

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Jelena R. Janković

**ANALIZA PROTEINSKIH I GENETIČKIH BIOMARKERA U
PREOPERATIVNOJ I POSTOPERATIVNOJ DIFERENCIJALNOJ
DIJAGNOSTICI TUMORA ŠTITASTE ŽLEZDE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Jelena R. Janković

**ANALYSIS OF PROTEIN AND GENETIC MARKERS IN
PREOPERATIVE AND POSTOPERATIVE DIFFERENTIAL
DIAGNOSIS OF THYROID GLAND TUMORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor: dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Mentor: dr Svetana Paskaš, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Svetana Paskaš, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

dr Svetislav Tatić, redovni profesor

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Milan Nikolić, docent

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Izvod

Karcinom štitne žlezde je najčešće maligno boljenje endokrinih organa. Incidenca tiroidnog kancera je u poslednjih trideset godina porasla u gotovo svim regijama u svetu, i ovaj trend zabeležen je i u Srbiji. Citološka analiza uzoraka dobijenih biopsijom tankom iglom (FNAB) omogućava diferencijalnu dijagnostiku ovih lezija, međutim u oko 30% slučajeva daje neodređene rezultate. Pacijenti kojima se ne može postaviti jasna dijagnoza se šalju na dijagnostičku lobektomiju i kod više od trećine operisanih se dijagnostikuje indolentna benigna lezija koja nije zahtevala operativni tretman. Pacijenti sa malignitetom, sa druge strane, bivaju podvrgnuti i drugoj, terapijskoj operaciji. Postoperativna dijagnostika, iako preciznija, takođe nije bez nedostataka. Kriterijumi koji razdvajaju benigne od malignih lezija folikularne arhitekture nisu jasno definisani. Ovi problemi ukazuju na potrebu za dodatnim testovima, odnosno pomoćnim dijagnostičkim markerima.

Dosadašnje studije su analizirale različite proteinske i genetičke markere, kao i njihove kombinacije. Neki od njih su pokazali dobre dijagnostičke performanse. Ipak, različiti nedostaci prate upotrebu ovih markera u klinici - imunohistohemijsko određivanje proteinskih biomarkera podleže subjektivnosti u ocenjivanju, dok korišćenje mutacija kao genetičkih markera pokazuje visoku specifičnost, ali nisku osetljivost jer mnogi karcinomi ne nose mutacije.

U ovoj disertaciji su analizirani biomarkeri mereni na nivou DNK, RNK i proteina. Na postoperativnim uzorcima je imunohistohemijski određena ekspresija i tkivna lokalizacija proteina kaveolina-1, kao i prisustvo *BRAF* V600E. U uzorcima biopsija je pored pomenutih markera, određeno i prisustvo *RET/PTC1* i 3 hromozomskih rearanžmana i EGFRvIII mutacije. Ekspresija gena za EGFR je određena u uzorcima grupisanim prema ekspresiji kaveolina-1 i prisustva *BRAF* V600E mutacije, i analizirane su međusobne korelacije ovih markera, činilaca MAPK signalnog puta. Marker koji su pokazali dobru diskriminatorsku moć su analizirani zajednički i određen je dijagnostički potencijal ove kombinacije. Analizom korelacija sa kliničko-patološkim parametrima, određen je njihov prognostički značaj.

Rezultati ove disertacije su pokazali da se proteinska ekspresija kaveolina-1 može upotrebiti kao dijagnostički marker za razlikovanje histotipova slične morfologije, i za diskriminaciju benignih od malignih lezija. Utvrđeno je da su nivoi kaveolina-1 u epitelnom odeljku u pozitivnoj korelaciji sa limfnim metastazama, suprotno od stromalnih koji korelišu negativno sa dubinom infiltracije karcinoma. Ovo ukazuje na potencijalno različite uloge kaveolina-1 u kancerogenezi u zavisnosti od ćelijskog konteksta. *BRAF* V600E mutacija je detektovana gotovo isključivo u malignim lezijama, i utvrđeno je da kod papilarnog tiroidnog karcinoma pozitivno koreliše sa parametrima agresivnosti. Ova mutacija takođe pozitivno koreliše sa ekspresijom kaveolina-1 u epitelnom tkivnom odeljku, a negativno sa ekspresijom stromalnog kaveolina-1. Ekspresija gena za EGFR je

bila najviša kod malignih lezija sa negativnim kaveolinom-1 i *wild type* BRAF genotipom. Pokazano je da su epitelni nivoi kaveolina-1 u negativnoj korelaciji sa ekspresijom EGFR. Nivoi ekspresije EGFR nisu pokazali povezanost sa parametrima agresivnosti karcinoma, što ukazuje na izostanak uticaja EGFR na napredovanje kancera. Dijagnostička tačnost testa sačinjenog od proteinske ekspresije kaveolina-1, ekspresije gena za EGFR i prisustva *BRAF* V600E mutacije je nadmašila dijagnostičku tačnost citološke analize. Ostali analizirani markeri nisu pokazali dijagnostički ili prognostički potencijal.

