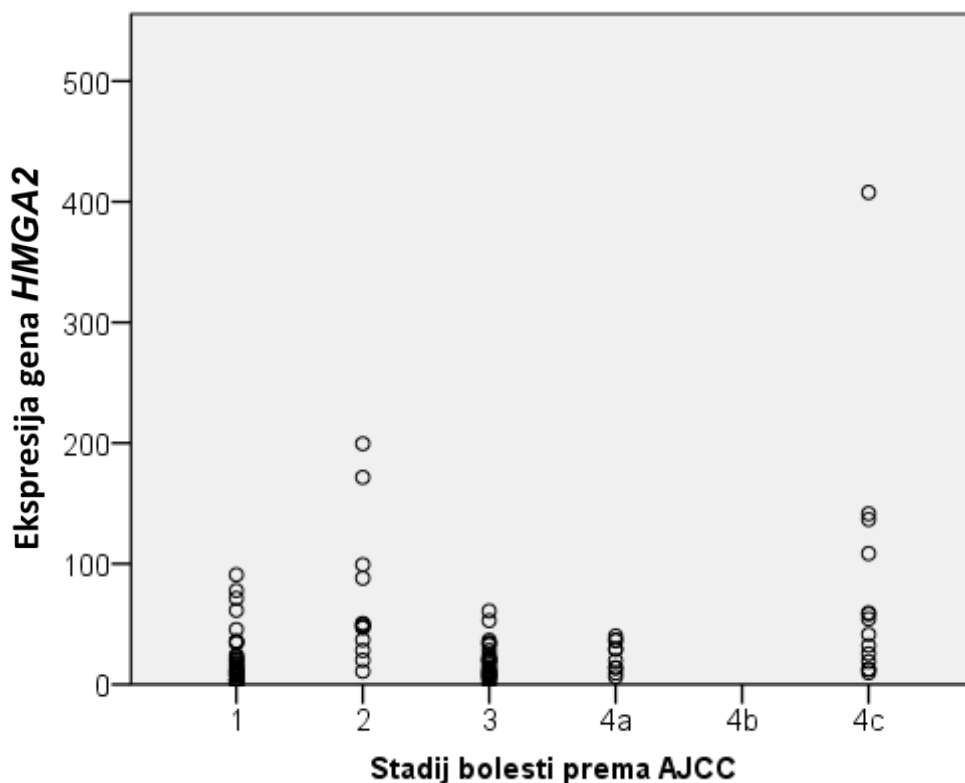
Slika 9. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s T-stadijem bolesti po AJCC/UICC



Slika 10. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s brojem PH-čimbenika lošije prognoze



Slika 11. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s brojem zahvaćenih limfnih čvorova

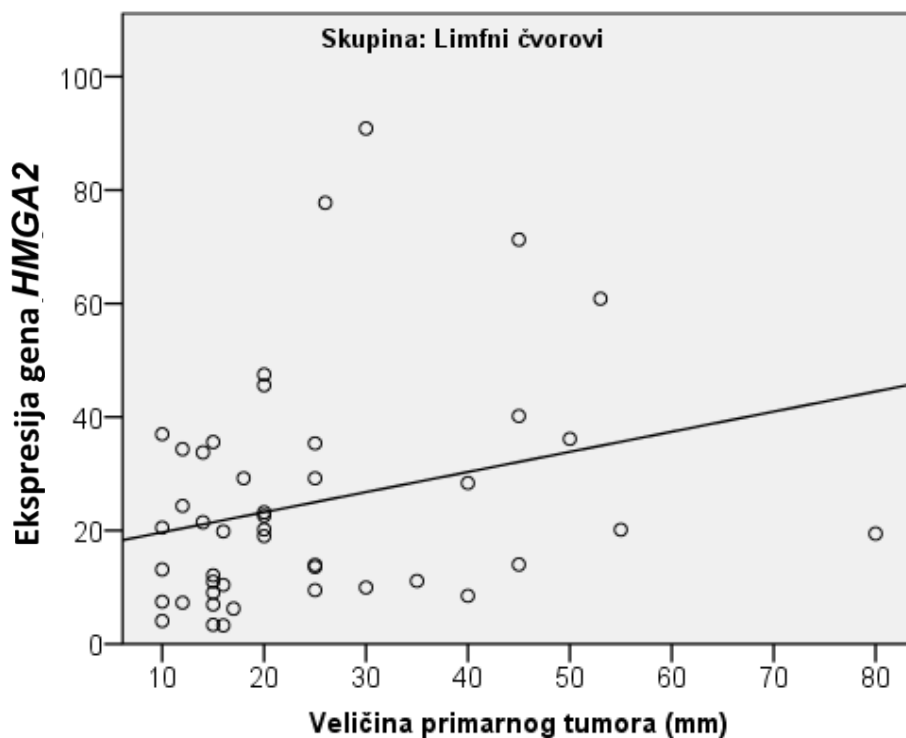


Slika 12. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* sa stadijem bolesti prema AJCC/UICC

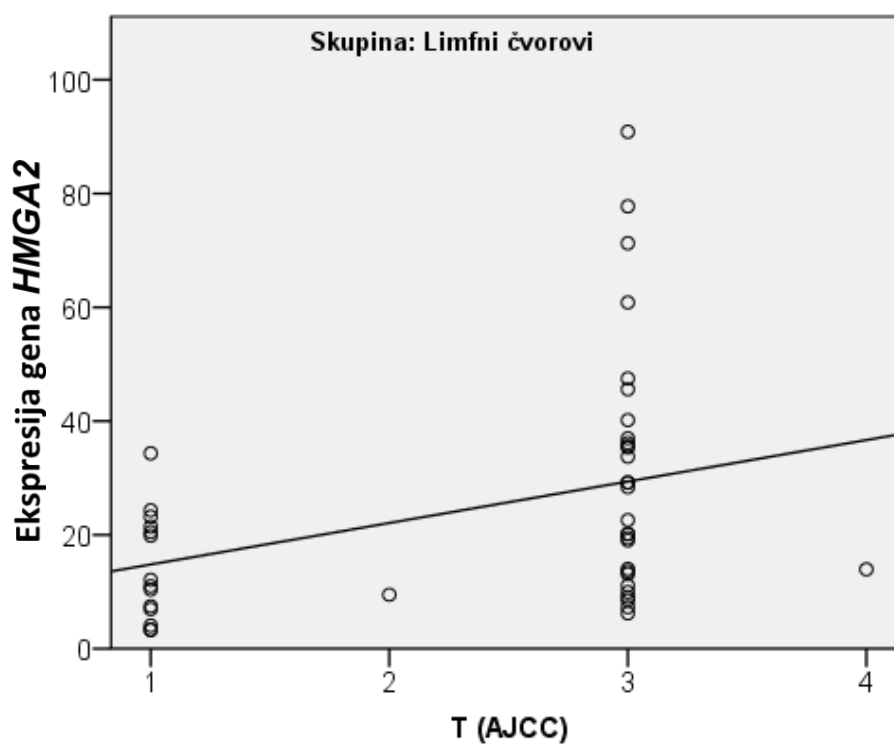
Korelacija ekspresije gena *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače prema kliničkoj uznapreovalosti (lokalizirana bolest, limfogeno ili hematogeno proširenost bolesti) s promatranim patohistološkim varijablama prikazana je u tablici 16. te na slikama 13. do 17. Kao i u tablici 15., naznačena je značajna pozitivna korelacija ekspresije *HMGA2* s pojedinim patohistološkim varijablama - promjerom primarnog tumora, T-stadijem prema AJCC/UICC, brojem PH-čimbenika lošije prognoze, te brojem zahvaćenih limfnih čvorova, a tek slaba pozitivna korelacija sa stadijem bolesti prema AJCC/UICC.

Tablica 16. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapredovalosti) s promatranim patohistološkim varijablama: Spearmanov koeficijent korelacije

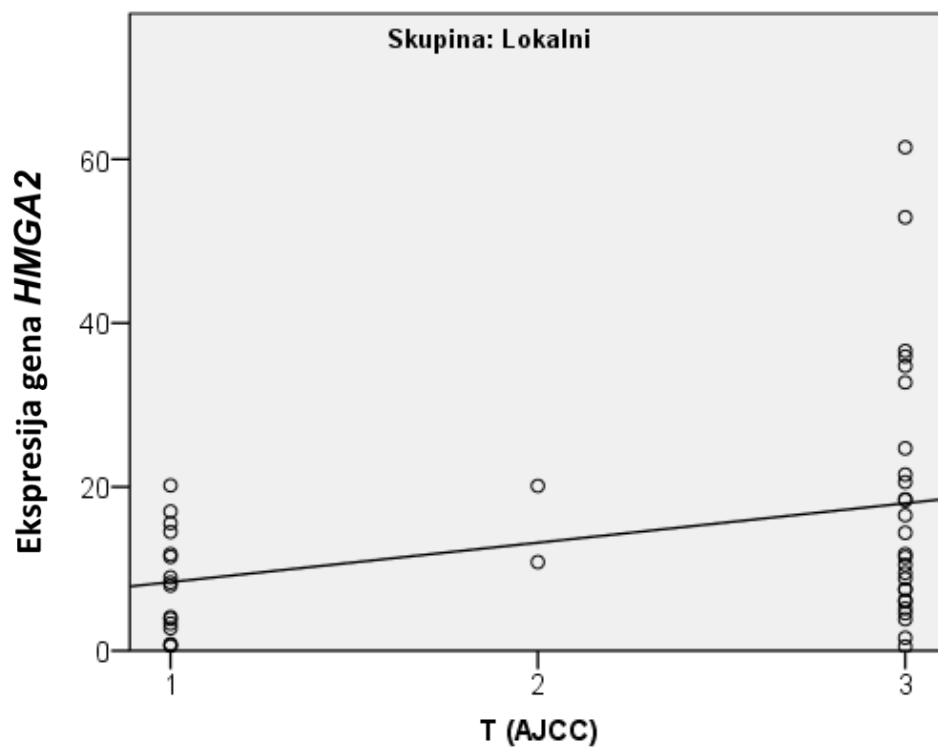
		Udaljene metastaze	Limfni čvorovi	Lokalno
		<i>HMGA2</i> ekspresija	<i>HMGA2</i> ekspresija	<i>HMGA2</i> ekspresija
Veličina primarnog tumora (mm)	Korelacijski koeficijent rho	0,179	0,315	0,036
	P	0,414	0,035	0,817
	N	23	45	45
T (AJCC)	Korelacijski koeficijent rho	0,297	0,373	0,312
	P	0,169	0,012	0,037
	N	23	45	45
Broj čimbenika lošije prognoze	Korelacijski koeficijent rho	-0,099	0,427	0,515
	P	0,654	0,003	<0,001
	N	23	45	45
Broj zahvaćenih limfnih čvorova	Korelacijski koeficijent rho	0,104	0,161	
	P	0,636	0,291	
	N	23	45	45
Stadij bolesti prema AJCC	Korelacijski koeficijent rho	-0,132	0,037	0,220
	P	0,548	0,809	0,146
	N	23	45	45



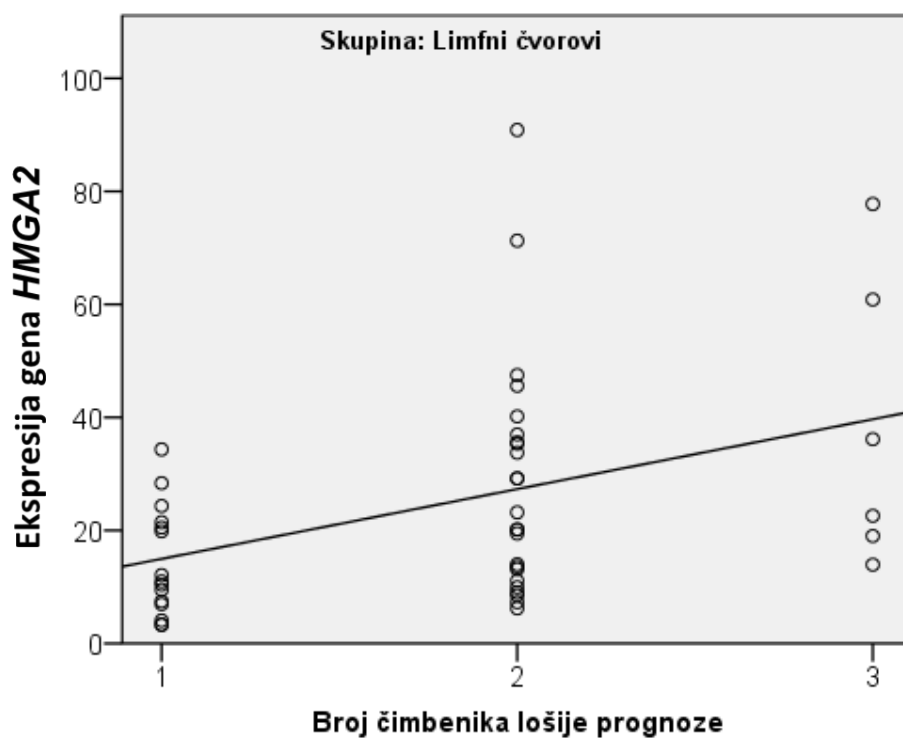
Slika 13. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s veličinom primarnog tumora u skupini bolesnika s DKŠ i pozitivnim limfnim čvorovima



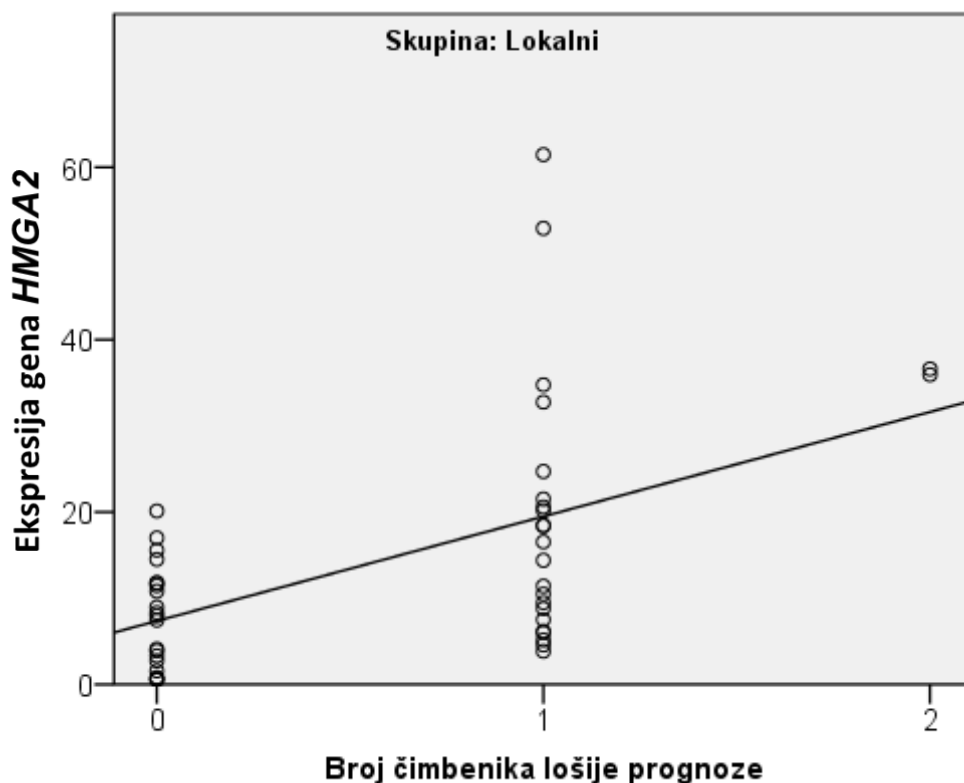
Slika 14. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s T-stadijem bolesti prema AJCC/UICC u skupini bolesnika s DKŠ i pozitivnim limfnim čvorovima



Slika 15. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s T-stadijem bolesti prema AJCC/UICC u skupini bolesnika s lokaliziranim DKŠ



Slika 16. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s brojem PH-čimbenika lošije prognoze u skupini bolesnika s DKŠ i pozitivnim limfnim čvorovima



Slika 17. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s brojem PH-čimbenika lošije prognoze u skupini bolesnika s lokaliziranim DKŠ

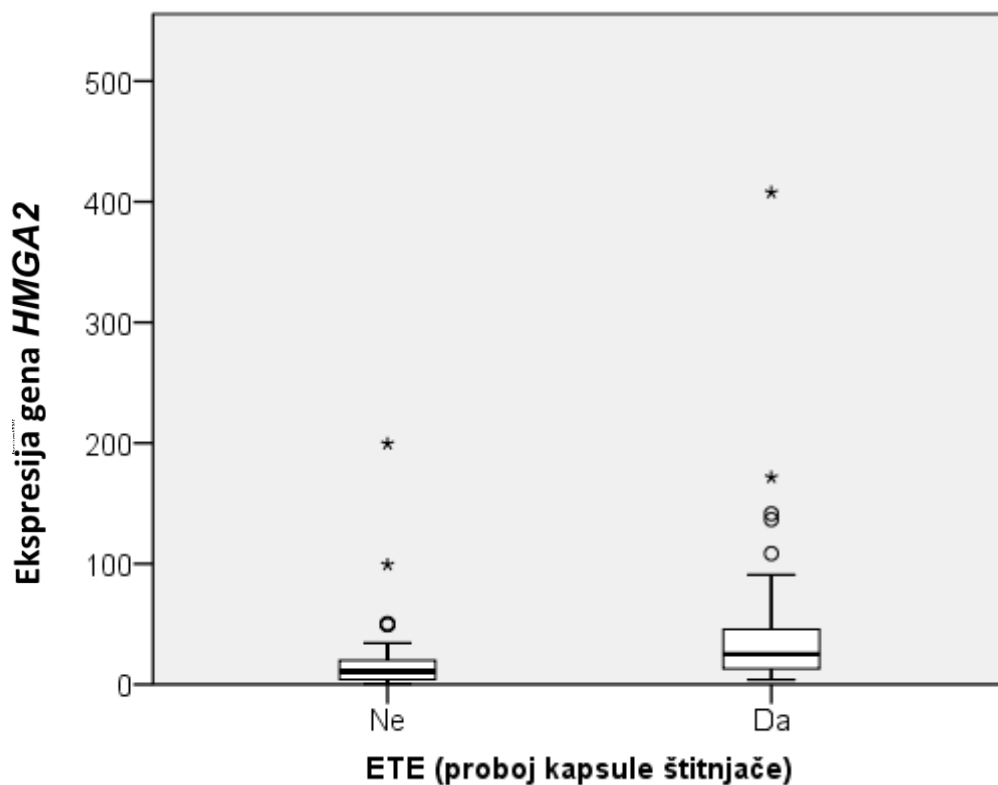
U našem istraživanju uočena je statistički značajno viša ekspresija gena *HMGA2* u uzorcima tkiva bolesnika koji su imali proboj čahure štitnjače (ETE) u odnosu na one kod kojih on nije bio prisutan ($P < 0,001$), kako analizirajući ukupno sve bolesnike s DKŠ, tako i u podskupinama onih s lokaliziranom ($P = 0,002$) ili limfogeno proširenom bolešću ($P = 0,004$), što je prikazano u tablicama 17. i 18., te na slici 18. Kod onih bolesnika koji su imali čak samo infiltraciju kapsule štitnjače (sa ili bez njezina probijanja), također je bila uočena značajno veća ekspresija *HMGA2* u odnosu na uzorke tkiva bolesnika bez infiltracije kapsule štitnjače ($P = 0,001$), a ponovno se to odnosilo na podskupine bolesnika s lokaliziranom ($P = 0,003$) ili bolešću proširenom u limfne čvorove ($P = 0,004$), što je prikazano u tablicama 19. i 20., te na slici 19.