Rezultati ovog rada ukazuju na mogućnost korišćenja kombinacije markera kaveolina-1, *BRAF* V600E i EGFR u preoperativnoj dijagnostici. Ovi markeri takođe pomažu otkrivanje agresivnijih lezija, zbog čega bi se mogli koristiti za preoperativnu stratifikaciju pacijenata sa tiroidnim kancerom. Međusobne asocijacije ovih markera ukazuju na mogućnost njihovog međusobnog uticaja i time efekta na modulisanje MAPK signalizacije. Za potvrdu ovih rezultata potrebna je multicentrična studija na većem broju uzoraka, kao i dublja funkcionalna analiza ovog signalnog puta.

Ključne reči: karcinom štitne žlezde, dijagnostika, biomarkeri, FNAB, kaveolin-1, BRAF, EGFR

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Hemijska osnova života. Biohemija i bioorganska hemija uopšte.

UDK broj: 577.1

Abstract

Thyroid cancer is the most common malignancy of the endocrine system. Over the last 30 years the incidence of thyroid cancer has been increasing in almost all regions of the world, and this trend has also been recorded in Serbia. Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) has enabled preoperative differential diagnosis of these lesions, however, 30% of aspirations yield indeterminate results. Patients with nodules that are not clearly benign or malignant undergo diagnostic lobectomy, and more than a third of them prove to have benign, indolent lesions that did not require surgical treatment. Patients diagnosed with malignancy, on the other hand, are referred to a second, therapeutic surgery. Postoperative diagnosis is more precise, yet, it has drawbacks. The criteria for differentiating benign from malignant lesions with follicular architecture is not well defined. The aforementioned obstacles stress the need for additional tests, i.e. the use of adjunct diagnostic biomarkers.

A large number of potential protein and genetic biomarkers, as well as their combinations, has been analysed and some of them proved to have good diagnostic performances. Still, there are obstacles in applying these biomarkers in the clinical setting – immunohistochemical scoring of protein markers is prone to subjective interpretation, while genetic mutation testing, although high in specificity, shows low sensitivity given that many malignant lesions do not bear any known mutations.

The aim of this dissertation was the evaluation of potential thyroid cancer biomarkers measured on DNA, RNA and protein level. Postoperative tissue samples were used for immunohistochemical analysis of the expression and tissue localisation of the protein caveolin-1, and determination of the presence of *BRAF* V600E mutation. Biopsy samples were used for the analysis of the previously mentioned biomarkers, as well as to determine the frequency of *RET/PTC1* and 3 chromosomal rearrangements and *EGFR*vIII mutation. After dividing the samples in groups according to caveolin-1 expression and *BRAF* genotype, *EGFR* gene expression was measured. The mutual associations of these markers, components of the MAPK signaling pathway, were also determined. Markers with a good discriminatory power were analysed in combination. Their associations with clinico-pathological parameters were used to determine their prognostic value.

The results of this dissertation have shown that protein expression of caveolin-1 can be used for differentiating lesions with similar histological features, as well for discriminating benign from malignant nodules. The levels of caveolin-1 in epithelial tissue compartment of malignant lesions correlate positively with the presence of lymphatic tumor spreading, while, contrary to that, stromal caveolin-1 correlates negatively with the degree of tumor infiltration. This indicates that caveolin-1 has different roles in cancer progression depending on the cellular context. *BRAF* V600E mutation was detected almost exclusively

in malignant lesions, and in papillary thyroid cancer samples this marker correlated positively with the parameters of aggressiveness. *BRAF* mutation also showed a positive association with epithelial caveolin-1, but a negative correlation with the stromal expression of this protein. The highest EGFR gene expression was measured in the group of patients with negative caveolin-1, and wild type *BRAF* genotype. EGFR levels correlated negatively with epithelial caveolin-1 protein expression. There was no association between the levels of EGFR with clinico-pathological parameters, indicating a lack of influence of EGFR on cancer progression. The diagnostic accuracy of a test formed by combining caveolin-1 protein expression, *BRAF* V600E status and EGFR gene expression surpassed the diagnostic performance of cytology. The diagnostic or prognostic potential of other analysed markers did not prove to be significant.

These results have shown that the combination of caveolin-1, *BRAF* V600E and EGFR can be used in preoperative diagnostics. These markers could also help in stratification of high-risk patients with thyroid cancer. Mutual associations of these markers indicate a possibility of their relative influence, which could have an effect on the modulation of MAPK pathway. A larger, multicentric study, as well as a thorough functional analysis is required to confirm these findings.

Keywords: thyroid cancer, diagnosis, biomarkers, FNAB, caveolin-1, BRAF, EGFR

Scientific field: Biochemistry

Subfield: Chemical basis of life.

UDC number: 577.1

Skraćenice

AAPC	godišnja promena udela bolesnih (engl. <i>Average Annual Percent Change</i>)
ABC	avidin-biotin kompleks sa kuplovanom peroksidazom
ATC	anaplastični tiroidni karcinom
A-TG	anti-tiroglobulinska antitela
A-TPO	anti-tiroidne peroksidaze antitela
A-TSH-R	anti-TSH receptorska antitela
AUS/FLUS	atipija neodređenog značaja ili folikularna lezija neodređenog značaja (engl. <i>Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance</i>)
<i>BRAF</i>	proto-onkogen za B-raf serin/treonin kinazu
<i>CAVI</i>	gen za kaveolin-1
CBD	domen za vezivanje za kaveolin-1 (engl. <i>Caveolin Binding Domen</i>)
cDNK	komplementarna DNK (engl. <i>complementary</i>)
CK19	citokeratin 19
CSD	domen za vezivanje partnerskih proteina na kaveolinu-1 (engl. <i>Caveolin Scaffolding Domain</i>)
DAB	3, 3'-diaminobenzidin, supstrat za peroksidazu
DEPC	dietilpirokarbonat
DIT	dijodtirozin
dNTP	deoksi nukleotid- tri- fosfat
DT	dijagnostička tačnost
DTC	diferentovani tiroidni karcinom
ECL	reagens za autoradiografiju (engl. <i>Enhanced ChemiLuminescence</i>)
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta (engl. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EGFRvIII	mutacija delecijom u genu za EGFR
FN/SFN	folikularna neoplazma ili sumnja na folikularnu neoplazmu (engl. <i>Follicular Neoplasm or Suspicious for a Follicular Neoplasm</i>)
FNAB	biopsija tankom iglom (engl. <i>Fine Neddle Aspiration Biopsy</i>)
FT3	slobodni trijodtironin
FT4	slobodni tiroksin
FTA	folikularni tiroidni adenom
FTC	folikularni tiroidni karcinom
<i>GADPH</i>	gen za gliceraldehid-3-fosfat hidrogenazu
GEC	komercijalni test za utvrđivanje rizika od maligniteta tiroidee kompanije <i>Veracyte</i> (engl. <i>Gene Expression Classifier</i>)

HBME-1	nepoznati antigen u citoplazmi mezotelijalnih ćelija (engl. <i>Hector Batioffora Mesothelia Antigen-1</i>)
HE	hematoksilin/eozin bojenje mikroskopskih preparata
HER2	član ERBB familije receptora
HTA	<i>Hürtle</i> tiroidni adenom
HTC	<i>Hürtle</i> tiroidni karcinom
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenim stimulusom (engl. <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MIT	monojodtirozin
MTC	medularni tiroidni karcinom
NPV	negativna prediktivna vrednost
OS	osetljivost
PPV	pozitivna prediktivna vrednost
pT	patološki T status, mera rasprostranjenosti tumora
PT	peritumorsko tkivo
PTC	papilarni tiroidni karcinom
PTC ds	papilarni tiroidni karcinom difuzno-sklerozne varijante
PTC fv	papilarni tiroidni karcinom folikularne varijante
PTC kl	papilarni tiroidni karcinom klasične varijante
PTC s	papilarni tiroidni karcinom solidne varijante
PTC trab	papilarni tiroidni karcinom trabekularne varijante
PTC w	papilarni tiroidni karcinom <i>Warthin-like</i> varijante
PTH	paratiroidni hormon
RAS	proto-onkogen za male GTPaze
RET	proto-onkogen za RET serin/treonin kinazu
RET/PTC	hromozomski rearažmani nastali fuzijom RET gena sa drugim genima otkriveni u papilarnom karcinomu
ROC	kriva balansa senzitivnosti i specifičnosti (engl. <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
RTK	receptor tirozin kinaza
SP	specifičnost
SUSP	sumnja na malignitet (engl. <i>Suspicious for Malignancy – SUSP</i>)
T3	trijodtironin
T4	tiroksin
TBG	tiroksin-vezujući globulin (engl. <i>Thyroxine Binding Globulin - TBG</i>)
TCGA	projekat mapiranja molekulskih promena u kancerskom genomu (engl. <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TG	tiroglobulin
TGF α	transformišući faktor rasta α (engl. <i>Transforming Growth Factor-α</i>)