Tablica 17. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na proboj kapsule štitnjače: Kruskal-Wallisov test

		ETE (proboj kapsule štitnjače)						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Ne	43	0,52	199,52	10,82	4,06	20,13	<0,001
	Da	70	3,84	407,70	25,09	13,14	45,59	

Tablica 18. Razlika u ekspresiji *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapreovalosti) u odnosu na proboj kapsule štitnjače: Kruskal-Wallisov test

		ETE (proboj kapsule štitnjače)						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	Ne	8	9,62	199,52	49,55	22,33	74,92	0,333
	Da	15	12,60	407,70	58,34	36,97	136,68	
Limfni čvorovi	Ne	14	3,27	34,34	10,70	6,95	20,50	0,004
	Da	31	6,23	90,85	23,20	13,57	36,97	
Lokalni	Ne	21	0,52	20,13	7,97	2,74	11,78	0,002
	Da	24	3,84	61,46	17,46	8,16	28,73	



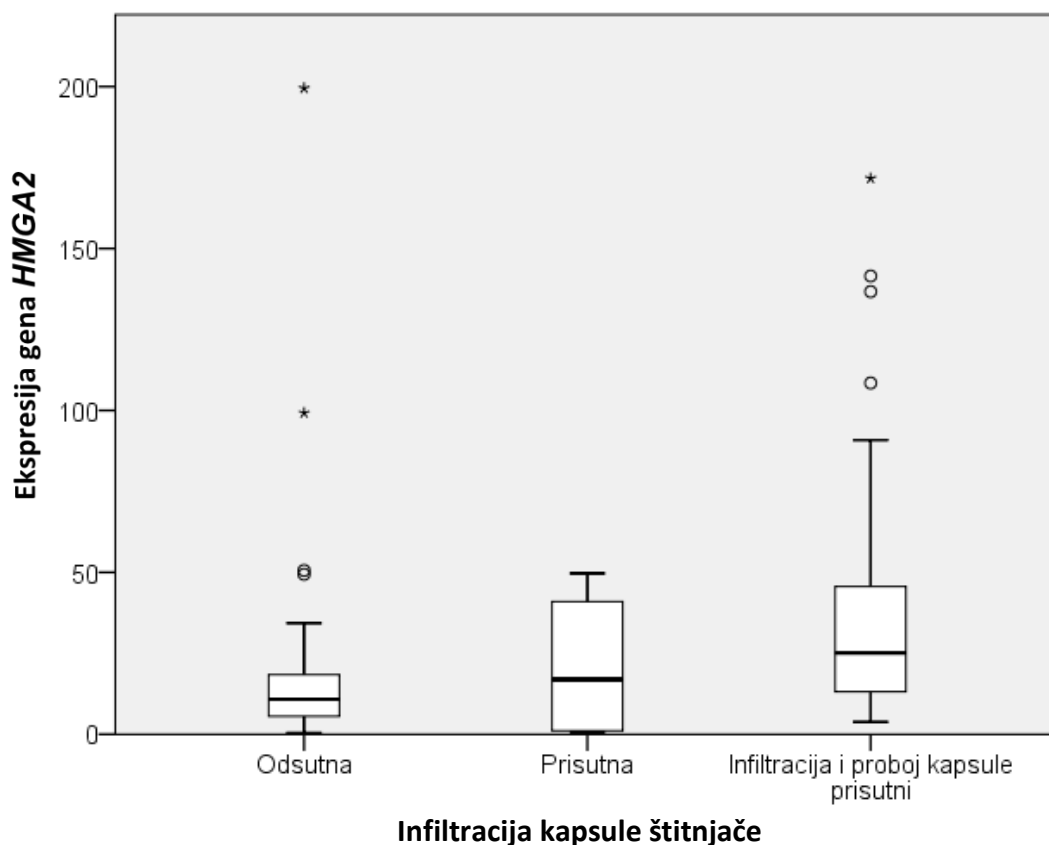
Slika 18. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na proboj kapsule štitnjače

Tablica 19. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na infiltraciju kapsule štitnjače: Kruskal-Wallisov test

		Infiltracija kapsule štitnjače						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
<i>HMGA2</i> ekspresija	Odsutna	39	0,52	199,52	10,82	4,09	19,85	0,001
	Prisutna	4	0,67	49,72	16,91	1,12	40,98	
	Infiltracija i proboj kapsule	70	3,84	407,70	25,09	13,14	45,59	

Tablica 20. Razlika u ekspresiji *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapreovalosti) u odnosu na infiltraciju kapsule štitnjače: Kruskal-Wallisov test

		Infiltracija kapsule štitnjače						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	Odsutna	6	9,62	199,52	49,99	12,42	99,24	0,58
	Prisutna	2	32,24	49,72	40,98	32,24	49,72	
	Infiltracija i proboj kapsule	15	12,60	407,70	58,34	36,97	136,68	
Limfni čvorovi	Odsutna	14	3,27	34,34	10,70	6,95	20,50	0,004
	Prisutna	0						
	Infiltracija i proboj kapsule	31	6,23	90,85	23,20	13,57	36,97	
Lokalni	Odsutna	19	0,52	20,13	8,34	3,32	11,80	0,003
	Prisutna	2	0,67	1,57	1,12	0,67	1,57	
	Infiltracija i proboj kapsule	24	3,84	61,46	17,46	8,16	28,73	



Slika 19. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na infiltraciju kapsule štitnjače

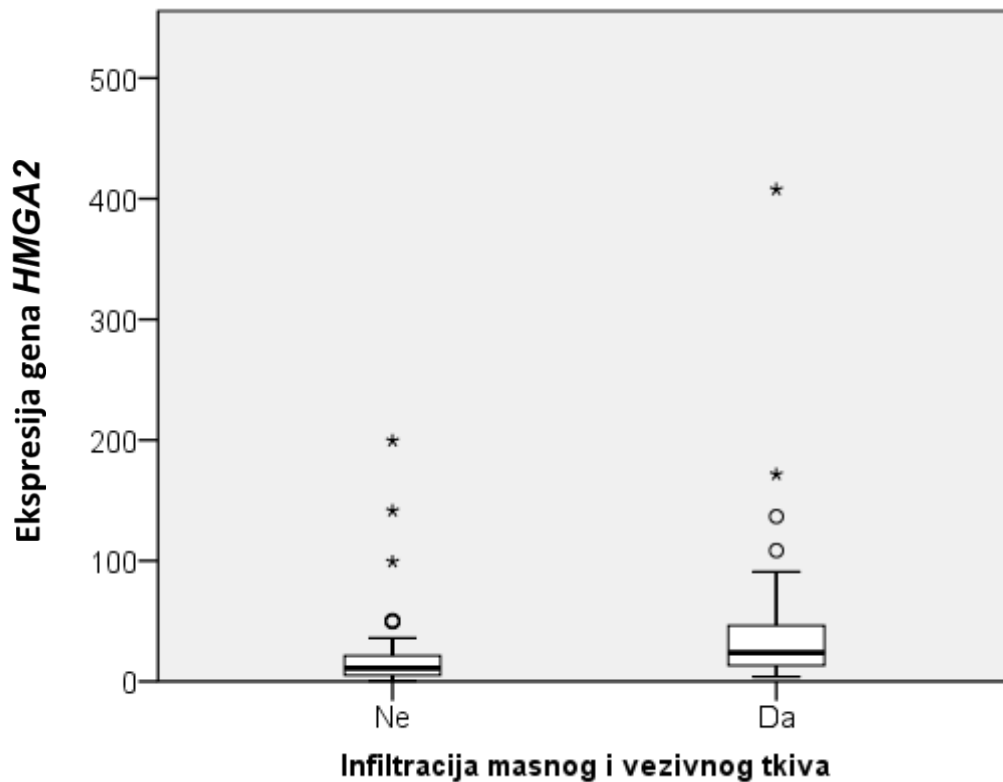
Ekspresija gena *HMGA2* bila je značajno veća i u ispitanika s infiltracijom masnog i vezivnog tkiva ($P < 0,001$, tablice 21. i 22., slika 20.), limfovaskularnom invazijom ($P < 0,001$, tablice 23. i 24., slika 21.), invazijom dalje u okolinu, npr. u okolno skeletno mišićje, ($P = 0,006$, tablice 25. i 26., slika 22.).

Tablica 21. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na infiltraciju masnog i vezivnog tkiva: Kruskal-Wallisov test

	Infiltracija masnog i vezivnog tkiva						P
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
<i>HMGA2</i> ekspresija Ne	49	0,52	199,52	10,98	5,15	21,45	<0,001
Da	64	3,84	407,70	23,95	13,36	46,35	

Tablica 22. Razlika u ekspresiji *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapređovalosti) u odnosu na infiltraciju masnog i vezivnog tkiva: Kruskal-Wallisov test

		Infiltracija masnog i vezivnog tkiva						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	Ne	10	9,62	199,52	49,55	25,48	99,24	0,376
	Da	13	12,60	407,70	58,34	41,50	108,47	
Limfni čvorovi	Ne	15	3,27	34,34	10,98	6,95	21,45	0,008
	Da	30	6,23	90,85	22,90	13,57	36,97	
Lokalni	Ne	24	0,52	35,93	8,15	3,03	11,79	0,003
	Da	21	3,84	61,46	18,39	8,81	24,71	



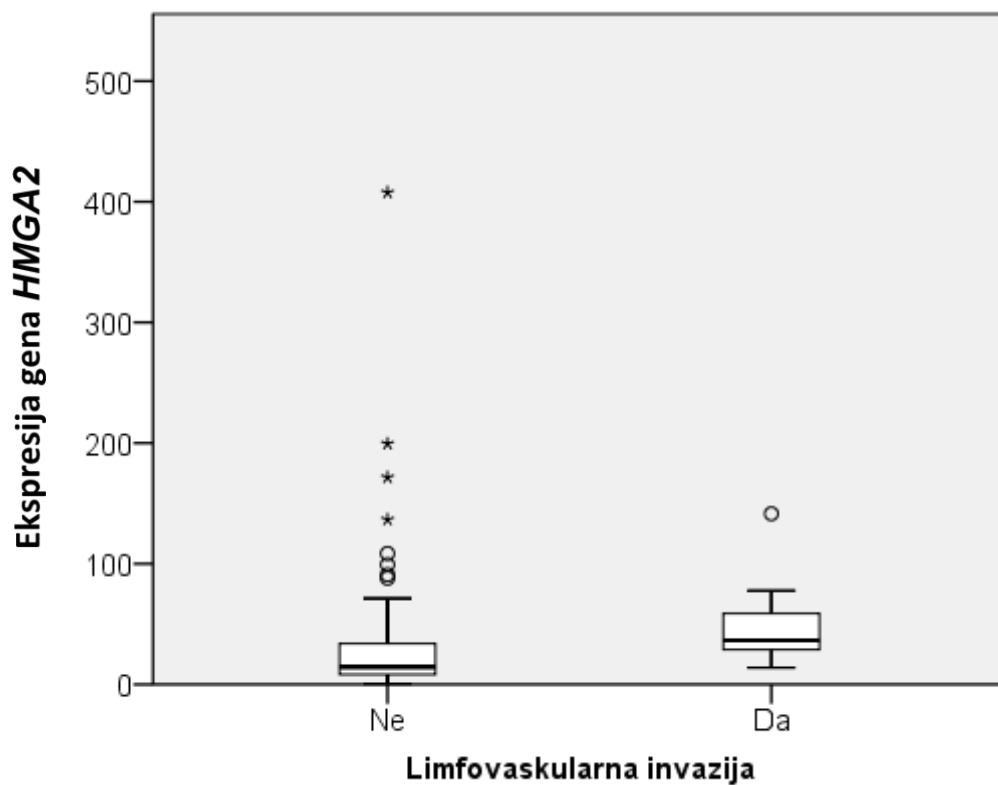
Slika 20. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na infiltraciju masnog i vezivnog tkiva

Tablica 23. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na limfovaskularnu invaziju: Kruskal-Wallisov test

		Limfovaskularna invazija					P	
		N	Min	Max	Medijan	25. centila		75. centila
HMGA2 ekspresija	Ne	98	0,52	407,70	14,46	8,34	33,76	<0,001
	Da	15	13,95	141,50	36,60	25,48	59,33	

Tablica 24. Razlika u ekspresiji *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapredovalosti) u odnosu na limfovaskularnu invaziju: Kruskal-Wallisov test

		Limfovaskularna invazija					P	
		N	Min	Max	Medijan	25. centila		75. centila
Udaljene metastaze	Ne	16	9,62	407,70	52,44	32,59	122,57	0,688
	Da	7	25,48	141,50	49,72	32,24	59,33	
Limfni čvorovi	Ne	39	3,27	90,85	19,85	9,49	33,76	0,095
	Da	6	13,95	77,75	29,37	19,03	60,84	
Lokalni	Ne	43	0,52	61,46	10,49	4,59	18,39	0,018
	Da	2	35,93	36,60	36,27	35,93	36,60	



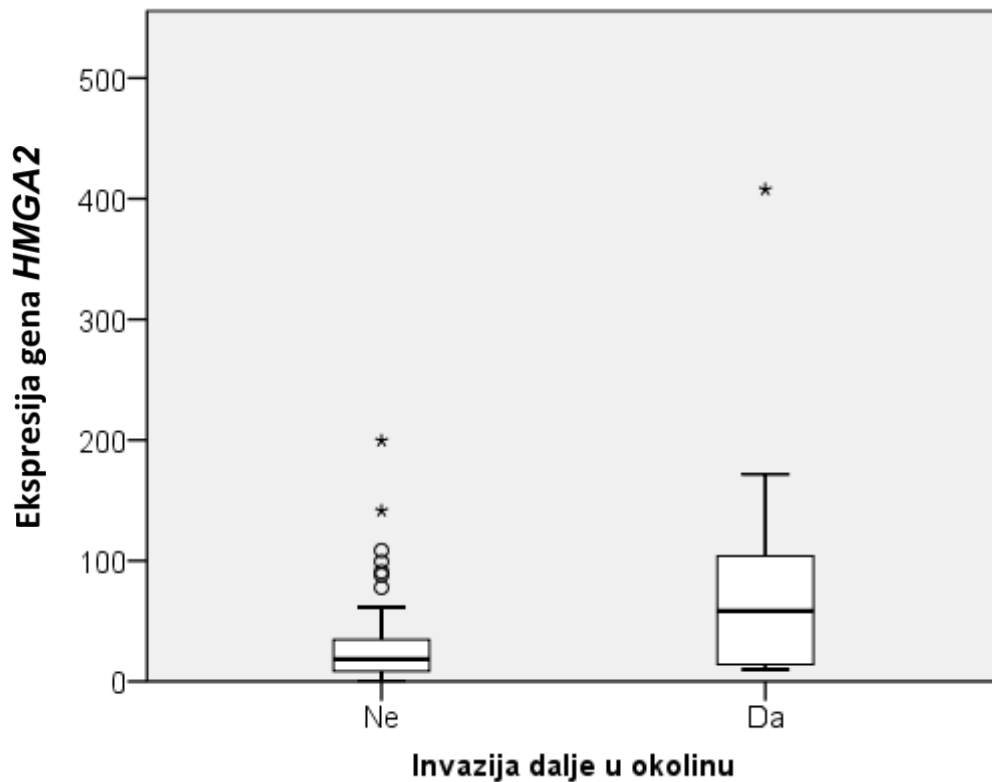
Slika 21. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na limfovaskularnu invaziju

Tablica 25. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na invaziju dalje u okolinu: Kruskal-Wallisov test

		Invazija dalje u okolinu						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Ne	102	0,52	199,52	18,44	8,49	34,76	0,006
	Da	11	9,96	407,70	58,34	13,95	136,68	

Tablica 26. Razlika u ekspresiji *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapreovalosti) u odnosu na invaziju dalje u okolinu: Kruskal-Wallisov test

		Invazija dalje u okolinu						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	Ne	16	9,62	199,52	48,24	30,22	93,66	0,109
	Da	7	12,60	407,70	59,33	54,27	171,66	
Limfni čvorovi	Ne	42	3,27	90,85	20,17	10,42	34,34	0,891
	Da	3	9,96	71,27	13,95	9,96	71,27	
Lokalni	Ne	44	0,52	61,46	10,66	4,87	19,31	0,700
	Da	1	14,40	14,40	14,40	14,40	14,40	



Slika 22. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na invaziju dalje u okolinu

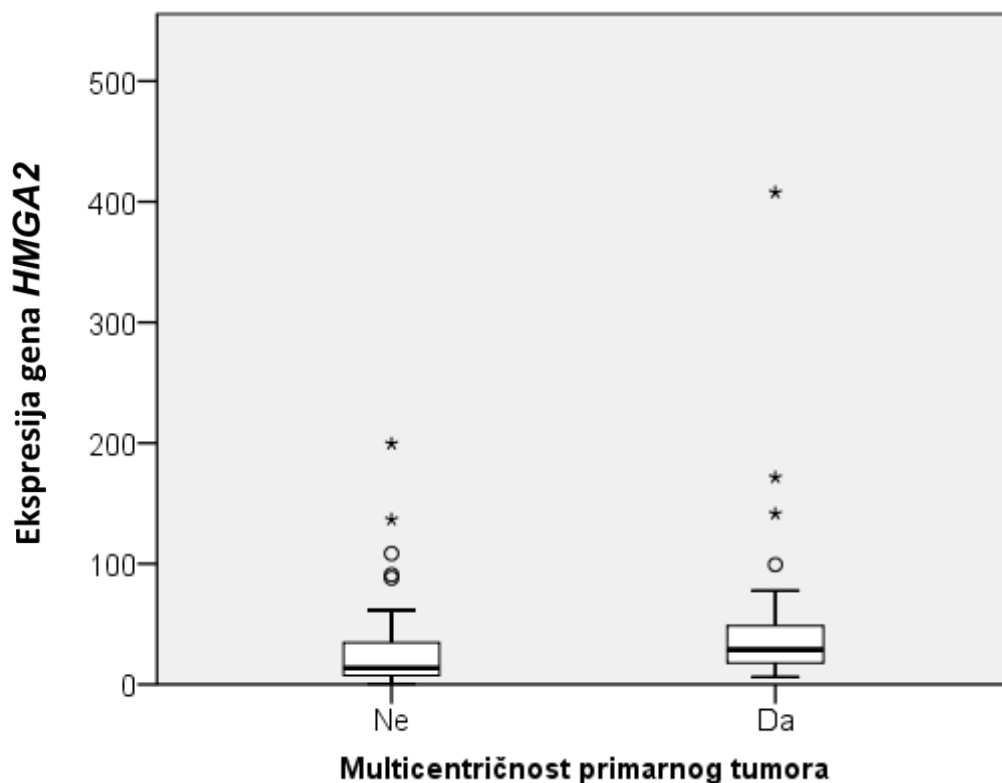
Multicentrični diferencirani karcinomi štitnjače imali su statistički značajno veću ekspresiju gena *HMGA2* u odnosu na bolesnike sa solitarnim DKŠ (P=0,001, tablice 27. i 28., slika 23.).

Tablica 27. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na multicentričnost diferenciranih karcinoma štitnjače: Kruskal-Wallisov test

	Multicentričnost primarnog tumora						P	
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila		
<i>HMGA2</i> ekspresija	Ne	81	0,52	199,52	13,57	7,46	34,76	0,001
	Da	32	6,23	407,70	28,79	17,74	48,60	

Tablica 28. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapređovalosti) u odnosu na multicentričnost diferenciranih karcinoma štitnjače: Kruskal-Wallisov test

	Multicentričnost primarnog tumora						P	
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila		
Udaljene metastaze	Ne	12	12,42	199,52	56,31	45,44	98,28	0,608
	Da	11	9,62	407,70	47,10	28,20	141,50	
Limfni čvorovi	Ne	31	3,27	90,85	13,95	9,06	29,20	0,031
	Da	14	6,23	77,75	28,79	19,85	47,48	
Lokalni	Ne	38	0,52	61,46	8,88	4,09	18,39	0,045
	Da	7	10,82	32,75	17,00	11,80	24,71	



Slika 23. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na multicentričnost DKŠ

Kao što je već ranije prikazano, postoji pozitivna korelacija ekspresije *HMGA2* s brojem pozitivnih limfnih čvorova (tablice 15. i 16., slika 11.), no dodatno smo istražili postoji li značajna razlika u ekspresiji gena *HMGA2* ovisno o tome je li tumorskim tkivom zahvaćen samo jedan regionalni limfni čvor ili više njih (neovisno o broju), postoji li razlika u ovisnosti o pN-stadiju bolesti prema AJCC/UICC TNM-klasifikaciji, te ima li razlike u ekspresiji *HMGA2* ovisno o eventualnom postojanju proboja kapsule limfnog čvora.

Nije utvrđena značajna razlika u ekspresiji gena *HMGA2* kod bolesnika s limfogenim presadnicama (uključujući i one koji su dodatno imali hematogene presadnice) koji su imali solitarni regionalni limfni čvor u odnosu na one multiplim limfogenim presadnicama (neovisno o njihovom broju); vrijednost P iznosila je 0,699 kod bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima i udaljenim presadnicama, te $P=0,205$ kod bolesnika s limfogeno proširenom bolešću, što je prikazano u tablici 29.

Tablica 29. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapređovalosti) u odnosu na zahvaćenost presadnicama jednog ili više (neovisno o broju) limfnih čvorova: Kruskal-Wallisov test

		Zahvaćenost LČ						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	Jedan pozitivni LČ	2	54,27	136,68	95,48	54,27	136,68	0,699
	Više pozitivnih LČ	16	12,42	407,70	49,55	34,61	79,28	
Limfni čvorovi	Jedan pozitivni LČ	11	4,06	60,84	13,14	7,28	28,36	0,205
	Više pozitivnih LČ	34	3,27	90,85	20,98	11,11	35,36	

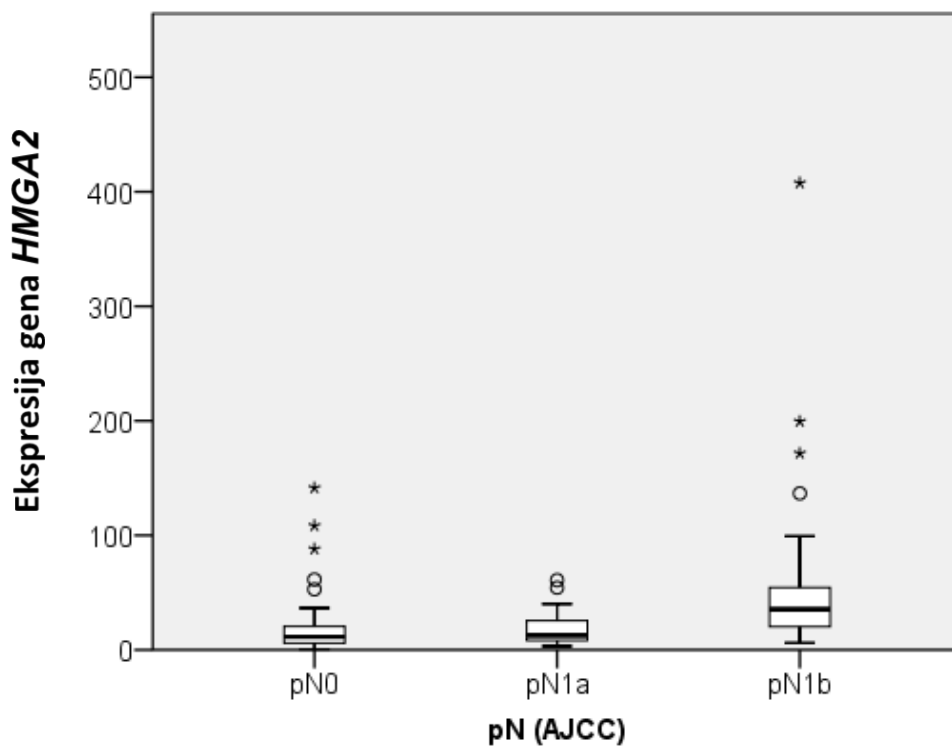
Za razliku od toga, kad smo analizirali bolesnike s limfogenim presadnicama prema njihovoj klasifikaciji po AJCC/UICC TNM-sustavu (pN0, pN1a ili pN1b), utvrđena je značajna razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na pN-status bolesti, $P < 0,001$, što je prikazano u tablicama 30. i 31. te na slici 24.

Tablica 30. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na pN-status po AJCC/UICC diferenciranih karcinoma štitnjače: Kruskal-Wallisov test

		pN (AJCC)						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	pN0	50	0,52	141,50	11,44	6,03	20,60	<0,001
	pN1a	23	3,27	60,84	12,60	7,46	28,36	
	pN1b	40	6,23	407,70	35,48	20,33	54,47	

Tablica 31. Razlika u ekspresiji *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapreovalosti) u odnosu na pN-status po AJCC/UICC diferenciranih karcinoma štitnjače: Kruskal-Wallisov test

		pN (AJCC)						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Udaljene metastaze	pN0	5	9,62	141,50	88,09	25,48	108,47	0,667
	pN1a	2	12,60	54,27	33,44	12,60	54,27	
	pN1b	16	12,42	407,70	50,16	39,23	117,96	
Limfni čvorovi	pN0	0						0,012
	pN1a	21	3,27	60,84	11,11	7,46	22,59	
	pN1b	24	6,23	90,85	23,77	13,98	35,87	
Lokalni	pN0	45	0,52	61,46	10,82	5,15	18,48	NA
	pN1a	0						
	pN1b	0						

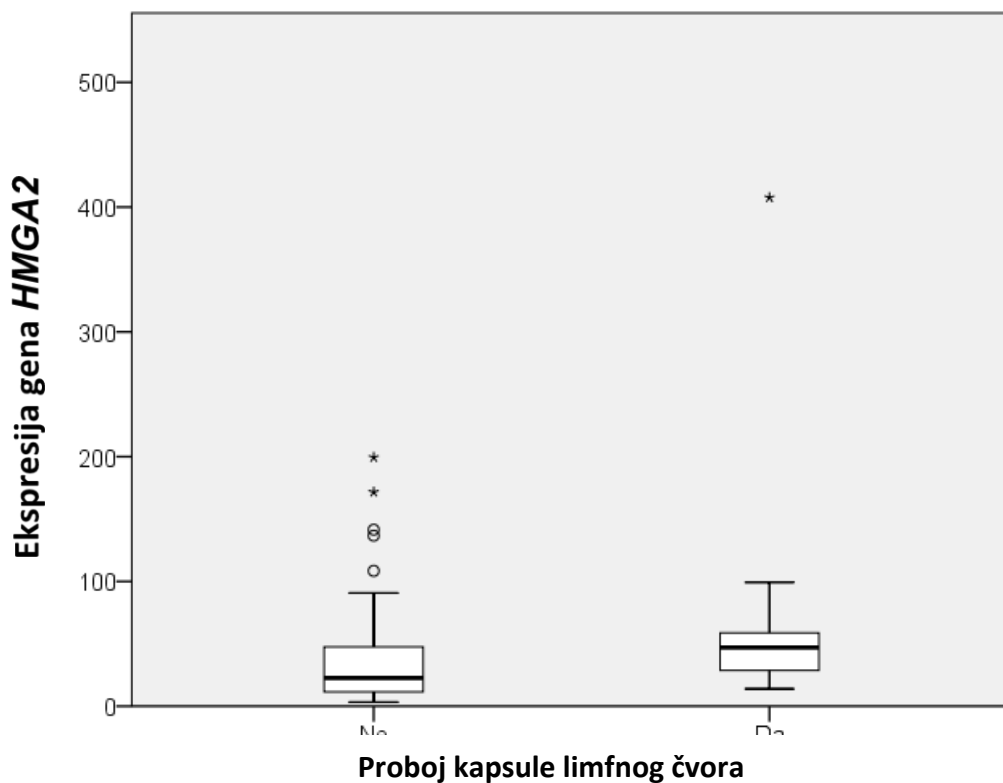


Slika 24. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na pN-status po AJCC/UICC diferenciranih karcinoma štitnjače

Značajno viša ekspresija gena *HMGA2* zabilježena je i u podskupini bolesnika s prisutnim probojem kapsule limfnog čvora ($P=0,037$), što je prikazano u tablici 32. i na slici 25.

Tablica 32. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na proboj kapsule limfnog čvora: Kruskal-Wallisov test

	Proboj kapsule l.č.						P
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
<i>HMGA2</i> ekspresija							
Ne	55	3,27	199,52	22,59	11,11	49,38	0,037
Da	11	13,95	407,70	47,10	28,20	59,33	



Slika 25. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na proboj kapsule limfnog čvora

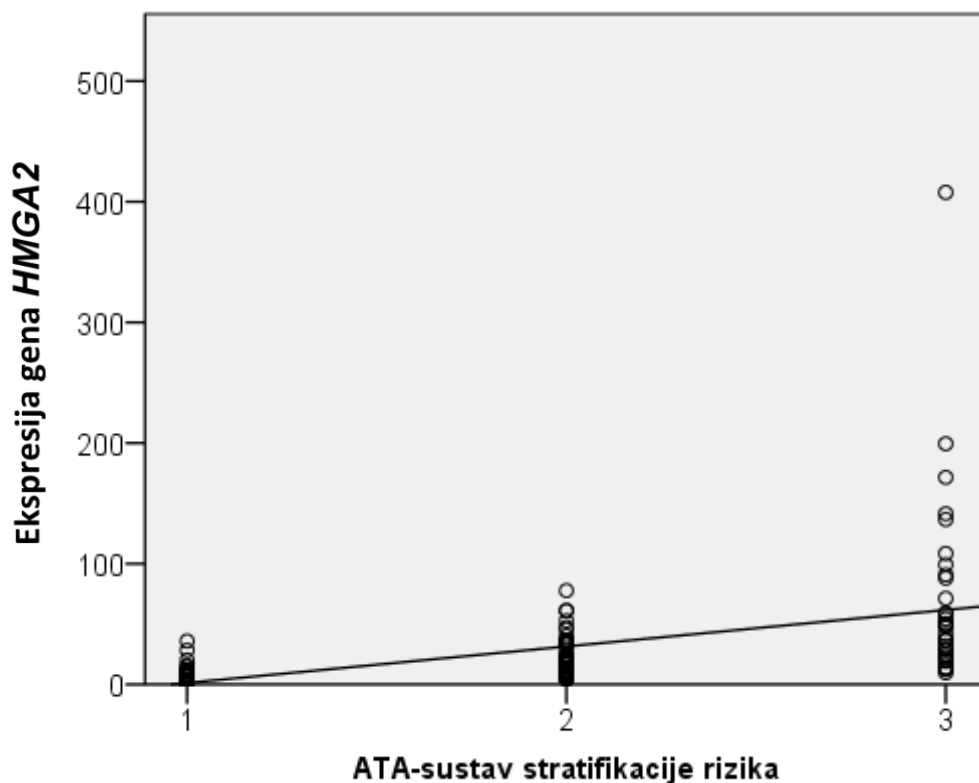
5.5. Razina ekspresije gena *HMGA2* kod diferenciranih karcinoma štitnjače u ovisnosti o klinički rizičnim podskupinama, provedenom liječenju i odgovoru na njega, te kliničkom tijeku i ishodu bolesti

Osim patohistoloških čimbenika, željeli smo utvrditi i eventualnu povezanost ekspresije gena *HMGA2* s različitim kliničkim čimbenicima. Stoga smo analizirali nekoliko parametara. U zadnjim smjernicama Američkog društva za štitnjaču (157) bolesnici s DKŠ podijeljeni su prema rizičnim podskupinama koje predstavljaju kombinaciju patohistoloških i kliničkih rizičnih čimbenika, u tzv. ATA-sustav stratifikacije rizika, kako je prethodno prikazano u tablici 4., te u ovisnosti o kliničkom odgovoru na terapiju tj. ishodu liječenja prema podjeli ATA iz smjernica za 2015. godinu, kako je prethodno prikazano u tablici 5. Naše smo bolesnike podijelili prema ovim kriterijima i istražili postoji li korelacija s ekspresijom gena *HMGA2*.

Kod bolesnika koji su kategorizirani u veću rizičnu podskupinu prema kriterijima ATA, utvrđena je pozitivna korelacija s ekspresijom *HMGA2*, kako skupno za sve bolesnike s DKŠ (tablica 33. i slika 26.), tako i kada smo ih podijelili prema kliničkom stupnju uznapređovalosti, što je prikazano u tablici 34. te na slikama 27. i 28.

Tablica 33. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* s pojedinim kliničkim parametrima: Spearmanov koeficijent korelacije

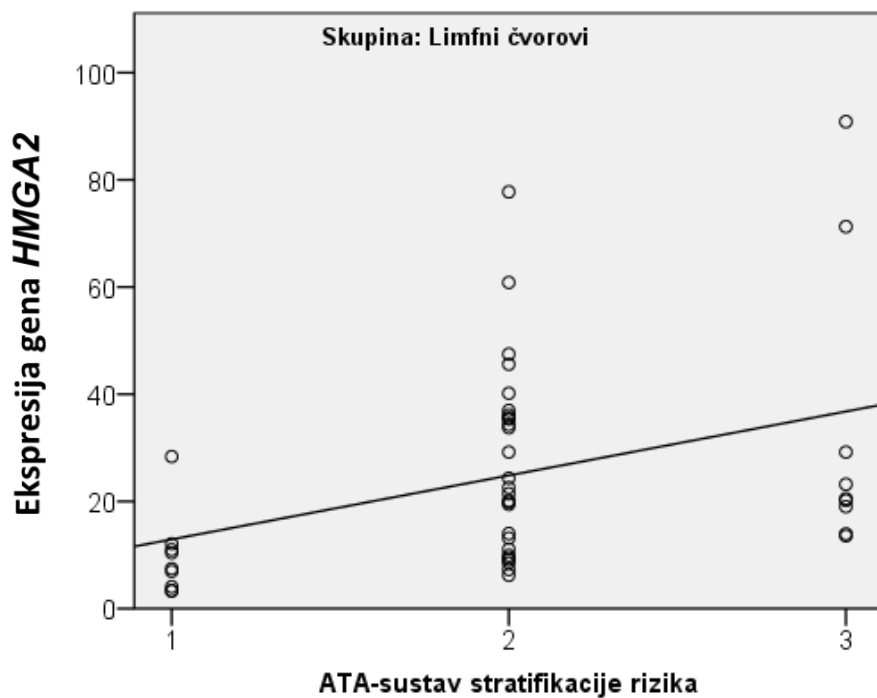
		<i>HMGA2</i> ekspresija
ATA-sustav stratifikacije rizika	Korelacijski koeficijent rho	0,655
	P	<0,001
	N	113
Kumulacijska doza RAI (mCi)	Korelacijski koeficijent rho	0,315
	P	0,001
	N	113



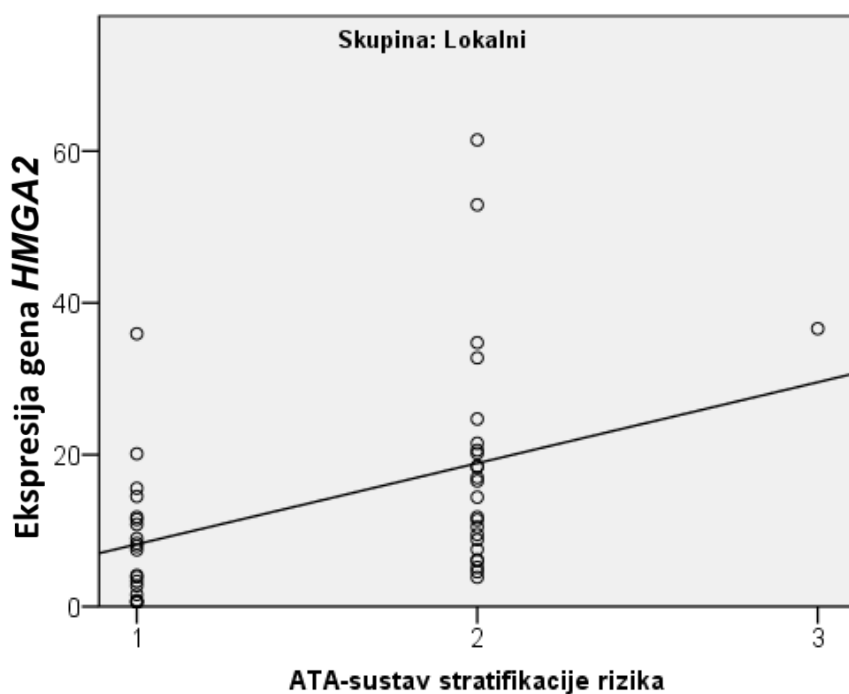
Slika 26. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* i ATA-sustava stratifikacije rizika

Tablica 34. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* unutar pojedinih podskupina diferenciranih karcinoma štitnjače (prema kliničkoj uznapredovalosti) s pojedinim kliničkim parametrima: Spearmanov koeficijent korelacije

		Udaljene metastaze	Limfni čvorovi	Lokalno
		<i>HMGA2</i> ekspresija	<i>HMGA2</i> ekspresija	<i>HMGA2</i> ekspresija
ATA-sustav stratifikacije rizika	Korelacijski koeficijent rho		0,441	0,476
	P		0,002	0,001
	N	23	45	45
Kumulacijska doza RAI (mCi)	Korelacijski koeficijent rho	-0,112	-0,096	0,174
	P	0,612	0,529	0,253
	N	23	45	45



Slika 27. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* i ATA-sustava stratifikacije rizika u skupini bolesnika s DKŠ i pozitivnim limfnim čvorovima

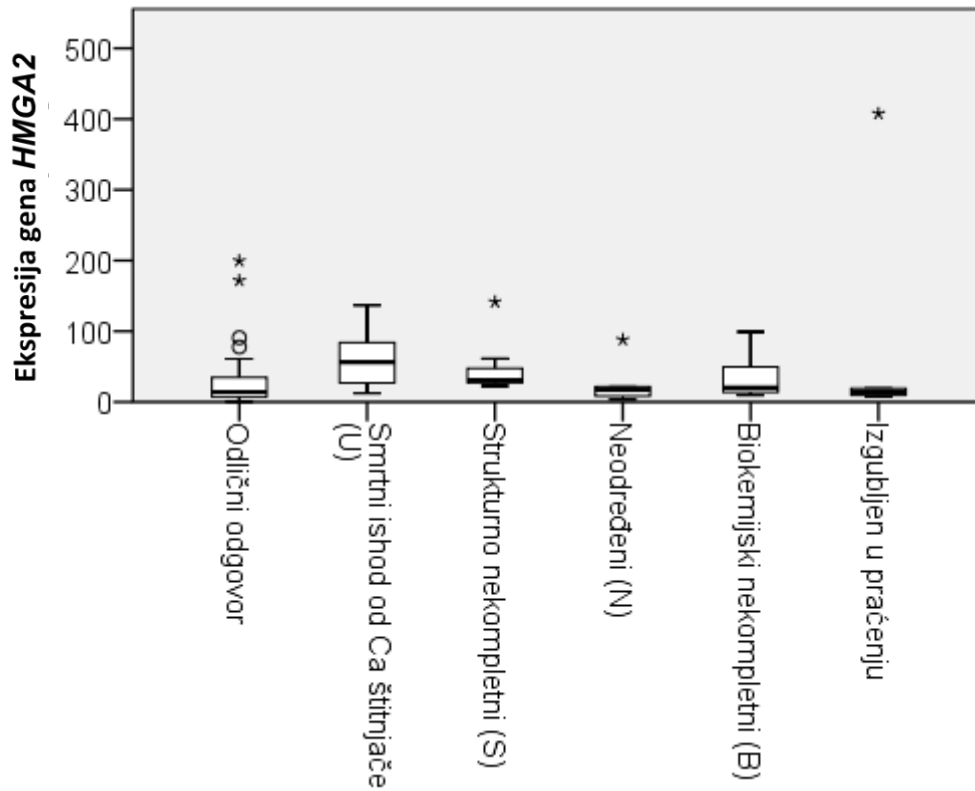


Slika 28. Korelacija ekspresije gena *HMGA2* i ATA-sustava stratifikacije rizika u skupini bolesnika s lokaliziranim DKŠ

Lošiji klinički odgovori odnosno lošiji ishodi liječenja bili su statistički značajno povezani s višom razinom ekspresije gena *HMGA2* ($P=0,010$), što je prikazano u tablici 35. i na slici 29.

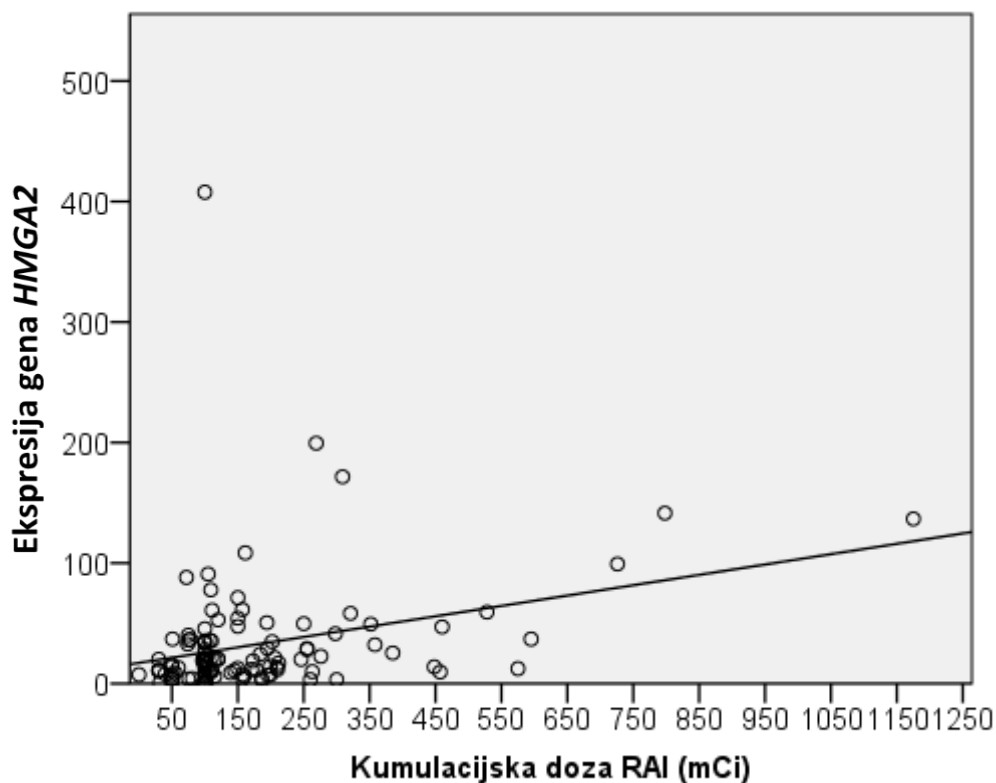
Tablica 35. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na klinički odgovor na terapiju (ishod terapije) prema kriterijima ATA: Kruskal-Wallisov test

	Klinički ishod (ATA)						P
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Odlični odgovor	77	0,52	199,52	14,00	7,46	34,76	0,010
Smrtni ishod - drugi uzrok (D)	0						
Smrtni ishod od ca štitnjače (U)	8	12,42	136,68	56,31	27,05	83,90	
<i>HMGA2</i> ekspresija Struktorno nekompletni (S)	8	22,59	141,50	30,73	27,34	47,61	
Neodređeni (N)	6	3,38	88,09	17,18	8,49	21,45	
Biokemijski nekompletni (B)	9	9,62	99,24	20,15	13,95	49,72	
Izgubljen u praćenju	5	7,46	407,70	13,57	9,49	19,03	



Slika 29. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na klinički odgovor na terapiju (ishod terapije) prema kriterijima ATA

Kod bolesnika koji su primili veću terapijsku kumulacijsku dozu radiojoda, utvrđena je pozitivna korelacija s ekspresijom *HMGA2*, što je prikazano u tablicama 33. i 34. i na slici 30.

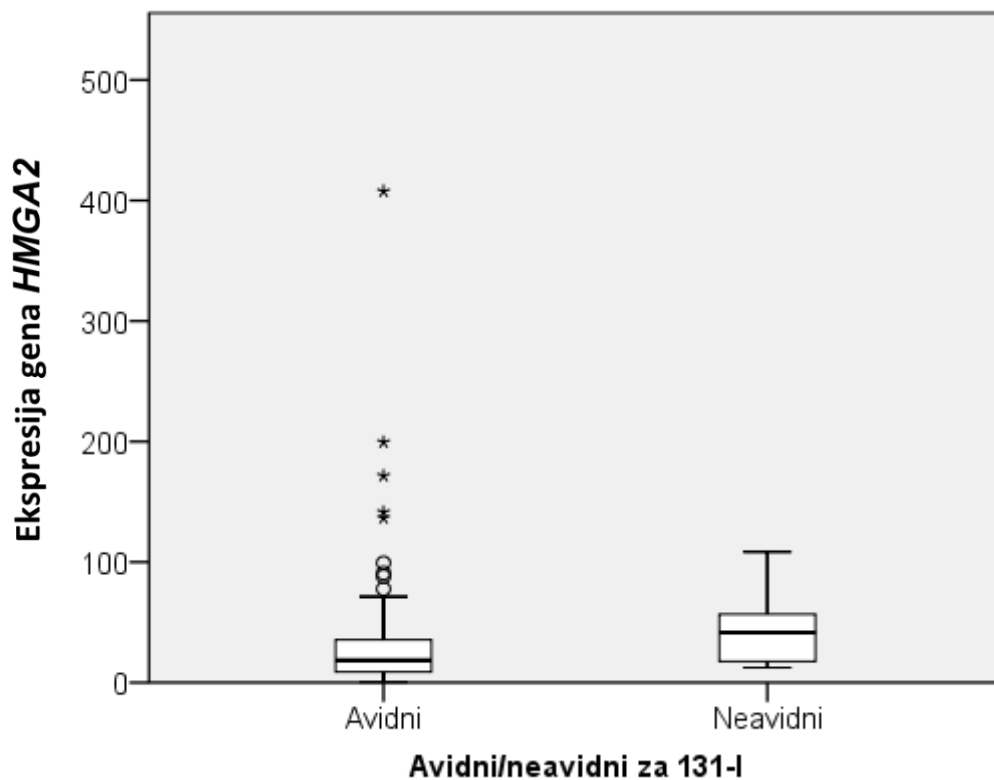


Slika 30. Korelacija ekspresije *HMGA2* i kumulacijske doze radiojoda (RAI) (mCi)

Bolesnici koji su bili neavidni za RAI, imali su značajno višu ekspresiju gena *HMGA2* u usporedbi s bolesnicima koji su bili avidni za RAI ($P=0,001$), što je prikazano u tablici 36. i na slici 31.

Tablica 36. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na avidnost tumora na RAI: Kruskal-Wallisov test

		Avidni						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
<i>HMGA2</i> ekspresija	Avidni	106	0,52	407,70	18,44	8,81	35,59	0,001
	Neavidni	7	12,42	108,47	41,50	12,60	59,33	



Slika 31. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na avidnost tumora na RAI

Nije utvrđena statistički značajna razlika između ekspresije *HMGA2* i vrijednosti specifičnog tumorskog biljega za DKŠ, tireoglobulina (Tg), bilo postoperacijski (tablica 37.), bilo tijekom zadnjeg praćenja (tablica 38.), a razlika nije uočena niti za vrijednosti antitireoglobulinskih protutijela, Tg-At, niti postoperacijski (tablica 39.), niti tijekom zadnje kontrole (tablica 40.).

Tablica 37. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na postoperacijski nalaz Tg: Kruskal-Wallisov test

	Tg postop.						P
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Uredan uz niska protutijela (Tg-At)	24	0,67	88,09	12,46	7,11	21,66	0,087
Povišen, uz niska Tg-At	68	0,52	407,70	18,76	9,27	40,83	
HMGA2 ekspresija Nizak, ali nepouzdan zbog pozitivnih protutijela	11	7,46	171,66	33,76	18,39	71,27	
Visok, ali nepouzdan zbog pozitivnih protutijela	10	0,59	141,50	20,17	11,42	36,15	
Nepoznat	0						

Tablica 38. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na zadnji nalaz Tg: Kruskal-Wallisov test

	Tg kod zadnjeg praćenja						P
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Uredan uz niska protutijela (Tg-At)	82	0,52	199,52	14,46	7,52	35,36	0,050
Povišen, uz niska Tg-At	12	12,60	141,50	36,87	18,27	79,28	
Povišen, ali u padu prema postop.	7	0,82	49,72	16,54	9,62	47,10	
HMGA2 ekspresija Nizak, ali nepouzdan zbog pozitivnih protutijela	5	20,15	71,27	29,22	23,20	33,76	
Visok, ali nepouzdan zbog pozitivnih protutijela	2	12,42	136,68	74,55	12,42	136,68	
Nepoznat	5	7,46	407,70	19,03	9,49	24,33	

Tablica 39. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na postoperacijski nalaz Tg-At: Kruskal-Wallisov test

		Tg-At postop.						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Niska	92,00	0,52	407,70	16,06	8,65	36,27	0,091
	Povišena	21,00	0,59	171,66	28,36	12,42	36,15	

Tablica 40. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na zadnji nalaz Tg-At: Kruskal-Wallisov test

		Tg-At zadnja						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Niska	99	0,52	199,52	16,54	8,49	36,15	0,136
	Povišena	7	12,42	141,50	33,76	23,20	136,68	
	Povišena s tendencijom pada	2	20,15	29,20	24,67	20,15	29,20	
	Nepoznata	5	7,46	407,70	19,03	9,49	24,33	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između ekspresije gena *HMGA2* i provedene kemoterapije (tablica 41.), niti neke druge terapije (gdje su ubrojene operacije presadnica i njihove embolizacije), što je prikazano u tablici 42., no utvrđena je korelacija između ekspresije *HMGA2* i provedene radioterapije vanjskim snopovima (ERT), $P=0,003$, što je prikazano u tablici 43. i na slici 32.

Tablica 41. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na provedenu kemoterapiju: Kruskal-Wallisov test

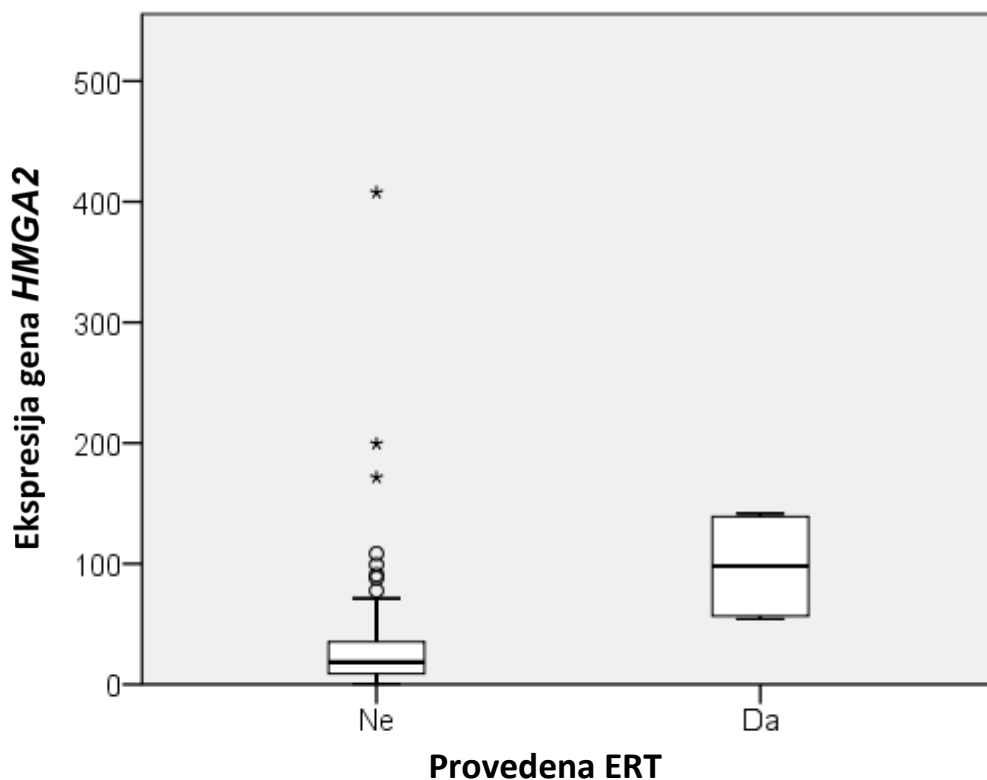
		Provedena KT						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Ne	109	0,52	407,70	18,48	8,96	35,59	0,077
	Da	4	12,42	108,47	50,41	26,96	83,90	

Tablica 42. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na ostalu provedenu terapiju (operacija ili embolizacija presadnica): Kruskal-Wallisov test

		Provedena druga terapija					P	
		N	Min	Max	Medijan	25. centila		75. centila
HMGA2 ekspresija	Bez druge terapije	109	0,52	407,70	18,48	8,96	35,93	0,304
	Operacija meta	2	12,42	136,68	74,55	12,42	136,68	
	Embolizacija	1	25,48	25,48	25,48	25,48	25,48	
	Operacija meta i embolizacija	1	141,50	141,50	141,50	141,50	141,50	

Tablica 43. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na provedenu radioterapiju: Kruskal-Wallisov test

		Provedena ERT						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
HMGA2 ekspresija	Ne	109	0,52	407,70	18,39	8,96	35,36	0,003
	Da	4	54,27	141,50	98,00	56,80	139,09	

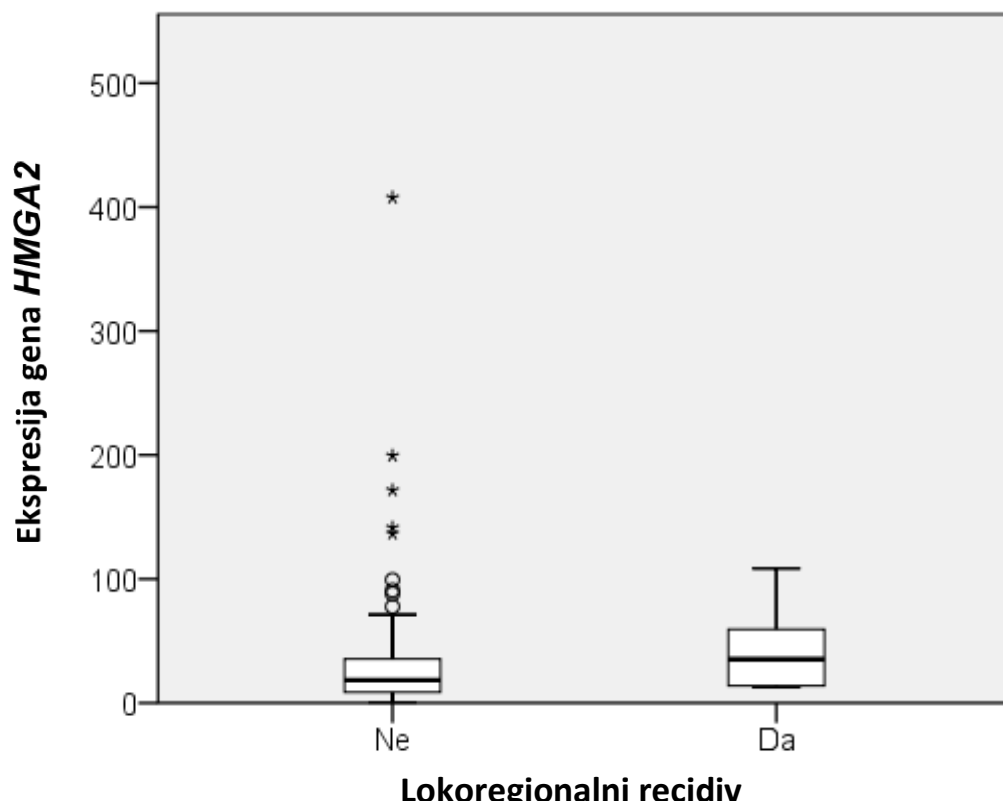


Slika 32. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na provedenu radioterapiju

Ekspresija *HMGA2* bila je značajno veća kod bolesnika kod kojih je nastao lokoregionalni recidiv bolesti, $P=0,028$ (tablica 44. i slika 33.), te kod bolesnika kojih je nastupio smrtni ishod kao posljedica karcinoma štitnjače, $P=0,007$ (tablica 45. i slika 34.).

Tablica 44. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na lokoregionalni recidiv: Kruskal-Wallisov test

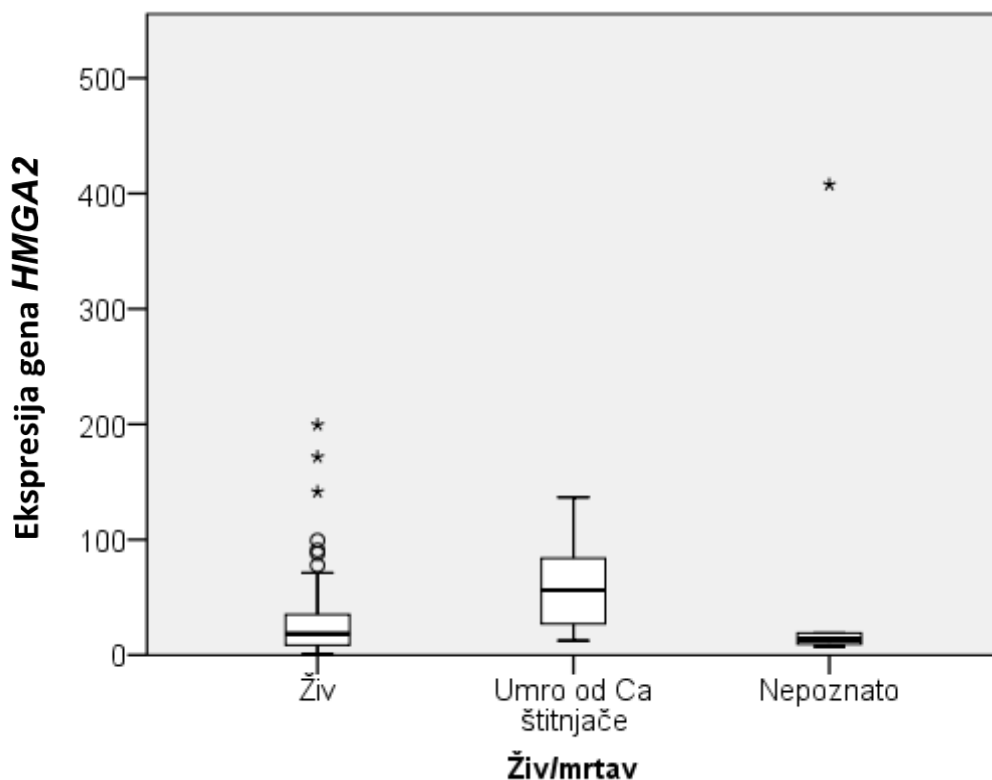
		Lokoregionalni recidiv						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
<i>HMGA2</i> ekspresija	Ne	103	0,52	407,70	18,39	8,49	35,59	0,028
	Da	10	12,42	108,47	35,36	13,95	59,33	



Slika 33. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na lokoregionalni recidiv

Tablica 45. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na ishod karcinoma štitnjače:
Kruskal-Wallisov test

	Živ/mrtav						P
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Živ	100	0,52	199,52	18,44	8,65	35,06	0,007
HMGA2 ekspresija Umro od ca štitnjače	8	12,42	136,68	56,31	27,05	83,90	
Nepoznato	5	7,46	407,70	13,57	9,49	19,03	



Slika 34. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na ishod karcinoma štitnjače

Tijekom praćenja, od bolesnika koji su imali bolest lokaliziranu na štitnjaču ili ograničenu na regionalne limfogene presadnice kod postavljanja dijagnoze, samo je kod jednog bolesnika nastupio povrat bolesti u udaljenim sijelima, stoga nije bilo moguće učiniti statističku analizu korelacije ekspresije *HMGA2* i udaljenog povrata bolesti (tablica 46.).

Tablica 46. Razlika u ekspresiji gena *HMGA2* u odnosu na povrat bolesti u udaljenim sijelima: Kruskal-Wallisov test

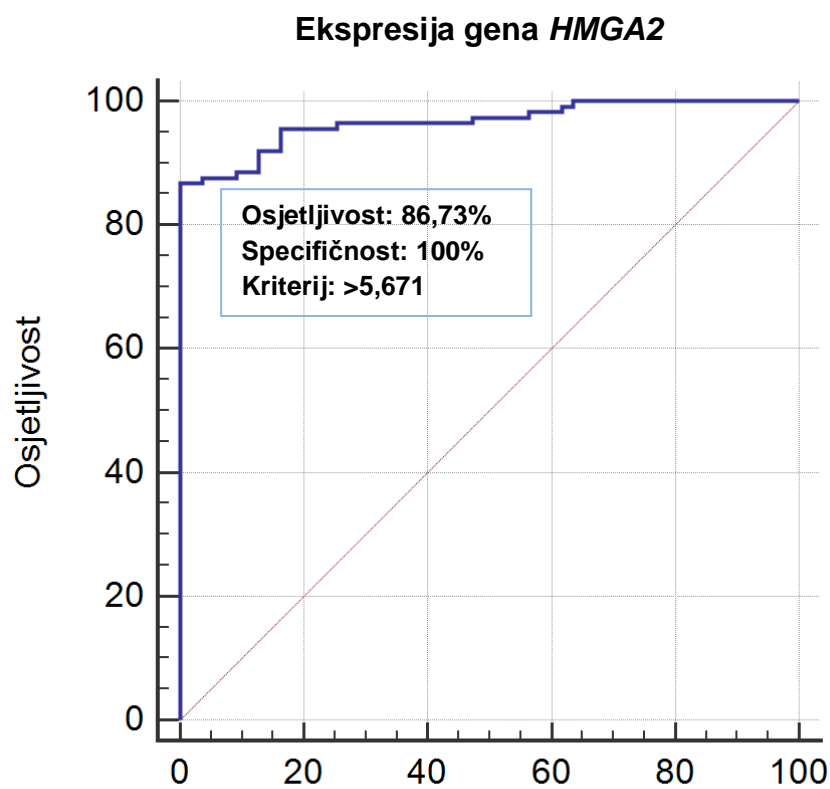
		NP-Povrat bolesti u udaljenim sijelima						P
		N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
<i>HMGA2</i> ekspresija	Ne	89	0,52	90,85	13,95	7,52	24,71	NP
	Da	1	22,59	22,59	22,59	22,59	22,59	

Nije bilo statistički značajne razlike između ekspresije gena *HMGA2* i sijela presadnica, što je prikazano u tablici 47.

Tablica 47. Razlika u ekspresiji *HMGA2* u odnosu na sijela presadnica: Kruskal-Wallisov test

	Sijela presadnica						P
	N	Min	Max	Medijan	25. centila	75. centila	
Bez presadnica	89	0,52	90,85	13,95	7,52	24,71	0,765
Pluća	16	12,60	407,70	50,16	39,23	103,85	
Kosti	3	9,62	141,50	25,48	9,62	141,50	
Pluća i kosti	4	12,42	136,68	45,79	22,33	98,00	
Lokoreg., pluća i kosti	1	54,27	54,27	54,27	54,27	54,27	
Više od 3 sijela	0						

Dodatno smo, temeljem prethodno spomenutih rezultata razlike u ekspresiji između malignih (DKŠ) i benignih (FA) tumora štitnjače, odlučili učiniti ROC-analizu ekspresije gena *HMGA2* u predikciji malignih tumora štitnjače (diferencirani karcinomi štitnjače naspram folikularnih adenoma), koja je prikazana na slici 35. Površina ROC-krivulje izrazito je velika (96,6%) te je statistički značajna ($P < 0,001$). Prema Youdenovom indeksu J, najprihvatljiviji u predikciji diferenciranih karcinoma štitnjače je kriterij ekspresije *HMGA2* veći od 5,67 s osjetljivošću od 86,73% (86,73% vjerojatnost da će biti prisutna vrijednost ekspresije *HMGA2* veća od 5,67 ako je prisutan DKŠ) te specifičnošću od 100,00% (100% vjerojatnost da će rezultat ekspresije biti ispod 5,67 ako ne postoji DKŠ). Dijagnostički testovi pojedinih vrijednosti ekspresije *HMGA2* u odnosu na predikciju diferenciranih karcinoma štitnjače dodatno su prikazani u Tablici 48.



Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,966
Standardna greška	0,012
95% interval pouzdanosti	0,926 to 0,988
z statistika	38,94
P vrijednost	<0,001

Youdenov index J	0,867
Povezani kriterij	>5,67
Osjetljivost	86,73
Specifičnost	100,00

Slika 35. ROC-analiza ekspresije gena *HMGA2* u predikciji diferenciranih karcinoma štitnjače (DKŠ naspram FA)

Tablica 48. Dijagnostički testovi pojedinih vrijednosti ekspresije *HMGA2* u odnosu na predikciju diferenciranih karcinoma štitnjače

Kriterij	Osjetljivost	95% CI	Specifičnost	95% CI	+PV	95% CI	-PV	95% CI
≥0,073	100	96,8 - 100,0	0	0,0 - 6,5	67,3	59,6 - 74,3		
>0,491	100	96,8 - 100,0	36,36	23,8 - 50,4	76,4	68,7 - 82,9	100	83,2 - 100,0
>0,519	99,12	95,2 - 100,0	36,36	23,8 - 50,4	76,2	68,5 - 82,8	95,2	76,2 - 99,9
>0,563	99,12	95,2 - 100,0	38,18	25,4 - 52,3	76,7	69,0 - 83,3	95,5	77,2 - 99,9
>0,591	98,23	93,8 - 99,8	38,18	25,4 - 52,3	76,6	68,8 - 83,2	91,3	72,0 - 98,9
>0,658	98,23	93,8 - 99,8	43,64	30,3 - 57,7	78,2	70,5 - 84,7	92,3	74,9 - 99,1
>0,671	97,35	92,4 - 99,4	43,64	30,3 - 57,7	78	70,3 - 84,5	88,9	70,8 - 97,6
>0,783	97,35	92,4 - 99,4	52,73	38,8 - 66,3	80,9	73,3 - 87,1	90,6	75,0 - 98,0
>0,817	96,46	91,2 - 99,0	52,73	38,8 - 66,3	80,7	73,1 - 87,0	87,9	71,8 - 96,6
>1,524	96,46	91,2 - 99,0	74,55	61,0 - 85,3	88,6	81,6 - 93,6	91,1	78,8 - 97,5
>1,570	95,58	90,0 - 98,5	74,55	61,0 - 85,3	88,5	81,5 - 93,6	89,1	76,4 - 96,4
>2,126	95,58	90,0 - 98,5	83,64	71,2 - 92,2	92,3	85,9 - 96,4	90,2	78,6 - 96,7
>3,375	92,04	85,4 - 96,3	83,64	71,2 - 92,2	92	85,4 - 96,3	83,6	71,2 - 92,2
>3,828	92,04	85,4 - 96,3	87,27	75,5 - 94,7	93,7	87,4 - 97,4	84,2	72,1 - 92,5
>4,094	88,5	81,1 - 93,7	87,27	75,5 - 94,7	93,5	87,0 - 97,3	78,7	66,3 - 88,1
>4,452	88,5	81,1 - 93,7	90,91	80,0 - 97,0	95,2	89,2 - 98,4	79,4	67,3 - 88,5
>4,591	87,61	80,1 - 93,1	90,91	80,0 - 97,0	95,2	89,1 - 98,4	78,1	66,0 - 87,5
>4,742	87,61	80,1 - 93,1	96,36	87,5 - 99,6	98	93,0 - 99,8	79,1	67,4 - 88,1

>5,152	86,73	79,1 - 92,4	96,36	87,5 - 99,6	98	93,0 - 99,8	77,9	66,2 - 87,1
>5,671	86,73	79,1 - 92,4	100	93,5 - 100,0	100	96,3 - 100,0	78,6	67,1 - 87,5
>407,698	0	0,0 - 3,2	100	93,5 - 100,0			32,7	25,7 - 40,4

6. RASPRAVA

Incidencija čvorova u štitnjači je velika, no većinom su dobroćudni (1). Zadnjih desetljeća raste broj pretraga štitnjače, čime se otkriva i veliki broj dobroćudnih čvorova, koje ponekad dijagnostički nije lako razlučiti od zloćudnih; osobito je to problem kod folikularnih novotvorina štitnjače (52, 304). Neki bolesnici s dobroćudnim promjenama budu nepotrebno podvrgnuti operacijskom zahvatu, stoga postoji velika potreba za otkrivanjem dodatnih molekularnih biljega za razlikovanje dobroćudnih novotvorina štitnjače od zloćudnih, kako predoperacijski (54, 305), tako i postoperacijski.

Diferencirani karcinomi štitnjače najčešće su indolentnog kliničkog tijeka i dobre prognoze (15). Neki razviju limfogene presadnice, no i tada je bolest u pravilu izlječiva. Međutim, kod malog udjela diferenciranih karcinoma štitnjače nastupi hematogena diseminacija bolesti u udaljena sijela, što u najgorem slučaju može dovesti do smrti bolesnika (107).

Pouzdanije identificiranje bolesnika s većim rizikom od diseminacije bolesti omogućilo bi agresivniji terapijski pristup te češća i opsežnija praćenja kod ove male podskupine bolesnika. U zadnje vrijeme pokušavaju se identificirati i određeni molekularni biljezi iz tumorskog tkiva, a zadnjih godina neki od njih se pokušavaju izolirati i iz krvi bolesnika, kao bi se dodatnim pretragama omogućilo identificiranje bolesnika s dobro diferenciranim karcinomima štitnjače koji su pod povećanim rizikom, bilo od lokalnog/lokoregionalnog povrata bolesti, a osobito pod povećanim rizikom od hematogene diseminacije bolesti, naspram onih za koje možemo pretpostaviti da će imati povoljni klinički tijek i ishod bolesti. Time bi se istovremeno izbjegla prekomjerna dijagnostika i prekomjerno liječenje kod onih bolesnika s DKŠ kojima je dovoljan manje opsežan operacijski zahvat, manja količina radiojoda u ablaciji ostatnog tkiva ili se ona u potpunosti može izbjeći, kojima nije potrebna supresijska TSH već im je dovoljna samo supstitucija L-tiroksinom, a praćenje može biti rjeđe i manje opsežno.

Korelacija između proteina HMGA (premda je bila riječ o HMGA1) i neoplastičnog fenotipa prvi je put zamijećena kad su dvodimenzijском електроforezom utvrđene promjene u jezgrinim proteinima nakon transformacije stanične linije štitnjače štakora (FRTL5) djelovanjem mišjeg virusa Kirstenovog sarkoma (KiMSV) (203).

Na ulogu HMGA2 u nastanku novotvorina prvi su ukazali Ashar i sur., te Schoenmakers i sur., obje skupine istraživača godine 1995. (207, 306).

Više je istraživanja ukazalo da je povećana ekspresija HMGA2, bilo na razini gena (metodom qRT-PCR), bilo na razini proteina (metodom imunohistokemijske analize), loš prognostički čimbenik kod niza različitih zloćudnih novotvorina – planocelularnih karcinoma usne šupljine ((247), karcinoma pluća nemalih stanica (248-251), adenokarcinoma pankreasa (253, 255), kolorektalnih karcinoma (264, 265), karcinoma želuca (269), hepatocelularnih karcinoma (272), intrahepatičnog kolangiokarcinoma (273), karcinoma dojke (277, 279), karcinoma mokraćnog mjehura (294).

Objavljeno je i nekoliko istraživanja o povezanosti prekomjerne ekspresije HMGA2 s karcinomima štitnjače, kako je već prethodno navedeno, i premda se kod većine njih prekomjerna ekspresija HMGA2 navodi kao obećavajući biljeg za razlikovanje benignih od malignih tumora štitnjače, samostalno (296-299) ili u sklopu multigenjskih analiza (302, 303), oko toga još nema konsenzusa (300, 301).

Nedostaci su dosadašnjih istraživanja prekomjerne ekspresije HMGA2 kod karcinoma štitnjače što su provedena na relativno malom broju bolesnika (296); osobito se to odnosi na veličinu uzoraka zdravog tkiva štitnjače ili neneoplastičnog tkiva (poput nodozne strume), veličinu uzoraka folikularnih adenoma, pa i veličinu uzoraka diferenciranih karcinoma štitnjače, a ponegdje su analizirani i bolesnici s anaplastičnim karcinomima štitnjače (297), koji predstavljaju potpuno zasebne patohistološke i kliničke entitete. U nekim su istraživanjima iz statističke analize eliminirani neki podtipovi neoplazmi štitnjače koji se nisu uklapali u statističke podatke, prvenstveno Hürthleove neoplazme (303).

Također, prema dostupnim nam podacima iz literature, do sada nema podataka o eventualnoj korelaciji između ekspresije gena *HMGA2* i kliničke uznapredovalosti te kliničkog tijeka i ishoda kod diferenciranih karcinoma štitnjače, a oko eventualne povezanosti između patohistoloških čimbenika s ekspresijom HMGA2 podaci su oskudni i nekonzistentni.

U istraživanju smo odlučili analizirati prekomjernu ekspresiju gena *HMGA2* metodom reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *qRT-PCR, quantitative reverse transcription- real-time polymerase chain reaction*), jer se ona pokazala osjetljivijom u usporedbi s određivanjem prekomjerne ekspresije proteina HMGA2 imunohistokemijskog analizom, koja je usto semikvantitativna (297).

U našem je retrospektivnom istraživanju, koje je obuhvatilo ukupno 222 bolesnika s operiranom štitnjačom, analizom uzoraka tumorskog tkiva 113 bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače uočena statistički značajno veća ekspresija gena *HMGA2* naspram bolesnika s folikularnim adenomima štitnjače, njih ukupno 55 ($P < 0,001$). Ovaj je podatak značajan, jer na većem broju bolesnika potvrđuje vrijednost prekomjerne ekspresije *HMGA2* kao korisne dodatne pretrage u razlikovanju benignih od malignih neoplazmi štitnjače. S obzirom da je među našim ispitanicima bilo vrlo malo folikularnih karcinoma štitnjače, njih svega 11%, što je u skladu s epidemiološkim podacima na razini populacije Hrvatske (5) s obzirom na adekvatan unos joda (307, 308), nije bilo smisla uspoređivati razinu ekspresije *HMGA2* između te male podskupine bolesnika s FKŠ naspram bolesnika s FA.

U prijavi istraživanja, kao kontrolna skupina s očekivanim niskim razinama ekspresije *HMGA2*, planirana je analiza uzoraka zdravog tkiva štitnjače iz kontralateralnog režnja ili zdravog okolnog tkiva istog režnja kod bolesnika s nodoznom strumom štitnjače. No s obzirom da je bila riječ o retrospektivnom istraživanju, te da su u arhivi Zavoda za patologiju našeg KBC-a bili dostupni uzorci tkiva bolesnika operiranih zbog nodozne strume, zaključili smo, s obzirom da je riječ o neneoplastičnoj dijagnozi kod koje nema povezanosti s karcinomom štitnjače, da se navedeni uzorci mogu upotrijebiti kao kontrolna skupina kod koje se očekuje niska razina ekspresije gena *HMGA2*. Rezultati istraživanja to su potvrdili. Naime, kao što smo očekivali, nije utvrđena statistički značajna razlika između ekspresije gena *HMGA2* kod bolesnika s benignim tumorima štitnjače tj. folikularnim adenomima i bolesnika s nodoznim strumama štitnjače ($P = 0,513$), dok je ta razlika bila statistički značajno veća kod bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače naspram bolesnika s nodoznim strumama ($P < 0,001$). U našem smo istraživanju, kako bi statistička snaga analize bila veća, odlučili obuhvatiti približno isti broj uzoraka bolesnika s benignim bolestima štitnjače i uzoraka tkiva u kontrolnoj skupini. U konačnici je uzoraka diferenciranih karcinoma štitnjače, ukupno gledajući bilo 113, uzoraka folikularnih adenoma bilo je 55, a uzoraka kontrolne skupine tj. nodoznih struma, bilo je 54.

Kako bismo utvrdili eventualnu povezanost prekomjerne ekspresije gena *HMGA2* s kliničkom uznapredovalošću diferenciranih karcinoma štitnjače, pri odabiru uzoraka za analizu bolesnika s DKŠ planirali smo uključiti podjednak broj bolesnika s bolešću lokaliziranom na štitnjaču u trenutku postavljanja dijagnoze tj. operacije, te bolesnika s prisutnošću limfogenih presadnica u trenutku postavljanja dijagnoze tj. operacije. S obzirom

na mali postotak bolesnika s DKŠ kod kojih nastupa hematogena diseminacija bolesti (13), nije bilo realistično očekivati da ćemo u bazi podataka DKŠ naše Klinike i pohranjenom arhivskom materijalu naći podatke o velikom broju bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače i prisutnim hematogenim presadnicama u trenutku postavljanja dijagnoze čiji će uzorci biti dostupni za analizu. Istovremeno smo željeli da uzorak bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače bude što veći, tako da smo u konačnici analizirali 45 uzoraka tkiva bolesnika s lokaliziranim DKŠ, 45 uzoraka tkiva s prisutnim limfogenim presadnicama, te 23 uzorka tkiva bolesnika s hematogenim presadnicama. Kod svih je bolesnika navedeni stadij uznapređovalosti bolesti bio utvrđen u trenutku postavljanja dijagnoze, tj. neposrednom postoperacijskom (a u nekoliko slučajeva plućnih presadnica i predoperacijskom) obradom. Analiza ekspresije gena *HMGA2* rađena je isključivo iz parafinskih blokova primarnih tumora štitnjače, s obzirom da je kod više istraživanja ekspresije *HMGA* (kako *HMGA2*, tako i *HMGA1*), ne samo kod karcinoma štitnjače (296), nego i kod drugih zloćudnih novotvorina (247, 248, 252, 264, 269, 277), pokazano da se ekspresija kod istog bolesnika značajno razlikuje u tumorskom tkivu i okolnom zdravom tkivu, te da može postojati razlika u ekspresiji između primarnog tumora i limfogenih presadnica. Ta nam činjenica ukazuje na vjerojatnu ulogu gena *HMGA2* u karcinogenezi različitih zloćudnih tumora, pa tako vjerojatno i diferenciranih karcinoma štitnjače.

Rezultati istraživanja su u potpunosti potvrdili postavljenu hipotezu – da je razina ekspresije gena *HMGA2* povezana s klinički uznapređovalijim oblicima diferenciranih karcinoma štitnjače, te da je najviša kod bolesnika s hematogenim presadnicama, a najniža kod uzoraka tkiva bolesnika s DKŠ-om ograničenim na štitnjaču. Naime, u analiziranim uzorcima tkiva, prema rastućoj kliničkoj uznapređovalosti bolesti, od lokalizirane bolesti, preko limfogene pa do hematogene diseminacije, rasla je i vrijednost ekspresije *HMGA2*. Te su razlike bile statističke značajne između svih pojedinih podskupina – ekspresija *HMGA2* bila je statistički značajno veća kod bolesnika s hematogenim presadnicama naspram bolesnika s limfogenim presadnicama ($P < 0,001$), kao i naspram bolesnika s bolešću lokaliziranom na štitnjaču ($P < 0,001$), te kod bolesnika s limfogenim presadnicama naspram onih s lokaliziranom bolešću ($P = 0,002$).

Promatrajući demografske osobine bolesnika, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji gena *HMGA2* s obzirom na dob bolesnika s DKŠ, niti skupno, ni promatrajući ih prema kliničkoj uznapređovalosti DKŠ. Bolesnici su bili podijeljeni u dvije skupine prema

dobi - bolesnici u dobi ≤ 45 god. (N=49) te u dobi >45 god. (N=64). Riječ je o dobnoj granici koja je uključena u klasifikaciju stadija bolesti prema AJCC/UICC kod bolesnika s DKŠ (157), te smo je temeljem toga mi prihvatili i analizirali. Ovaj rezultat je bio neočekivan, s obzirom da je viša dob bolesnika nepovoljan prognostički čimbenik kod DKŠ (15), te je dob bolesnika temeljem toga uključena u klasifikaciju stadija bolesti prema AJCC/UICC kod bolesnika s DKŠ (157). Kod bolesnika mlađe životne dobi, prema podacima iz literature, očekivali smo značajno nižu razinu ekspresije *HMGA2*, no rezultati to nisu pokazali.

Nije bilo statistički značajne razlike u razini ekspresije *HMGA2* s obzirom na spol bolesnika, niti skupno, niti promatrajući ih po podskupinama u ovisnosti o kliničkoj uznapređovalosti DKŠ, premda su muškarci s udaljenim presadnicama imali statistički granično višu ekspresiju *HMGA2* (P=0,056). Ovaj je rezultat također bio neočekivan, s obzirom da je muški spol nepovoljan prognostički čimbenik kod bolesnika s DKŠ (15, 146-148).

Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji *HMGA2* prema patohistološkom podtipu DKŠ, niti kad su se promatrali zasebno PKŠ, FKŠ, FVPKŠ i ca. Hürthleovih stanica, niti kad su se dva potonja pribrojili u skupinu PKŠ, odnosno FKŠ. Očekivano, bolesnika s PKŠ bilo je značajno više (N=101, što čini 89%), no bolesnika s FKŠ (N=12, što čini 11%). Takav omjer patohistoloških dijagnoza u skladu je s epidemiološkim podacima za Hrvatsku, s obzirom da smo zemlja s adekvatnim unosom joda i još prije 10-ak godina riješenim problemom jodne deficijencije (308). Bolesnika s karcinomom Hürthleovih stanica bilo je svega troje, i kod njih je ekspresija *HMGA2* bila vrlo niska (medijan ekspresije *HMGA2* za HKŠ iznosio je 1,57, dok je medijan ekspresije *HMGA2* za sve DKŠ iznosio 19,03), te je takva, niska ekspresija *HMGA2* kod HKŠ u skladu s podacima iz literature (298, 299, 303). U našem istraživanju, nismo bolesnike s karcinomima Hürthleovih stanica zbog toga isključili iz statističke analize, poput nekih autora (303), jer je riječ o podvrsti folikularnih karcinoma štitnjače, a ujedno je bila riječ o malom broju bolesnika.

Bolesnici s papilarnim mikrokarcinomima štitnjače imali su značajno nižu razinu ekspresije gena *HMGA2* od bolesnika s papilarnim nemikrokarcinomima štitnjače (P=0,021). No, kod bolesnika s mikroPKŠ koji su imali proboj čahure štitnjače, te se time klasificiraju kao stadij T3, medijan ekspresije približavao se medijanu ekspresije kod bolesnika s papilarnim nemikrokarcinomima, za razliku od bolesnika s T1a-stadijem bolesti, gdje je ekspresija *HMGA2* bila značajno niža, kako je već navedeno. Ovi su rezultati u skladu s

očekivanjima, ako pretpostavljamo da je ekspresija gena *HMGA2* nepovoljan prognostički čimbenik za diferencirane karcinome štitnjače, te da papilarni mikrokarcinomi štitnjače s probojem kapsule štitnjače, multicentričnošću i/ili limfogenim presadnicama imaju nepovoljniji klinički tijek (309). Papilarni mikrokarcinomi štitnjače definiraju se kao PKŠ promjera ≤ 10 mm (310), te se smatra da se bolesnici s mikroPKŠ koji su stadija bolesti T1aN0M0 mogu liječiti manje agresivno (12, 311), primjerice, poštenom operacijom štitnjače, ili izostavljanjem ablacijske radiojodne terapije, te da su im dovoljne supstitucijske doze L-tiroksina, tj. da kod njih nema potrebe za supresijom TSH; o svemu tome postoje određene manje razlike u preporukama različitih relevantnih društava (98-101, 160).

Značajna pozitivna korelacija, odnosno veća ekspresija *HMGA2* bila je povezana s pojedinim patohistološkim parametrima diferenciranih karcinoma štitnjače – s većim promjerom primarnog tumora, većim T-stadijem po AJCC/UICC, većim brojem patohistoloških čimbenika lošije prognoze (ovdje smo analizirali ekstrakapsularnu ekstenziju, nepovoljnu histologiju, limfovaskularnu invaziju, te pozitivne limfne čvorove), kao i većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova.

Kad detaljnije analiziramo navedene parametre, veća ekspresija gena *HMGA2* povezana s većim promjerom primarnog tumora odnosila se na bolesnike s limfogeno proširenom bolešću. S obzirom da sama veličina primarnog tumora nije jedini pokazatelj uznapređovalosti primarnog DKŠ, logično je da će se pozitivna korelacija pokazati tek kod bolesnika koji imaju N+ stadij bolesti.

Bolji pokazatelj uznapređovalosti primarnog DKŠ jest T-stadij bolesti prema klasifikaciji AJCC/UICC (157), s obzirom da, osim same veličine primarnog tumora štitnjače, uključuje i čimbenike njegove agresivnosti – proboj čahure štitnjače, te stupanj proširenosti bolesti izvan štitnjače. Značajna pozitivna korelacija, odnosno veća razina ekspresije gena *HMGA2* povezana s većim T-stadijem po AJCC/UICC, odnosila se i na bolesnike s limfogeno proširenom bolešću i na bolesnike s lokaliziranom bolešću. Kod bolesnika koji već imaju hematogene presadnice, one su glavni čimbenik agresivnosti, pa uznapređovalost primarnog tumora nije od velikog značaja.

Dodatno smo analizirali bolesnike koji su, prema općeprihvaćenim spoznajama iz literature, imali jedan ili više patohistoloških čimbenika lošije prognoze, u koje smo ubrojili četiri najznačajnija kad je riječ o bolesti koja nije hematogeno proširena, a to su – proširenost

primarnog DKŠ izvan čahure štitnjače, tzv. ekstrakapsularna ekstenzija (15, 151), nepovoljna histologija primarnog DKŠ (poput visokostaničnog ili cilindričnog podtipa PKŠ) (312, 313), limfovaskularna invazija (314), te pozitivni vratni limfni čvorovi (151, 152). Značajna pozitivna korelacija, odnosno veća ekspresija *HMGA2*, bila je povezana s većim brojem patohistoloških čimbenika lošije prognoze, a dodatnom analizom utvrđeno je da se to odnosi na bolesnike s limfogeno proširenom bolešću i lokaliziranom bolešću. To je bilo u skladu s našim očekivanjima, jer kod bolesnika koji već imaju hematogene presadnice, one su glavni čimbenik agresivnosti, pa lokoregionalni patohistološki čimbenici lošije prognoze više nisu od značaja.

Zanimljivo, uočena je tek slaba pozitivna korelacija između ekspresije *HMGA2* bolesnika različitog stadija bolesti prema AJCC/UICC. Ako se podsjetimo klasifikacije stadija bolesti po AJCC/UICC diferenciranih karcinoma štitnjače, nazire se objašnjenje ovakvog rezultata (tablica 3) (157). Naime, stupnjevanje DKŠ kod bolesnika mlađih od 45 godina u trenutku postavljanja dijagnoze (a takvih je u našem istraživanju bilo 49, tj. 43,4%) je sljedeće – samo se bolesnici s hematogenim presadnicama, neovisno o T-stadiju i N-stadiju bolesti, svrstavaju u bolesnike stadija II. Svi ostali bolesnici mlađi od 45 godina u trenutku postavljanja dijagnoze svrstavaju se u stadij I., dok stadij III. i stadij IV. bolesti u ovoj dobnoj kategoriji uopće ne postoje. Bolesnici u dobi od 45 godina ili stariji s hematogenim presadnicama se, za razliku od toga, svrstavaju u stadij IVc. Prema našem mišljenju, ovo je razlog dobivenog rezultata istraživanja.

Čimbenici lokalne uznapredovalosti i agresivnosti primarnog tumora štitnjače, temeljem kojeg se T-stadij bolesti po AJCC/UICC označava stupnjem T3 ili T4, pokazali su se značajno povezani s razinom ekspresije gena *HMGA2*. Riječ je o širenju tumorskog tkiva izvan kapsule štitnjače, tzv. proboju čahure štitnjače ili ekstrakapsularnoj ekstenziji - ETE, ($P < 0,001$), infiltraciji masnog i vezivnog tkiva ($P < 0,001$), limfovaskularnoj invaziji ($P < 0,001$), te invaziji dalje u okolinu, primjerice u okolne poprečnoprugaste mišiće, hrskavicu ili ostale okolne strukture ($P = 0,006$). Već i sama infiltracija kapsule štitnjače (bez njezina probijanja), također je bila povezana sa značajno većom ekspresijom *HMGA2* u odnosu na uzorke tkiva bolesnika bez infiltracije kapsule štitnjače ($P = 0,001$). Sve navedeno uglavnom se odnosilo na podskupine bolesnika s lokaliziranom ili bolešću proširenom u limfne čvorove. Pretpostavka je da kod bolesnika s hematogeno proširenom bolešću, lokalna agresivnost više nije od kliničkog značaja.

Premda ne predstavlja klasični rizični čimbenik kod DKŠ, multicentričnost primarnog tumora često se ipak povezuje s agresivnijim kliničkim tijekom i većim rizikom od povrata bolesti, kako lokalnog/regionalnog, tako čak i udaljenog (39, 315). Stoga smo analizirali i ovaj čimbenik u odnosu na ekspresiju *HMGA2* te utvrdili statističku značajnost ekspresije gena *HMGA2* u ovisnosti o multicentričnosti primarnog tumora ($P=0,001$). I u ovom slučaju navedeno se odnosilo na podskupine bolesnika s lokaliziranom ili bolešću proširenom u limfne čvorove. Pretpostavka je da kod bolesnika s hematogeno proširenom bolešću lokalni rizični čimbenici više nisu od kliničkog značaja.

Limfogena diseminacija bolesti se kod DKŠ smatra nepovoljnim prognostičkim čimbenikom, premda uglavnom za regionalni povrat bolesti, a manje za rizik od smrti (151, 152). Neki raniji radovi tvrdili su da zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova nema utjecaja na prognozu PKŠ, te se ona kao rizični kriterij ne nalazi u nekim starijim prognostičkim sustavima za DKŠ (146, 153, 158). Međutim, bolesnici koji u trenutku postavljanja dijagnoze, tj. kod operacije, imaju DKŠ već proširen u područne limfne čvorove, imaju, osobito u nekim slučajevima, veći rizik od povrata bolesti, kako lokoregionalno, tako čak i hematogeno. Nije svejedno, naravno, u kojoj se mjeri bolest proširila u regionalne limfne čvorove. TNM-klasifikacija stadija DKŠ po AJCC/UICC ovdje razlikuje bolesnike s presadnicama u regiju VI. vrata, tj. u pretrahealne, paratrahealne i prelaringealne/Delfijske limfne čvorove, što se označava kao N1a-stadij bolesti, od bolesnika s limfogenim presadnicama u unilateralne, bilateralne ili kontralateralne cervikalne limfne čvorove (regije vratnih limfnih čvorova I., II., III., IV. ili V.) ili u retrofaringealne ili gornje medijastinalne limfne čvorove, koji čine regiju VII. Sve navedeno označava se kao N1b-stadij bolesti (157). Bolesnici u dobi od 45 godina ili stariji, kod postavljanja dijagnoze DKŠ, u slučaju uznapredovalijeg N-statusa, bivaju klasificirani u uznapredovaliji stadij bolesti. Svi bolesnici s N1b-statusom regionalnih limfnih čvorova spadaju u stadij bolesti IVa, što je sve vidljivo u tablicama 2. i 3. Hrvatsko društvo za štitnjaču također smatra da bolesnici s limfogenim presadnicama trebaju biti ubrojani u visokorizične bolesnike (160).

Zadnje smjernice Američkog društva za štitnjaču (ATA), objavljene 2016. godine (98), otišle su korak dalje u grupiranju bolesnika s područnim presadnicama u limfne čvorove. Kao što nije svejedno u kojim se vratnim limfnim čvorovima nalaze limfogene presadnice, tako nije svejedno niti jesu li one dijagnosticirane klinički ili patohistološki, koliko ih ukupno

ima, te koje su veličine. Sve navedeno su u ATA uključili u svoju novu podjelu bolesnika prema stratifikaciji rizika, kako je vidljivo iz tablice 4.

U našem istraživanju analizirali smo, temeljem svega navedenog, više čimbenika limfogene diseminacije bolesti. Kao što je već navedeno, bolesnici s limfogenim presadnicama imali su značajno višu ekspresiju *HMGA2* u odnosu na bolesnike s bolešću lokaliziranom na štitnjaču, a značajno nižu ekspresiju *HMGA2* u odnosu na bolesnike s hematogenim presadnicama.

Unutar skupine bolesnika s limfogenim presadnicama (neovisno o tome je li riječ o maksimalnoj proširenosti bolesti u limfne čvorove, ili bolesnici dodatno imaju i hematogene presadnice), utvrdili smo da postoji značajna razlika u ekspresiji gena *HMGA2* kod bolesnika koji imaju veći pN-status bolesti po TNM-klasifikaciji AJCC/UICC, koji imaju veći apsolutni broj zahvaćenih limfnih čvorova, te kod kojih je prisutan proboj čahure limfnog čvora, kojeg smo, kao priznati nepovoljni prognostički čimbenik iz drugih lokalizacija malignih tumora, pa i kod karcinoma štitnjače (316), također posebno analizirali. Jedini parametar vezan uz limfne čvorove kod kojeg nije uočena značajna razlika u odnosu na ekspresiju *HMGA2* bila je prisutnost solitarne naspram multiplih limfogenih presadnica (neovisno o njihovom broju). Pretpostavljamo da je ovaj, jedini negativni rezultat, posljedica toga što i solitarna limfoga presadnica može biti pokazatelj veće agresivnosti bolesti, ukoliko je većeg promjera, ako postoji proboj kapsule limfnog čvora ili je smještena u nekoj od regija vratnih limfnih čvorova izvan regije VI. Ovi podaci naglašavaju važnost detaljnih patohistoloških izvještaja nakon operacije, uključujući podatke o lokalizaciji, broju i veličini zahvaćenih limfnih čvorova, te eventualnom proboju njihove čahure.

Osim patohistoloških, i različiti klinički parametri ukazuju na agresivnost pojedinih DKŠ, jer, kao što se svaki liječnik – kliničar svakodnevno može uvjeriti, između skupina bolesnika koji su u potpunosti ujednačeni prema demografskim i patohistološkim obilježjima te prema uznapredovalosti bolesti, postoje velike razlike u kliničkom ishodu, ovisno o odgovoru na liječenje. Stoga smo u naše istraživanje odlučili uključiti i dostupne nam kliničke podatke, kako bismo istražili njihovu eventualnu povezanost s ekspresijom gena *HMGA2*.

Podijelili smo naše bolesnike s DKŠ u skladu s rizičnim kriterijima navedenima u sustavu stratifikacije rizika bolesnika prema zadnjim smjernicama ATA (tablica 4.) (98). Navedeni sustav stratifikacije predstavlja kombinaciju patohistoloških i kliničkih rizičnih

čimbenika relevantnih za određivanje agresivnosti DKŠ. Usto smo podijelili bolesnike i u ovisnosti o njihovom kliničkom odgovoru na terapiju, tj. prema ishodu liječenja, također prema podjeli ATA iz smjernica za 2015. godinu (tablica 5.).

Kod bolesnika koji su kategorizirani u veću rizičnu podskupinu prema kriterijima ATA, utvrđena je pozitivna korelacija s ekspresijom gena *HMGA2*, kako skupno za sve bolesnike s DKŠ, tako i kada smo ih podijelili prema kliničkom stupnju uznapredovalosti (lokalizirani DKŠ, limfogena ili hematogena bolest).

Lošiji klinički odgovori odnosno lošiji ishodi liječenja prema kriterijima ATA, bili su statistički značajno povezani s višim razinama ekspresije gena *HMGA2* ($P=0,010$). Ispitanici koji su umrli od posljedica karcinoma štitnjače imali su najveću razinu ekspresije gena *HMGA2*.

Radiojodna terapija predstavlja najvažniji oblik sustavnog liječenja bolesnika s DKŠ zahvaljujući dobroj diferenciranosti ovih zloćudnih novotvorina, te posljedično, održanoj sposobnosti tumorskih stanica, da poput zdravih, nakupljaju jod, pa tako i njegov radioaktivni izotop, ^{131}I . Nakupljanjem radiojoda u presadnicama omogućuje se radioterapijsko liječenje u multiplim sijelima, na svim onim mjestima gdje postoji njegova intenzivna akumulacija (13).

U našem istraživanju, kod bolesnika koji su primili veću terapijsku kumulacijsku dozu radiojoda utvrđena je pozitivna korelacija s ekspresijom *HMGA2*. Riječ je bila o bolesnicima koji su primali radiojod ne samo za ablaciju ostatnog tkiva štitnjače, već često i puno više kumulacijske doze RAI od ablacijskih, s ciljem liječenja lokoregionalnih ili hematogenih presadnica bolesti.

Nažalost, ponekad se dogodi da presadnice diferenciranog karcinoma štitnjače inicijalno ili u nekom trenutku tijekom liječenja ne nakupljaju radiojod, bilo jedna, bilo više njih, što nazivamo neavidnošću za radiojod, a svi parametri koji čine DKŠ neavidnim za RAI navedeni su u radu Schlumbergera i sur. (123). Takvi bolesnici se, u slučaju simptomatske ili brzoprogresivne agresivne metastatske bolesti moraju liječiti drugim oblicima liječenja, koji polučuju znatno lošije rezultate od radiojodne terapije, te se neavidnost na radiojod smatra lošim prognostičkim čimbenikom kod bolesnika s DKŠ (122, 143).

U našem istraživanju, bolesnici koji su bili neavidni za RAI, imali su značajno višu ekspresiju *HMGA2* u usporedbi s bolesnicima koji su bili avidni za RAI ($P=0,001$).

Sve su ovo dodatni pokazatelji potvrde naše hipoteze da se ekspresija gena *HMGA2* može povezati s agresivnošću i većom kliničkom uznapredovalošću DKŠ.

U našem je istraživanju utvrđena značajna razlika u ekspresiji *HMGA2* kod bolesnika kojima je provedena radioterapija vanjskim snopovima ($P=0,003$), no ne i kod bolesnika kojima je provedena kemoterapija ($P=0,077$), ili neki drugi oblik liječenja (u što su ubrojene operacije presadnica i njihove embolizacije, $P=0,304$). Nejasno je zašto su dobiveni takvi rezultati, no riječ je sveukupno o malom broju bolesnika koji su liječeni nekim od nabrojanih terapijskih postupaka, pa je vjerojatno to razlog te diskrepancije u rezultatima istraživanja.

Kad je riječ o tumorskim biljezima koje određujemo iz seruma bolesnika, nije utvrđena statistički značajna razlika između ekspresije gena *HMGA2* i vrijednosti specifičnog tumorskog biljega za DKŠ, tireoglobulina (Tg), bilo postoperacijski, bilo tijekom zadnjeg praćenja, a razlika nije uočena ni za vrijednosti antitireoglobulinskih protutijela, Tg-At, niti postoperacijski, niti tijekom zadnje kontrole. Ovi su rezultati neočekivani, jer smo očekivali korelaciju ekspresije *HMGA2* i razine tumorskih biljega, premda je ona, kad je riječ o serumskoj vrijednosti tireoglobulina kod zadnje kontrole, na granici statističke značajnosti ($P=0,05$). Vjerojatno je razlog tome što su vrijednosti Tg nepouzdana u slučaju pozitivnog titra Tg-At, pa smo bolesnike podijelili u više skupina kako bismo obuhvatili sve kombinacije razinâ Tg i Tg-At.

Također, nije bilo statistički značajne razlike između ekspresije gena *HMGA2* i sijela presadnica kad su se analizirale sve kombinacije sijela presadnica prisutne kod naših bolesnika.

Kada promatramo ishode liječenja kod naših bolesnika, ekspresija gena *HMGA2* bila je statistički značajno veća kod bolesnika kod kojih je nastupio lokoregionalni recidiv bolesti, $P=0,028$, te kod bolesnika kod kojih je nastupio smrtni ishod kao posljedica karcinoma štitnjače, $P=0,007$.

Tijekom praćenja, od bolesnika koji su imali bolest lokaliziranu na štitnjaču ili ograničenu na regionalne limfogene presadnice kod postavljanja dijagnoze, samo je kod jednog bolesnika nastupio povrat bolesti u udaljenim sijelima, stoga nije bilo moguće učiniti statističku analizu korelacije ekspresije *HMGA2* i udaljenog povrata bolesti.

Dodatno smo, temeljem prethodno spomenutih rezultata razlike u ekspresiji između malignih (DKŠ) i benignih (FA) tumora štitnjače, odlučili učiniti ROC-analizu ekspresije gena *HMGA2* u predikciji malignih tumora štitnjače (diferencirani karcinomi štitnjače naspram folikularnih adenoma). Površina ROC-krivulje izrazito je velika (96,6%) te je statistički značajna ($P < 0,001$).

U konačnici, temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, možemo utvrditi da ekspresija gena *HMGA2* s velikom osjetljivošću i specifičnošću predviđa je li riječ o diferenciranom karcinomu štitnjače ili folikularnom adenomu štitnjače, te da bi *HMGA2* mogao imati ulogu u karcinogenezi diferenciranih karcinoma štitnjače.

Veća ekspresija gena *HMGA2* povezana je s klinički uznapredovalijim oblicima diferenciranih karcinoma štitnjače, te je s visokom statističkom značajnošću najviša kod bolesnika s hematogenim presadnicama, a najniža kod karcinoma ograničenih na štitnjaču.

Veća ekspresija gena *HMGA2* ukazuje na agresivnije oblike DKŠ koji su lošije prognoze i nepovoljnijeg kliničkog tijeka i ishoda. Time se otvara put potencijalnoj kliničkoj primjeni određivanja ekspresije *HMGA2*, ne samo kao pomoćnoj metodi i potencijalnom tumorskom biljegu u dijagnostici diferenciranih karcinoma štitnjače, predoperacijskoj i postoperacijskoj, već i u predviđanju njihova kliničkog tijeka, identificirajući bolesnike s agresivnijim oblikom bolesti, lošijom prognozom i nepovoljnijim kliničkim tijekom i ishodom, što može koristiti pri odabiru opsega i vrste terapijskih postupaka.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- 1.) Ekspresija gena *HMGA2* metodom reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) statistički je značajno veća kod bolesnika s diferenciranim karcinomima naspram bolesnika s folikularnim adenomima štitnjače ($P < 0,001$).
- 2.) Ekspresija *HMGA2* statistički je značajno veća kod bolesnika s diferenciranim karcinomima štitnjače naspram bolesnika s nodoznim strumama ($P < 0,001$).
- 3.) Nije utvrđena statistički značajna razlika između ekspresije *HMGA2* između bolesnika s benignim tumorima štitnjače tj. folikularnim adenomima i bolesnika s nodoznim strumama.
- 4.) Diferencirani karcinomi štitnjače različite kliničke uznapređovalosti imali su, prema rastućoj kliničkoj uznapređovalosti bolesti, i rastuće vrijednosti ekspresije gena *HMGA2*, a te su razlike bile statističke značajne između svih pojedinih podskupina (DKŠ ograničeni na štitnjaču, s limfogenim presadnicama i s hematogenim presadnicama).
- 5.) Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji *HMGA2* prema dobi ili spolu bolesnika s DKŠ, prema patohistološkom podtipu DKŠ, kao ni prema sijelu hematogenih presadnica.
- 6.) Ekspresija gena *HMGA2* bila je statistički značajno niža kod bolesnika s papilarnim mikrokarcinomima štitnjače u usporedbi s papilarnim nemikrokarcinomima, osim kod onih s probojem čahure štitnjače.
- 7.) Značajno veća razina ekspresije gena *HMGA2* povezana je s većim promjerom primarnog tumora, većim T-stadijem po AJCC/UICC, multicentričnim DKŠ, s probojem ili infiltracijom čahure štitnjače, infiltracijom masnog i vezivnog tkiva, s limfovaskularnom i invazijom dalje u okolinu, te s većim brojem patohistoloških čimbenika lošije prognoze.
- 8.) Značajna pozitivna korelacija, odnosno veća ekspresija gena *HMGA2*, povezana je s većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova, s prisutnim probojem kapsule limfnog čvora, te s višim pN-statusom bolesti po AJCC/UICC TNM-sustavu.
- 9.) Uočena je tek slaba pozitivna korelacija između ekspresije *HMGA2* kod bolesnika različitog stadija bolesti prema AJCC/UICC.

- 10.) Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između rizičnih skupina bolesnika prema ATA-sustavu stratifikacije rizika iz smjernica za 2015. godinu i ekspresije gena *HMGA2*.
- 11.) Lošiji klinički odgovori, odnosno lošiji ishodi liječenja prema podjeli bolesnika ovisno o odgovoru na terapiju po kriterijima ATA iz smjernica za 2015. godinu, bili su statistički značajno povezani s višim razinama ekspresije gena *HMGA2*.
- 12.) Kod bolesnika koji su primili veću terapijsku kumulacijsku dozu radiojoda, utvrđena je pozitivna korelacija s ekspresijom *HMGA2*. Bolesnici koji su bili neavidni za RAI, imali su značajno višu ekspresiju gena *HMGA2* u usporedbi s bolesnicima koji su bili avidni za RAI.
- 13.) Nije utvrđena statistički značajna razlika između ekspresije *HMGA2* i vrijednosti tireoglobulina i antitireoglobulinskih protutijela (postoperacijski ili tijekom zadnje kontrole).
- 14.) Nije utvrđena statistički značajna razlika između ekspresije *HMGA2* i provedene kemoterapije ili neke druge terapije, osim kod bolesnika kojima je provedena radioterapija.
- 15.) Ekspresija *HMGA2* bila je značajno veća u bolesnika s lokoregionalnim recidivom bolesti, te kod onih kod kojih je nastupio smrtni ishod kao posljedica karcinoma štitnjače.
- 16.) Ekspresija gena *HMGA2* s velikom osjetljivošću i specifičnošću predviđa je li riječ o diferenciranom karcinomu ili folikularnom adenomu štitnjače, te se može koristiti kao dodatna metoda u razlikovanju benignih od malignih bolesti štitnjače tj. kao tumorski biljeg u dijagnostici diferenciranih karcinoma štitnjače.
- 17.) Veća ekspresija gena *HMGA2* ukazuje na agresivnije oblike DKŠ, koji su lošije prognoze i nepovoljnijeg kliničkog tijeka i ishoda.
- 18.) Određivanje ekspresije gena *HMGA2* iz uzoraka primarnog tumora nakon operacije štitnjače može biti koristan biljeg u predviđanju kliničkog tijeka DKŠ, identificirajući bolesnike s agresivnijim oblikom bolesti, lošijom prognozom i nepovoljnijim kliničkim tijekom i ishodom, čime može koristiti pri odabiru opsega i vrste terapijskih postupaka.
- 19.) *HMGA2* mogao bi imati ulogu u karcinogenezi diferenciranih karcinoma štitnjače.

8. SAŽETAK

Identificiranje molekularnih biljega za razlikovanje benignih od malignih novotvorina štitnjače, te agresivnijih oblika diferenciranih karcinoma štitnjače (DKŠ) od onih indolentnog kliničkog tijeka, ostaje veliki izazov.

HMGA2 ima onkogeni potencijal. Povezanost povećane ekspresije gena ili proteina *HMGA2* s agresivnom bolešću dokazana je kod više različitih zloćudnih novotvorina, no ne i kod diferenciranih karcinoma štitnjače.

Cilj je ovoga istraživanja utvrditi razine ekspresije gena *HMGA2* metodom qRT-PCR u tkivima bolesnika s različitog kliničkom uznapredovalošću diferenciranih karcinoma štitnjače, folikularnim adenomima (FA) štitnjače i neneoplastičnim bolestima štitnjače - nodoznim strumama (NS).

Retrospektivnom analizom iz 222 uzorka primarnog tumora (113 DKŠ, 55 FA, 54 NS), utvrđeno je da ekspresija gena *HMGA2* s velikom osjetljivošću i specifičnošću predviđa je li riječ o DKŠ ili FA.

Veća ekspresija gena *HMGA2* povezana je s agresivnijim oblicima DKŠ (većim promjerom primarnog tumora, većim T-stadijem bolesti, multicentričnošću, ekstrakapsularnom ekstenzijom, prisutnošću limfovaskularne invazije i invazije u okolinu, većim pN-stadijem, većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova i probojem njihove kapsule), te s lošijim kliničkim odgovorima i ishodima liječenja (većom rizičnom skupinom prema ATA-sustavu stratifikacije rizika i prema ATA-kliničkom ishodu liječenja, neavidnošću na radiojod, većim rizikom od lokoregionalnog recidiva i većim rizikom smrti od DKŠ). *HMGA2* možda ima ulogu u karcinogenezi DKŠ.

Ključne riječi: *HMGA2*; ekspresija gena; reverzna transkripcija lančanom reakcijom polimerazom; karcinom štitnjače; neoplazma štitnjače

9. SUMMARY

High-mobility group A protein 2 (HMGA2) gene expression in differentiated carcinoma and benign thyroid diseases

The identification of molecular markers allowing to differentiate between benign and malignant thyroid tumors, or aggressive types of differentiated thyroid cancer (DTC) from those with indolent clinical course, remains a challenge.

HMGA2 has oncogenic potential. Correlation between upregulation of *HMGA2* gene or protein expression and disease aggressiveness has been proven in several malignant neoplasms, but not in DTC.

Aim of this research was to determine *HMGA2* gene expression levels by qRT-PCR in tissue samples from patients with different clinical stages of DTC, with thyroid follicular adenoma (FA), and in non-neoplastic thyroid disease, namely nodular goiter (NG).

By retrospective analyses of 222 tissue samples (113 DTC, 55 FA, 54 NG), it was determined with high sensitivity and specificity that *HMGA2* overexpression predicts DTC or FA.

Statistically significantly higher *HMGA2* gene expression was found in clinically more advanced stages of DTCs, and was highest in patients with distant metastases, and lowest in DTCs limited to thyroid.

Higher levels of *HMGA2* gene expression were linked to more aggressive types of DTC (with larger tumor size, higher T-stage, multicentricity, extracapsular extension, limfovacular invasion and invasion beyond thyroid, higher pN-stage, larger number of lymphonodal metastases, and lymph node capsule penetration), and to worse clinical responses and outcomes (higher ATA-risk-stratification group, worse ATA-clinical outcome of therapy, non-avidity for radioiodine, higher risk of locoregional recurrence, and higher risk of death from DTC). *HMGA2* possibly has a role in DTC carcinogenesis.

Key words: *HMGA2*; gene expression; reverse transcriptase polymerase chain reaction; thyroid carcinoma; thyroid neoplasm

Nina Dabelić, 2016.

10. LITERATURA

1. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, i sur. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1167-214.
2. Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004;351:1764-71.
3. Ron E, Lubin JH, Shore RE, i sur. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 1995;141:259-77.
4. Alterkruse S, Kosary C, Krapcho M, i sur. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. Bethesda, MD: National Cancer Institute;. 2010.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo RZR RH. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013., Bilten 30, Zagreb, 2015.
6. Bleyer A, Viny A, Barr R. Cancer in 15- to 29-year-olds by primary site. *Oncologist* 2006;11:590-601.
7. Wu X, Groves FD, McLaughlin CC, Jemal A, Martin J, Chen VW. Cancer incidence patterns among adolescents and young adults in the United States. *Cancer causes & control: CCC*. 2005;16:309-20.
8. Wu XC, Chen VW, Steele B, i sur. Cancer incidence in adolescents and young adults in the United States, 1992-1997. *J Adolesc Health* 2003;32:405-15.
9. Cramer JD, Fu P, Harth KC, Margevicius S, Wilhelm SM. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results national cancer data registry. *Surgery*. 2010;148:1147-52; discussion 52-3.
10. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2009;59:225-49.
11. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006;295:2164-7.
12. Ito Y, Tomoda C, Uruno T, i sur. Papillary microcarcinoma of the thyroid: how should it be treated? *World J Surg* 2004;28:1115-21.
13. Schlumberger M, Tubiana M, De Vathaire F, i sur. Long-term results of treatment of 283 patients with lung and bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:960-7.
14. Shoup M, Stojadinovic A, Nissan A, i sur. Prognostic indicators of outcomes in patients with distant metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Am Coll Surg* 2003;197:191-7.

15. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994;97:418-28.
16. Wong FL, Ron E, Gierowski T, Schneider AB. Benign Thyroid Tumors: General Risk Factors and Their Effects on Radiation Risk Estimation. *Am J Epidemiol* 1996;144:728-33.
17. Ron E, Doody MM, Becker DV, et al. Cancer mortality following treatment for adult hyperthyroidism. Cooperative Thyrotoxicosis Therapy Follow-up Study Group. *JAMA* 1998;280:347-55.
18. Tronko MD, Howe GR, Bogdanova TI, et al. A Cohort Study of Thyroid Cancer and Other Thyroid Diseases After the Chernobyl Accident: Thyroid Cancer in Ukraine Detected During First Screening. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:897-903.
19. Williams D. Thyroid Growth and Cancer. *Eur Thyroid J* 2015;4:164-73.
20. Jacob P, Goulko G, Heidenreich WF, et al. Thyroid cancer risk to children calculated. *Nature* 1998;392:31-2.
21. Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, et al. Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:724-32.
22. Kazakov VS, Demidchik EP, Astakhova LN. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 1992;359:21.
23. Schneider AB. Radiation-induced thyroid tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19:495-508.
24. Tuttle RM, Vaisman F, Tronko MD. Clinical presentation and clinical outcomes in Chernobyl-related paediatric thyroid cancers: what do we know now? What can we expect in the future? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2011;23:268-75.
25. Volante M, Collini P, Nikiforov YE, et al. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1256-64.
26. Volante M, Rapa I, Gandhi M, et al. RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4735-41.
27. Bruni P, Boccia A, Baldassarre G, et al. PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1. *Oncogene* 2000;19:3146-55.
28. Ringel MD, Hayre N, Saito J, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6105-11.

29. Guerra A, Di Crescenzo V, Garzi A, i sur. Genetic mutations in the treatment of anaplastic thyroid cancer: a systematic review. *BMC Surg* 2013;13:S44.
30. Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN, Sherman SI. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:278-84.
31. Wu G, Mambo E, Guo Z, i sur. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4688-93.
32. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, i sur. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 1999;155:1967-76.
33. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, i sur. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:656-8.
34. Soh EY, Eigelberger MS, Kim KJ, i sur. Neutralizing vascular endothelial growth factor activity inhibits thyroid cancer growth in vivo. *Surgery* 2000;128:1059-65;discussion 65-6.
35. Baloch Z, LiVolsi V. Pathology. U: Braverman LE, Utiger RD, ur. Werner and Ingbar's *The Thyroid: a fundamental and clinical text*, 9th edition. Lippincot, Williams and Wilkins, Philadelphia.
36. Vickery AL, Jr., Carcangiu ML, Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M. Papillary carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 1985;2:90-100.
37. Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J. Papillary thyroid carcinoma: a study of its many morphologic expressions and clinical correlates. *Pathol Annu* 1985;20 Pt 1:1-44.
38. Chernock RD, Jr JSL. Classification of Psammoma Bodies in the Revised College of American Pathologists Thyroid Cancer Protocol. <http://dxdoiorg/105858/arpa2014-0483-LE>. 2015.
39. Dzepina D, Zurak K, Petric V, Cupic H. Pathological characteristics and clinical perspectives of papillary thyroid cancer: study of 714 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014;271:141-8.
40. Baloch ZW, LiVolsi VA. Follicular-patterned afflictions of the thyroid gland: reappraisal of the most discussed entity in endocrine pathology. *Endocr Pathol* 2014;25:12-20.
41. DeGroot LJ, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2946-53.

42. Šeparović V, Krušlin B, Kosanović S, Knežević F, Šarčević B, Danilović Z. Pathohistologic procedures in encapsulated follicular tumors of the thyroid gland. *Liječ Vjesn* 1996;118:138-41.
43. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, i sur. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol* 2016. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0386. (Epub ahead of print)
44. McCartney CR, Stukenborg GJ. Decision Analysis of Discordant Thyroid Nodule Biopsy Guideline Criteria. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3037-44.
45. Eustatia-Rutten CF, Smit JW, Romijn JA, i sur. Diagnostic value of serum thyroglobulin measurements in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma, a structured meta-analysis. *Clin Endocrinol* 2004;61:61-74.
46. David A, Blotta A, Rossi R, i sur. Clinical value of different responses of serum thyroglobulin to recombinant human thyrotropin in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 2005;15:267-73.
47. Pacini F, Molinaro E, Lippi F, i sur. Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5686-90.
48. Bachelot A, Cailleux AF, Klain M, i sur. Relationship between tumor burden and serum thyroglobulin level in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 2002;12:707-11.
49. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, i sur. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1941-6.
50. Mateša N, Knežević-Obad A, Ostović KT, i sur. Croatian Society for Clinical Cytology guidelines for thyroid cytology. *Liječ Vjesn* 2012;134:203-7.
51. Liu X, Medici M, Kwong N, i sur. Bethesda Categorization of Thyroid Nodule Cytology and Prediction of Thyroid Cancer Type and Prognosis. *Thyroid* 2016;26:256-61.
52. Mateša N, Tabain I, Dabelić N, Petric V, Kusić Z. Diagnostic relevance of fine needle aspiration cytology for follicular lesions of the thyroid: retrospective study. *Croat Med J* 2002;43:606-9.

53. Mateša N, Šamija I, Kusić Z. Accuracy of fine needle aspiration biopsy with and without the use of tumor markers in cytologically indeterminate thyroid lesions. *Coll Antropol* 2010;34:53-7.
54. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:569-80.
55. Šamija I, Mateša N, Lukač J, Kusić Z. Galectin-3 and CD44v6 as markers for preoperative diagnosis of thyroid cancer by RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2011;20:233-41.
56. Huić D, Medvedec M, Dodig D, i sur. Radioiodine uptake in thyroid cancer patients after diagnostic application of low-dose ¹³¹I. *Nucl Med Commun* 1996;17:839-42.
57. Lassmann M, Luster M, Hanscheid H, Reiners C. Impact of ¹³¹I diagnostic activities on the biokinetics of thyroid remnants. *J Nucl Med* 2004;45:619-25.
58. Park HM, Park YH, Zhou XH. Detection of thyroid remnant/metastasis without stunning: an ongoing dilemma. *Thyroid* 1997;7:277-80.
59. Yin Y, Mao Q, Chen S, Li N, Li X, Li Y. A Clinical Trial of Optimal Time Interval Between Ablation and Diagnostic Activity When a Pretherapy RAI Scanning Is Performed on Patients With Differentiated Thyroid Carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e1308.
60. Bajén MT, Mañé S, Muñoz A, García JR. Effect of a diagnostic dose of 185 MBq ¹³¹I on postsurgical thyroid remnants. *J Nucl Med* 2000;41:2038-42.
61. Hilditch TE, Dempsey MF, Bolster AA, McMenemy RM, Reed NS. Self-stunning in thyroid ablation: evidence from comparative studies of diagnostic ¹³¹I and ¹²³I. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:783-8.
62. Morris LF, Waxman AD, Braunstein GD. The nonimpact of thyroid stunning: remnant ablation rates in ¹³¹I-scanned and non-scanned individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3507-11.
63. Sarkar SD, Kalappambath TP, Palestro CJ. Comparison of (¹²³)I and (¹³¹)I for whole-body imaging in thyroid cancer. *J Nucl Med* 2002;43:632-4.
64. Lakshmanan M, Schaffer A, Robbins J, Reynolds J, Norton J. A simplified low iodine diet in I-131 scanning and therapy of thyroid cancer. *Clin Nucl Med* 1988;13:866-8.
65. Morris LF, Wilder MS, Waxman AD, Braunstein GD. Reevaluation of the impact of a stringent low-iodine diet on ablation rates in radioiodine treatment of thyroid carcinoma. *Thyroid* 2001;11:749-55.

66. Pacini F, Capezzone M, Elisei R, Ceccarelli C, Taddei D, Pinchera A. Diagnostic ¹³¹-iodine whole-body scan may be avoided in thyroid cancer patients who have undetectable stimulated serum Tg levels after initial treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1499-501.
67. Fatourechi V, Hay ID, Mullan BP, i sur. Are posttherapy radioiodine scans informative and do they influence subsequent therapy of patients with differentiated thyroid cancer? *Thyroid* 2000;10:573-7.
68. Pacini F, Lippi F, Formica N, i sur. Therapeutic doses of iodine-131 reveal undiagnosed metastases in thyroid cancer patients with detectable serum thyroglobulin levels. *J Nucl Med* 1987;28:1888-91.
69. Sherman SI, Tielens ET, Sostre S, Wharam MD, Jr., Ladenson PW. Clinical utility of posttreatment radioiodine scans in the management of patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:629-34.
70. Souza Rosario PW, Barroso AL, Rezende LL, i sur. Post I-131 therapy scanning in patients with thyroid carcinoma metastases: an unnecessary cost or a relevant contribution? *Clin Nucl Med* 2004;29:795-8.
71. Avram AM. Radioiodine scintigraphy with SPECT/CT: an important diagnostic tool for thyroid cancer staging and risk stratification. *J Nucl Med* 2012;53:754-64.
72. Yamamoto Y, Nishiyama Y, Monden T, Matsumura Y, Satoh K, Ohkawa M. Clinical usefulness of fusion of ¹³¹I SPECT and CT images in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 2003;44:1905-10.
73. Casara D, Rubello D, Saladini G, i sur. Different features of pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: natural history and multivariate statistical analysis of prognostic variables. *J Nucl Med* 1993;34:1626-31.
74. Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpcao LV, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Lett* 2003;200:85-91.
75. Dietlein M, Scheidhauer K, Voth E, Theissen P, Schicha H. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and iodine-131 whole-body scintigraphy in the follow-up of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med* 1997;24:1342-8.
76. Hooft L, Hoekstra OS, Deville W, i sur. Diagnostic accuracy of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the follow-up of papillary or follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3779-86.

77. Wang W, Larson SM, Fazzari M, i sur. Prognostic value of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomographic scanning in patients with thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1107-13.
78. Chin BB, Patel P, Cohade C, Ewertz M, Wahl R, Ladenson P. Recombinant human thyrotropin stimulation of fluoro-D-glucose positron emission tomography uptake in well-differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:91-5.
79. Moog F, Linke R, Manthey N, i sur. Influence of thyroid-stimulating hormone levels on uptake of FDG in recurrent and metastatic differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 2000;41:1989-95.
80. Petrich T, Borner AR, Otto D, Hofmann M, Knapp WH. Influence of rhTSH on [(18)F]fluorodeoxyglucose uptake by differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:641-7.
81. Kebebew E, Clark OH. Locally advanced differentiated thyroid cancer. *Surg Oncol* 2003;12:91-9.
82. Takashima S, Matsushita T, Takayama F, Kadoya M, Fujimori M, Kobayashi T. Prognostic significance of magnetic resonance findings in advanced papillary thyroid cancer. *Thyroid* 2001;11:1153-9.
83. Datz FL. Cerebral edema following iodine-131 therapy for thyroid carcinoma metastatic to the brain. *J Nucl Med* 1986;27:637-40.
84. Esnaola NF, Cantor SB, Sherman SI, Lee JE, Evans DB. Optimal treatment strategy in patients with papillary thyroid cancer: a decision analysis. *Surgery* 2001;130:921-30.
85. Friedman M, Pacella BL, Jr. Total versus subtotal thyroidectomy. Arguments, approaches, and recommendations. *Otolaryngol Clin North Am* 1990;23:413-27.
86. Mazzaferri EL. An overview of the management of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 1999;9:421-7.
87. Pacini F, Elisei R, Capezzone M, i sur. Contralateral papillary thyroid cancer is frequent at completion thyroidectomy with no difference in low- and high-risk patients. *Thyroid* 2001;11:877-81.
88. Gimm O, Rath FW, Dralle H. Pattern of lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Br J Surg* 1998;85:252-4.
89. Kupferman ME, Patterson M, Mandel SJ, LiVolsi V, Weber RS. Patterns of lateral neck metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:857-60.

90. Goropoulos A, Karamoshos K, Christodoulou A, i sur. Value of the cervical compartments in the surgical treatment of papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2004;28:1275-81.
91. Grebe SK, Hay ID. Thyroid cancer nodal metastases: biologic significance and therapeutic considerations. *Surg Oncol Clin N Am* 1996;5:43-63.
92. Scheumann GF, Gimm O, Wegener G, Hundeshagen H, Dralle H. Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in papillary thyroid cancer. *World J Surg* 1994;18:559-67; discussion 67-8.
93. Tisell LE, Nilsson B, Molne J, i sur. Improved survival of patients with papillary thyroid cancer after surgical microdissection. *World J Surg* 1996;20:854-9.
94. Hay ID, Grant CS, Bergstralh EJ, Thompson GB, van Heerden JA, Goellner JR. Unilateral total lobectomy: is it sufficient surgical treatment for patients with AMES low-risk papillary thyroid carcinoma? *Surgery* 1998;124:958-64; discussion 64-6.
95. Lin JD, Chao TC, Huang MJ, Weng HF, Tzen KY. Use of radioactive iodine for thyroid remnant ablation in well-differentiated thyroid carcinoma to replace thyroid reoperation. *Am J Clin Oncol* 1998;21:77-81.
96. Randolph GW, Daniels GH. Radioactive iodine lobe ablation as an alternative to completion thyroidectomy for follicular carcinoma of the thyroid. *Thyroid* 2002;12:989-96.
97. Byrd JK, Yawn RJ, Wilhoit CS, i sur. Well differentiated thyroid carcinoma: current treatment. *Curr Treat Options Oncol* 2012;13:47-57.
98. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, i sur. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26:1-133.
99. Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Pentheroudakis G, ESMO Guidelines Working Group. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. 2012:Suppl 7:vii110-9.
100. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006;154:787-803.
101. Perros P, Boelaert K, Colley S, i sur. Guidelines for the management of thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2014;81 Suppl 1:1-122.

102. Goldsmith SJ. To ablate or not to ablate: issues and evidence involved in ¹³¹I ablation of residual thyroid tissue in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Semin Nucl Med* 2011;41:96-104.
103. Kusačić Kuna S, Samardžić T, Tešić V, i sur. Thyroid remnant ablation in patients with papillary cancer: a comparison of low, moderate, and high activities of radioiodine. *Nucl Med Commun* 2009;30:263-9.
104. Prpić M, Kruljac I, Kust D, i sur. Re-ablation I-131 activity does not predict treatment success in low- and intermediate-risk patients with differentiated thyroid carcinoma. *Endocrine* 2016;52:602-8.
105. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1447-63.
106. Robbins RJ, Schlumberger MJ. The evolving role of (¹³¹)I for the treatment of differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 2005;46 Suppl 1:28-37.
107. Durante C, Haddy N, Baudin E, i sur. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2892-9.
108. Robbins RJ, Wan Q, Grewal RK, i sur. Real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography scanning. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:498-505.
109. Rubino C, de Vathaire F, Dottorini ME, i sur. Second primary malignancies in thyroid cancer patients. *Br J Cancer* 2003;89:1638-44.
110. Chen L, Shen Y, Luo Q, Yu Y, Lu H, Zhu R. Pulmonary fibrosis following radioiodine therapy of pulmonary metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010;20:337-40.
111. Kloos RT, Duvuuri V, Jhiang SM, Cahill KV, Foster JA, Burns JA. Nasolacrimal drainage system obstruction from radioactive iodine therapy for thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5817-20.
112. Hovens GC, Stokkel MP, Kievit J, i sur. Associations of serum thyrotropin concentrations with recurrence and death in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2610-5.
113. Jonklaas J, Sarlis NJ, Litofsky D, i sur. Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. *Thyroid* 2006;16:1229-42.

114. McGriff NJ, Csako G, Gourgiotis L, Lori CG, Pucino F, Sarlis NJ. Effects of thyroid hormone suppression therapy on adverse clinical outcomes in thyroid cancer. *Ann Med* 2002;34:554-64.
115. Pujol P, Daures JP, Nsakala N, Baldet L, Bringer J, Jaffiol C. Degree of thyrotropin suppression as a prognostic determinant in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4318-23.
116. Wang PW, Wang ST, Liu RT, i sur. Levothyroxine suppression of thyroglobulin in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4549-53.
117. Sugitani I, Fujimoto Y. Does postoperative thyrotropin suppression therapy truly decrease recurrence in papillary thyroid carcinoma? A randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4576-83.
118. Klein Hesselink EN, Klein Hesselink MS, de Bock GH, i sur. Long-term cardiovascular mortality in patients with differentiated thyroid carcinoma: an observational study. *J Clin Oncol* 2013;31:4046-53.
119. Biondi B, Cooper DS. Benefits of thyrotropin suppression versus the risks of adverse effects in differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2010;20:135-46.
120. Brierley JD, Tsang RW. External beam radiation therapy for thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37:497-509.
121. Giuliani M, Brierley J. Indications for the use of external beam radiation in thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* 2014;26:45-50.
122. Schlumberger M. Management of refractory thyroid cancers. *Ann Endocrinol (Paris)* 2011;72:149-57.
123. Schlumberger M, Brose M, Elisei R, i sur. Definition and management of radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:356-8.
124. Dinneen SF, Valimaki MJ, Bergstralh EJ, Goellner JR, Gorman CA, Hay ID. Distant metastases in papillary thyroid carcinoma: 100 cases observed at one institution during 5 decades. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2041-5.
125. Schlumberger MJ. Diagnostic follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma: historical perspective and current status. *J Endocrinol Invest* 1999;22(11 Suppl):3-7.
126. Capdevila J, Argiles G, Rodriguez-Frexinos V, Nuñez I, Tabernero J. New approaches in the management of radioiodine-refractory thyroid cancer: the molecular targeted therapy era. *Discov Med* 2010;9:153-62.

127. Shimaoka K, Schoenfeld DA, DeWys WD, Creech RH, DeConti R. A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma. *Cancer* 1985;56:2155-60.
128. De Besi P, Busnardo B, Toso S, i sur. Combined chemotherapy with bleomycin, adriamycin, and platinum in advanced thyroid cancer. *J Endocrinol Invest* 1991;14:475-80.
129. Sherman SI. Cytotoxic chemotherapy for differentiated thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;22:464-8.
130. Sherman SI. Advances in chemotherapy of differentiated epithelial and medullary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1493-9.
131. Elisei R, Ugolini C, Viola D, i sur. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3943-9.
132. Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2010;321:86-93.
133. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:184-99.
134. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet* 2013;381:1058-69.
135. Kapiteijn E, Schneider TC, Morreau H, Gelderblom H, Nortier JW, Smit JW. New treatment modalities in advanced thyroid cancer. *Ann Oncol* 2012;23:10-8.
136. Homsy J, Daud AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control* 2007;14:285-94.
137. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1454-7.
138. Wang Y, Hou P, Yu H, i sur. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2387-90.
139. Blair HA, Plosker GL. Sorafenib: a review of its use in patients with radioactive iodine-refractory, metastatic differentiated thyroid carcinoma. *Target Oncol* 2015;10:171-8.
140. McFarland DC, Misiukiewicz KJ. Sorafenib in radioactive iodine-refractory well-differentiated metastatic thyroid cancer. *Onco Targets Ther* 2014;7:1291-9.

141. Sacks W, Braunstein GD. Evolving approaches in managing radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract* 2014;20:263-75.
142. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, i sur. Lenvatinib versus Placebo in Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer. *N Engl J Med* 2015;372:621-30.
143. Schlumberger M, Brose M, Elisei R, i sur. Definition and management of radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:356-8.
144. Gruber JJ, Colevas AD. Differentiated thyroid cancer: focus on emerging treatments for radioactive iodine-refractory patients. *Oncologist* 2015;20:113-26.
145. Oyer SL, Smith VA, Lentsch EJ. Reevaluating the prognostic significance of age in differentiated thyroid cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;147:221-6.
146. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 1988;104:947-53.
147. Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, i sur. Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 1985;55:794-804.
148. Yang L, Shen W, Sakamoto N. Population-based study evaluating and predicting the probability of death resulting from thyroid cancer and other causes among patients with thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:468-74.
149. Evans HL, Vassilopoulou-Sellin R. Follicular and Hurthle cell carcinomas of the thyroid: a comparative study. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1512-20.
150. Lang W, Choritz H, Hundeshagen H. Risk factors in follicular thyroid carcinomas. A retrospective follow-up study covering a 14-year period with emphasis on morphological findings. *Am J Surg Pathol* 1986;10:246-55.
151. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:414-24.
152. Smith VA, Sessions RB, Lentsch EJ. Cervical lymph node metastasis and papillary thyroid carcinoma: does the compartment involved affect survival? Experience from the SEER database. *J Surg Oncol* 2012;106:357-62.
153. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993;114:1050-7; discussion 7-8.
154. Pacini F, Cetani F, Miccoli P, i sur. Outcome of 309 patients with metastatic differentiated thyroid carcinoma treated with radioiodine. *World J Surg* 1994;18:600-4.

155. 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;11:571-9.
156. Lang BHH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Staging Systems for Papillary Thyroid Carcinoma: A Review and Comparison. *Ann Surg* 2007;245:366-78.
157. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., ur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7. izd. New York, NY: Springer; 2010.
158. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 1987;102:1088-95.
159. Byar DP, Green SB, Dor P, et al. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer* 1979;15:1033-41.
160. Kusić Z, Jukić T, Dabelić N, Franceschi M. Croatian Thyroid Society guidelines for the management of patients with differentiated thyroid cancer. *Liječn Vjesn* 2008;130:213-27.
161. McHenry CR, Phitayakorn R. Follicular Adenoma and Carcinoma of the Thyroid Gland. *Oncologist* 2011;16:585-93.
162. Bisi H, Fernandes VS, de Camargo RY, Koch L, Abdo AH, de Brito T. The prevalence of unsuspected thyroid pathology in 300 sequential autopsies, with special reference to the incidental carcinoma. *Cancer* 1989;64:1888-93.
163. Silverberg SG, Vidone RA. Adenoma and carcinoma of the thyroid. *Cancer* 1966;19:1053-62.
164. LiVolsi VA, Asa SL. The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* 1994;4:233-6.
165. Ashar HR, Chouinard RA, Jr., Dokur M, Chada K. In vivo modulation of HMGA2 expression. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:55-61.
166. Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, et al. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett* 2004;574:1-8.
167. Thanos D, Maniatis T. The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell* 1992;71:777-89.
168. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973;38:14-9.
169. Wolffe AP. Architectural transcription factors. *Science* 1994;264:1100-1.

170. Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 1994;10:94-100.
171. Reeves R. Structure and function of the HMGI(Y) family of architectural transcription factors. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 5:803-9.
172. Bustin M, Reeves R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996;54:35-100.
173. Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* 2007;17:72-9.
174. Ozturk N, Singh I, Mehta A, Braun T, Barreto G. HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Front Cell Dev Biol* 2014;2:5.
175. Lund T, Holtlund J, Fredriksen M, Laland SG. On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett* 1983;152:163-7.
176. Cleynen I, Van de Ven WJ. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol* 2008;32:289-305.
177. Solomon MJ, Strauss F, Varshavsky A. A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1276-80.
178. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:899-910.
179. Noro B, Licheri B, Sgarra R, i sur. Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry* 2003;42:4569-77.
180. Yie J, Liang S, Merika M, Thanos D. Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol Cell Biol* 1997;17:3649-62.
181. Borrmann L, Schwanbeck R, Heyduk T, i sur. High mobility group A2 protein and its derivatives bind a specific region of the promoter of DNA repair gene ERCC1 and modulate its activity. *Nucleic Acids Res* 2003;31:6841-51.
182. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:5237-46.
183. Reeves R, Beckerbauer L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 2001;1519:13-29.

184. Chiappetta G, Avantaggiato V, Visconti R, i sur. High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene* 1996;13:2439-46.
185. Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 1995;376:771-4.
186. Rogalla P, Drechsler K, Frey G, i sur. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* 1996;149:775-9.
187. Pfannkuche K, Summer H, Li O, Hescheler J, Droge P. The high mobility group protein HMGA2: a co-regulator of chromatin structure and pluripotency in stem cells? *Stem Cell Rev* 2009;5:224-30.
188. Caron L, Bost F, Prot M, Hofman P, Binetruy B. A new role for the oncogenic high-mobility group A2 transcription factor in myogenesis of embryonic stem cells. *Oncogene* 2005;24:6281-91.
189. Rommel B, Rogalla P, Jox A, i sur. HMGI-C, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 1997;26:603-7.
190. Anand A, Chada K. In vivo modulation of Hmgic reduces obesity. *Nat Genet* 2000;24:377-80.
191. Chieffi P, Battista S, Barchi M, i sur. HMGA1 and HMGA2 protein expression in mouse spermatogenesis. *Oncogene* 2002;21:3644-50.
192. Di Agostino S, Fedele M, Chieffi P, i sur. Phosphorylation of high-mobility group protein A2 by Nek2 kinase during the first meiotic division in mouse spermatocytes. *Mol Biol Cell* 2004;15:1224-32.
193. Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM, Van de Ven WJ. Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development. *Oncogene* 1999;18:5076-87.
194. Li Z, Gilbert JA, Zhang Y, i sur. An HMGA2-IGF2BP2 axis regulates myoblast proliferation and myogenesis. *Dev Cell* 2012;23:1176-88.
195. Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 2008;135:227-39.
196. Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 2001;277:63-81.

197. Foti D, Chiefari E, Fedele M, i sur. Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat Med* 2005;11:765-73.
198. Schlueter C, Hauke S, Loeschke S, Wenk HH, Bullerdiek J. HMGA1 proteins in human atherosclerotic plaques. *Pathol Res Pract* 2005;201:101-7.
199. Li O, Vasudevan D, Davey CA, Droge P. High-level expression of DNA architectural factor HMGA2 and its association with nucleosomes in human embryonic stem cells. *Genesis* 2006;44:523-9.
200. Benson KF, Chada K. Mini-mouse: phenotypic characterization of a transgenic insertional mutant allelic to pygmy. *Genet Res* 1994;64:27-33.
201. Brants JR, Ayoubi TA, Chada K, Marchal K, Van de Ven WJ, Petit MM. Differential regulation of the insulin-like growth factor II mRNA-binding protein genes by architectural transcription factor HMGA2. *FEBS Lett* 2004;569:277-83.
202. Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol* 1992;12:3919-29.
203. Giancotti V, Berlingieri MT, DiFiore PP, Fusco A, Vecchio G, Crane-Robinson C. Changes in nuclear proteins on transformation of rat epithelial thyroid cells by a murine sarcoma retrovirus. *Cancer Res* 1985;45:6051-7.
204. Giancotti V, Pani B, D'Andrea P, i sur. Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with v-ras and v-mos oncogenes and by cotransfection with c-myc and polyoma middle T genes. *EMBO J* 1987;6:1981-7.
205. Berlingieri MT, Manfioletti G, Santoro M, i sur. Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. *Mol Cell Biol* 1995;15:1545-53.
206. Giancotti V, Buratti E, Perissin L, i sur. Analysis of the HMGI nuclear proteins in mouse neoplastic cells induced by different procedures. *Exp Cell Res* 1989;184:538-45.
207. Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 1995;10:436-44.
208. Ashar HR, Tkachenko A, Shah P, Chada K. HMGA2 is expressed in an allele-specific manner in human lipomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;143:160-8.
209. B Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A, i sur. Expression levels of HMGA2 in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer* 2009;8:36.

210. Hatano H, Morita T, Ogose A, i sur. Clinicopathological features of lipomas with gene fusions involving HMGA2. *Anticancer Res* 2008;28:535-8.
211. Kubo T, Matsui Y, Naka N, i sur. Expression of HMGA2-LPP and LPP-HMGA2 fusion genes in lipoma: identification of a novel type of LPP-HMGA2 transcript in four cases. *Anticancer Res* 2009;29:2357-60.
212. Ligon AH, Moore SD, Parisi MA, i sur. Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas. *Am J Hum Genet* 2005;76:340-8.
213. Nilsson M, Mertens F, Hoglund M, Mandahl N, Panagopoulos I. Truncation and fusion of HMGA2 in lipomas with rearrangements of 5q32-->q33 and 12q14-->q15. *Cytogenet Genome Res* 2006;112:60-6.
214. Nilsson M, Panagopoulos I, Mertens F, Mandahl N. Fusion of the HMGA2 and NFIB genes in lipoma. *Virchows Arch* 2005;447:855-8.
215. Pierron A, Fernandez C, Saada E, i sur. HMGA2-NFIB fusion in a pediatric intramuscular lipoma: a novel case of NFIB alteration in a large deep-seated adipocytic tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;195:66-70.
216. Gross KL, Neskey DM, Manchanda N, i sur. HMGA2 expression in uterine leiomyomata and myometrium: quantitative analysis and tissue culture studies. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:68-79.
217. Hodge JC, Cuenco KT, Huyck KL, i sur. Uterine leiomyomata and decreased height: a common HMGA2 predisposition allele. *Hum Genet* 2009;125:257-63.
218. Hunter DS, Klotzbucher M, Kugoh H, i sur. Aberrant expression of HMGA2 in uterine leiomyoma associated with loss of TSC2 tumor suppressor gene function. *Cancer Res* 2002;62:3766-72.
219. Ingraham SE, Lynch RA, Surti U, i sur. Identification and characterization of novel human transcripts embedded within HMGA2 in t(12;14)(q15;q24.1) uterine leiomyoma. *Mutat Res* 2006;602:43-53.
220. Klemke M, Meyer A, Nezhad MH, i sur. Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:171-8.
221. Markowski DN, von Ahsen I, Nezhad MH, Wosniok W, Helmke BM, Bullerdiek J. HMGA2 and the p19Arf-TP53-CDKN1A axis: a delicate balance in the growth of uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:661-8.

222. Kazmierczak B, Rosigkeit J, Wanschura S, i sur. HMGI-C rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors. *Oncogene* 1996;12:515-21.
223. Lemke I, Rogalla P, Grundmann F, Kunze WP, Haupt R, Bullerdiek J. Expression of the HMGA2-LPP fusion transcript in only 1 of 61 karyotypically normal pulmonary chondroid hamartomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;138:160-4.
224. Dahlen A, Mertens F, Rydholm A, i sur. Fusion, disruption, and expression of HMGA2 in bone and soft tissue chondromas. *Mod Pathol* 2003;16:1132-40.
225. Dal Cin P, Wanschura S, Kazmierczak B, i sur. Amplification and expression of the HMGIC gene in a benign endometrial polyp. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22:95-9.
226. Walter TA, Fan SX, Medchill MT, i sur. Inv(12)(p11.2q13) in an endometrial polyp. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;41:99-103.
227. Geurts JM, Schoenmakers EF, Roijer E, Astrom AK, Stenman G, van de Ven WJ. Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 1998;16:865-72.
228. Geurts JM, Schoenmakers EF, Roijer E, Stenman G, Van de Ven WJ. Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer Res* 1997;57:13-7.
229. Geurts JM, Schoenmakers EF, Van de Ven WJ. Molecular characterization of a complex chromosomal rearrangement in a pleomorphic salivary gland adenoma involving the 3'-UTR of HMGIC. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:198-205.
230. Wanschura S, Kazmierczak B, Schoenmakers E, i sur. Regional fine mapping of the multiple-aberration region involved in uterine leiomyoma, lipoma, and pleomorphic adenoma of the salivary gland to 12q15. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14:68-70.
231. Staats B, Bonk U, Wanschura S, i sur. A fibroadenoma with a t(4;12) (q27;q15) affecting the HMGI-C gene, a member of the high mobility group protein gene family. *Breast Cancer Res Treat* 1996;38:299-303.
232. Medeiros F, Erickson-Johnson MR, Keeney GL, i sur. Frequency and characterization of HMGA2 and HMGA1 rearrangements in mesenchymal tumors of the lower genital tract. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46:981-90.
233. Micci F, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Heim S. Deregulation of HMGA2 in an aggressive angiomyxoma with t(11;12)(q23;q15). *Virchows Arch* 2006;448:838-42.

234. Rabban JT, Dal Cin P, Oliva E. HMGA2 rearrangement in a case of vulvar aggressive angiomyxoma. *Int J Gynecol Pathol* 2006;25:403-7.
235. Rawlinson NJ, West WW, Nelson M, Bridge JA. Aggressive angiomyxoma with t(12;21) and HMGA2 rearrangement: report of a case and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;181:119-24.
236. Sato K, Terai K, Ozaki M, Ueda Y, Katsuda S. Odontogenic myxofibroma with HMGA2 overexpression and HMGA2 rearrangement. *Pathol Int* 2010;60:760-4.
237. Van Dorpe J, Dal Cin P, Weremowicz S, i sur. Translocation of the HMGI-C (HMGA2) gene in a benign mesenchymoma (chondrolipoangioma). *Virchow Arch* 2002;440:485-90.
238. Fedele M, Battista S, Kenyon L, i sur. Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas. *Oncogene* 2002;21:3190-8.
239. Fedele M, Pierantoni GM, Visone R, Fusco A. Critical role of the HMGA2 gene in pituitary adenomas. *Cell Cycle* 2006;5:2045-8.
240. Fedele M, Visone R, De Martino I, i sur. HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. *Cancer Cell* 2006;9:459-71.
241. Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, i sur. The High Mobility Group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer Res* 2002;62:2398-405.
242. Pierantoni GM, Finelli P, Valtorta E, i sur. High-mobility group A2 gene expression is frequently induced in non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), even in the absence of chromosome 12 polysomy. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:867-74.
243. Qian ZR, Asa SL, Siomi H, i sur. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2009;22:431-41.
244. Chiappetta G, Bandiera A, Berlingieri MT, i sur. The expression of the high mobility group HMGI (Y) proteins correlates with the malignant phenotype of human thyroid neoplasias. *Oncogene* 1995;10:1307-14.
245. Young AR, Narita M. Oncogenic HMGA2: short or small? *Genes Dev* 2007;21:1005-9.
246. Rho YS, Lim YC, Park IS, i sur. High mobility group HMGI(Y) protein expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2007;127:76-81.

247. Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK, Imai K. Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res* 2004;64:2024-9.
248. Meyer B, Loeschke S, Schultze A, i sur. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* 2007;46:503-11.
249. Rice SJ, Lai SC, Wood LW, i sur. MicroRNA-33a mediates the regulation of high mobility group AT-hook 2 gene (HMGA2) by thyroid transcription factor 1 (TTF-1/NKX2-1). *J Biol Chem* 2013;288:16348-60.
250. Kumar MS, Armenteros-Monterroso E, East P, i sur. HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature* 2014;505:212-7.
251. Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, i sur. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol* 2006;209:206-12.
252. Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, i sur. An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer* 2003;89:2104-9.
253. Piscuoglio S, Zlobec I, Pallante P, i sur. HMGA1 and HMGA2 protein expression correlates with advanced tumour grade and lymph node metastasis in pancreatic adenocarcinoma. *Histopathology* 2012;60:397-404.
254. Hristov AC, Cope L, Di Cello F, i sur. HMGA1 correlates with advanced tumor grade and decreased survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2010;23:98-104.
255. Hristov AC, Cope L, Reyes MD, i sur. HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2009;22:43-9.
256. Abe N, Watanabe T, Sugiyama M, i sur. Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker. *Cancer Res* 1999;59:1169-74.
257. Balcerczak M, Pasz-Walczak G, Balcerczak E, Wojtylak M, Kordek R, Mirowski M. HMGI(Y) gene expression in colorectal cancer: comparison with some histological typing, grading, and clinical staging. *Pathol Res Pract* 2003;199:641-6.
258. Bush BM, Brock AT, Deng JA, Nelson RA, Sumter TF. The Wnt/beta-catenin/T-cell factor 4 pathway up-regulates high-mobility group A1 expression in colon cancer. *Cell Biochem Funct* 2013;31:228-36.

259. Chiappetta G, Manfioletti G, Pentimalli F, i sur. High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. *Int J Cancer* 2001;91:147-51.
260. Cleynen I, Huysmans C, Sasazuki T, Shirasawa S, Van de Ven W, Peeters K. Transcriptional control of the human high mobility group A1 gene: basal and oncogenic Ras-regulated expression. *Cancer Res* 2007;67:4620-9.
261. Fedele M, Bandiera A, Chiappetta G, i sur. Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins. *Cancer Res* 1996;56:1896-901.
262. Kim DH, Park YS, Park CJ, i sur. Expression of the HMGI(Y) gene in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1999;84:376-80.
263. Helmke BM, Markowski DN, Meyer A, Bullerdiek J. The expression of HMGA2 varies strongly among colon carcinomas. *Anticancer Res* 2012;32:1589-93.
264. Li Y, Zhao Z, Xu C, Zhou Z, Zhu Z, You T. HMGA2 induces transcription factor Slug expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to colon cancer progression. *Cancer Lett* 2014;355:130-40.
265. Wang X, Liu X, Li AY, i sur. Overexpression of HMGA2 promotes metastasis and impacts survival of colorectal cancers. *Clinical Cancer Res* 2011;17:2570-80.
266. Chen X, Lechago J, Ertan A, i sur. Expression of the high mobility group proteins HMGI(Y) correlates with malignant progression in Barrett's metaplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:30-3.
267. Liu Q, Lv GD, Qin X, i sur. Role of microRNA let-7 and effect to HMGA2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep* 2012;39:1239-46.
268. Nam ES, Kim DH, Cho SJ, i sur. Expression of HMGI(Y) associated with malignant phenotype of human gastric tissue. *Histopathology* 2003;42:466-71.
269. Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clinical Cancer Res* 2008;14:2334-40.
270. Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, i sur. High mobility group A1 is expressed in metastatic adenocarcinoma to the liver and intrahepatic cholangiocarcinoma, but not in hepatocellular carcinoma: its potential use in the diagnosis of liver neoplasms. *J Gastroenterol* 2003;38:1144-9.

271. Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, *i sur.* Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group I(Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis. *Keio J Med* 2004;53:90-7.
272. Wu L, Wang Z, Lu R, Jiang W. Expression of high mobility group A2 is associated with poor survival in hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2012;18:983-7.
273. Lee CT, Wu TT, Lohse CM, Zhang L. High-mobility group AT-hook 2: an independent marker of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2014;45:2334-40.
274. Chiappetta G, Botti G, Monaco M, P, *i sur.* HMGA1 protein overexpression in human breast carcinomas: correlation with ErbB2 expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:7637-44.
275. Flohr AM, Rogalla P, Bonk U, *i sur.* High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade. *Histol Histopathol* 2003;18:999-1004.
276. Mansueto G, Forzati F, Ferraro A, *i sur.* Identification of a New Pathway for Tumor Progression: MicroRNA-181b Up-Regulation and CBX7 Down-Regulation by HMGA1 Protein. *Genes Cancer* 2010;1:210-24.
277. Wend P, Runke S, Wend K, *i sur.* WNT10B/beta-catenin signalling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer. *EMBO Mol Med* 2013;5:264-79.
278. Jones AM, Mitter R, Poulson R, *i sur.* mRNA expression profiling of phyllodes tumours of the breast: identification of genes important in the development of borderline and malignant phyllodes tumours. *J Pathol* 2008;216:408-17.
279. Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, Rippe V, Bonk U, Bullerdiek J. Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. *Mol Carcinog* 1997;19:153-6.
280. Masciullo V, Baldassarre G, Pentimalli F, *i sur.* HMGA1 protein over-expression is a frequent feature of epithelial ovarian carcinomas. *Carcinogenesis* 2003;24:1191-8.
281. Mahajan A, Liu Z, Gellert L, *i sur.* HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol* 2010;23:673-81.
282. Califano D, Pignata S, Losito NS, *i sur.* High HMGA2 expression and high body mass index negatively affect the prognosis of patients with ovarian cancer. *J Cell Physiol* 2014;229:53-9.

283. Hetland TE, Holth A, Kaern J, Florenes VA, Trope CG, Davidson B. HMGA2 protein expression in ovarian serous carcinoma effusions, primary tumors, and solid metastases. *Virchows Arch* 2012;460:505-13.
284. Wu J, Liu Z, Shao C, i sur. HMGA2 overexpression-induced ovarian surface epithelial transformation is mediated through regulation of EMT genes. *Cancer Res* 2011;71:349-59.
285. Galdiero F, Romano A, Pasquinelli R, i sur. Detection of high mobility group A2 specific mRNA in the plasma of patients affected by epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2015;6:19328-35.
286. Franco R, Esposito F, Fedele M, i sur. Detection of high-mobility group proteins A1 and A2 represents a valid diagnostic marker in post-pubertal testicular germ cell tumours. *J Pathol* 2008;214:58-64.
287. Bussemakers MJ, van de Ven WJ, Debruyne FM, Schalken JA. Identification of high mobility group protein I(Y) as potential progression marker for prostate cancer by differential hybridization analysis. *Cancer Res* 1991;51:606-11.
288. Tamimi Y, van der Poel HG, Denyn MM, i sur. Increased expression of high mobility group protein I(Y) in high grade prostatic cancer determined by in situ hybridization. *Cancer Res* 1993;53:5512-6.
289. Shi Z, Wu D, Tang R, i sur. Silencing of HMGA2 promotes apoptosis and inhibits migration and invasion of prostate cancer cells. *J Biosci* 2016;41:229-36.
290. Akai T, Ueda Y, Sasagawa Y, i sur. High mobility group I-C protein in astrocytoma and glioblastoma. *Pathol Res Pract* 2004;200:619-24.
291. Donato G, Martinez Hoyos J, i sur. High mobility group A1 expression correlates with the histological grade of human glial tumors. *Oncol Rep* 2004;11:1209-13.
292. Alshenawy H. Can HMGI-C be used as an aid with MDM2 and CDK4 to differentiate liposarcoma subtypes from their mimics? *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:1073-81.
293. Li Z, Zhang Y, Ramanujan K, Ma Y, Kirsch DG, Glass DJ. Oncogenic NRAS, required for pathogenesis of embryonic rhabdomyosarcoma, relies upon the HMGA2-IGF2BP2 pathway. *Cancer Res* 2013;73:3041-50.
294. Ding X, Wang Y, Ma X, i sur. Expression of HMGA2 in bladder cancer and its association with epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Prolif* 2014;47:146-51.
295. Chiappetta G, Tallini G, De Biasio MC, i sur. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:4193-8.

296. Belge G, Meyer A, Klemke M, i sur. Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:56-63.
297. Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, i sur. HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer* 2008;44:1015-21.
298. Lappinga PJ, Kip NS, Jin L, i sur. HMGA2 gene expression analysis performed on cytologic smears to distinguish benign from malignant thyroid nodules. *Cancer Cytopathol* 2010;118:287-97.
299. Jin L, Lloyd RV, Nassar A, i sur. HMGA2 expression analysis in cytological and paraffin-embedded tissue specimens of thyroid tumors by relative quantitative RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2011;20:71-80.
300. Nagar S, Ahmed S, Peeples C, i sur. Evaluation of genetic biomarkers for distinguishing benign from malignant thyroid neoplasms. *Am J Surg* 2014;207:596-601.
301. Foukakis T, Gusnanto A, Au AY, i sur. A PCR-based expression signature of malignancy in follicular thyroid tumors. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:381-91.
302. Prasad NB, Kowalski J, Tsai HL, i sur. Three-gene molecular diagnostic model for thyroid cancer. *Thyroid* 2012;22:275-84.
303. Jin L, Lloyd RV, Henry MR, i sur. The diagnostic utility of combination of HMGA2 and IMP3 qRT-PCR testing in thyroid neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015;23:36-43.
304. Dabelić N, Mateša N, Mateša-Anić D, Kusić Z. Malignancy risk assessment in adenomatoid nodules and suspicious follicular lesions of the thyroid obtained by fine needle aspiration cytology. *Coll Antropol* 2010;34:349-54.
305. Mateša N, Šamija I, Kusić Z. Galectin-3 and CD44v6 positivity by RT-PCR method in fine needle aspirates of benign thyroid lesions. *Cytopathology* 2007;18:112-6.
306. Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, i sur. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82:57-65.
307. Kusić Z, Jukić T, Rogan SA, i sur. Current status of iodine intake in Croatia--the results of 2009 survey. *Coll Antropol* 2012;36:123-8.
308. Kusić Z, Novosel SA, Dabelić N, i sur. Croatia has reached iodine sufficiency. *J Endocrinol Invest* 2003;26:738-42.

309. Džepina D, Bedeković V, Čupić H, Krušlin B. Papillary thyroid microcarcinoma: clinical and pathological study of 321 cases. *Coll Antropol* 2012;36 Suppl 2:39-45.
310. Roti E, degli Uberti EC, Bondanelli M, Braverman LE. Thyroid papillary microcarcinoma: a descriptive and meta-analysis study. *Eur J Endocrinol* 2008;159:659-73.
311. Ito Y, Uruno T, Nakano K, i sur. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid* 2003;13:381-7.
312. Dettmer MS, Schmitt A, Steinert H, i sur. Tall cell papillary thyroid carcinoma: new diagnostic criteria and mutations in BRAF and TERT. *Endocrine Relat Cancer* 2015;22:419-29.
313. Kluijfhout WP, Pasternak JD, Lim J, i sur. Frequency of High-Risk Characteristics Requiring Total Thyroidectomy for 1-4 cm Well-Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26:820-4.
314. Kim JM, Kim TY, Kim WB, i sur. Lymphovascular invasion is associated with lateral cervical lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116:2081-5.
315. Tam AA, Ozdemir D, Cuhaci N, i sur. Association of multifocality, tumor number, and total tumor diameter with clinicopathological features in papillary thyroid cancer. *Endocrine* 2016;Apr 18 (Epub ahead of print)
316. Yamashita H, Noguchi S, Murakami N, Kawamoto H, Watanabe S. Extracapsular invasion of lymph node metastasis is an indicator of distant metastasis and poor prognosis in patients with thyroid papillary carcinoma. *Cancer* 1997;80:2268-72.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. prosinca 1968. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1987. godine, a diplomirala 1994. godine.

Nakon pripravničkog staža, od 1997. do 2001. godine radila sam kao znanstvena novakinja, a u razdoblju od 2001. do 2005. godine specijalizirala sam radioterapiju i onkologiju u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC „Sestre milosrdnice“, gdje sam i sada zaposlena.

Specijalistički ispit iz radioterapije i onkologije položila sam 2005. godine.

Suradnik sam u dodiplomskoj nastavi iz predmeta Onkologija te u poslijediplomskoj nastavi iz nuklearne medicine i otorinolaringologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Autor sam i koautor 19 znanstvenih radova u međunarodno indeksiranim časopisima, od čega je 10 radova objavljeno u časopisima citiranima u Current Contentsu, 17 poglavlja u recenziranim knjigama i zbornicima, jednog poglavlja u udžbeniku, 35 sažetaka u zbornicima međunarodnih znanstvenih skupova, te 23 sažetka u zbornicima domaćih znanstvenih skupova. Bila sam pozvani predavač na više znanstvenih i stručnih skupova.

Članica sam Hrvatske liječničke komore i Hrvatskog liječničkog zbora, u čijem radu aktivno sudjelujem kao članica Hrvatskog društva za štitnjaču, Hrvatskog onkološkog društva i Hrvatskog društva za endokrinološku onkologiju. Članica sam Europskog društva za medicinsku onkologiju (ESMO).