TNM	sistem za određivanje stadijuma tumora prema rasprostranjenosti (T), nodalnim metastazama (N) i udaljenim metastazama (M)
TPO	tiroidna peroksidaza
TRH	tirotropin-otpuštajući hormon (engl. <i>Thyrotropin-Releasing Hormone</i>)
TSH	tirostimulirajući hormon
TSHR	receptor za tirostimulirajući hormon
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Štitna žlezda	2
1.1.1. Građa štitne žlezde	2
1.1.2. Folikularne ćelije i sinteza hormona štitne žlezde.....	3
1.1.3. Funkcija hormona štitne žlezde i regulacija njihove sekrecije	5
1.1.4. Poremećaji funkcije štitne žlezde	7
1.2. Tumori štitne žlezde	8
1.2.1. Faktori rizika za razvoj karcinoma štitne žlezde	8
1.2.2. Incidenca i mortalitet karcinoma štitne žlezde	9
1.2.3. Klasifikacija tumora štitne žlezde	13
1.2.4. Dijagnostika karcinoma štitne žlezde	16
1.3. Biomarkeri karcinoma štitne žlezde	21
1.3.1. Serumski biomarkeri	21
1.3.2. Proteinski biomarkeri	22
1.3.3. Genetički biomarkeri.....	23
1.3.4. Kaveolin-1	27
1.3.5. Receptor za epidermalni faktor rasta - EGFR	30
1.3.6. BRAF V600E mutacija	32
1.3.7 <i>RET/PTC</i> rearanžmani.....	34
1.3.8. EGFRvIII.....	36
2. Cilj istraživanja	39
3. Materijal i metode	41

3.1. Aparati i uređaji.....	42
3.2. Osnovne hemikalije.....	42
3.3. Puferi i rastvori.....	45
3.4. Antitela.....	46
3.5. Klinički materijal	47
3.5.1. Uzorci FNA biopsije	47
3.5.2. Tkivo štitne žlezde - arhivski materijal	48
3.5.3. Tkivo štitne žlezde - sveže postoperativno tkivo	48
3.6. Izolovanje DNK	49
3.7. Izolovanje RNK	50
3.8. Reverzna transkripcija.....	51
3.9. Alel - specifični PCR.....	51
3.10. Kvantitativni PCR	53
3.11. Detekcija rearanžmana i delecija.....	53
3.12. Izolovanje proteina.....	54
3.13. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza i Western blot.....	54
3.14. Imunocitohemija	55
3.15. Imunohistohemija.....	55
3.16. Imunofluorescenca	56
3.17. Statistička obrada podataka.....	56
4. Rezultati	58
4.1. Ispitivanje odabranih biomarkera u postoperativnim uzorcima tumora štitne žlezde.....	59
4.1.1. Imunohistohemijsko određivanje nivoa ekspresije kaveolina-1 u benignim i malignim tumorima štitne žlezde	59
4.1.2. Ekspresija kaveolina-1 na mRNK nivou u uzorcima benignih i malignih tumora štitaste žlezde.....	63

4.1.3. Ekspresija kaveolina-1 na proteinskom nivou u papilarnom tiroidnom karcinomu	65
4.1.4. Tkivna distribucija kaveolina-1 u papilarnom tiroidnom karcinomu	67
4.1.5. Detekcija <i>CAVI</i> P132L mutacije u benignim i malignim tumorima tiroidee.....	70
4.1.6. Detekcija <i>BRAF</i> V600E mutacije u papilarnom tiroidnom karcinomu	72
4.1.7. Promena ekspresije kaveolina-1 u odnosu na <i>BRAF</i> V600E mutacioni status.....	74
4.1.8. Prognosticki potencijal kaveolina-1 kao markera agresivnosti karcinoma štitne žlezde	76
4.2. Ispitivanje odabranih biomarkera u preoperativnim uzorcima tumora štitne žlezde.....	78
4.2.1. Citološka analiza uzoraka sa FNA biopsije.....	78
4.2.2. Analiza hormona i proteinskih markera u serumu pacijenata sa indikacijom za operaciju štitne žlezde	78
4.2.3. Analiza proteinske ekspresije kaveolina-1 u uzorcima FNA biopsije.....	81
4.2.4. Analiza genetičkih markera u uzorcima sa FNA biopsije	82
4.3. Dijagnostički potencijal biomarkera	84
4.3.1. Poređenje agresivnosti tiroidnih karcinoma	86
4.3.2. Ekspresija EGF receptora.....	87
4.3.4. Određivanje ukupnog dijagnostičkog potencijala biomarkera	89
5. Diskusija.....	90
5.1. Dijagnostički i prognostički potencijal kaveolina-1 u pre i postoperativnim uzorcima štitne žlezde.....	91
5.2. <i>BRAF</i> V600E u karcinomu štitne žlezde.....	95
5.3. Ekspresija kaveolina-1 u kontekstu <i>BRAF</i> mutacionog statusa	97
5.4. Ekspresija EGFR u odnosu na <i>BRAF</i> V600E mutaciju i ekspresiju kaveolina-1.....	98
6. Zaključci.....	102
7. Literatura	106

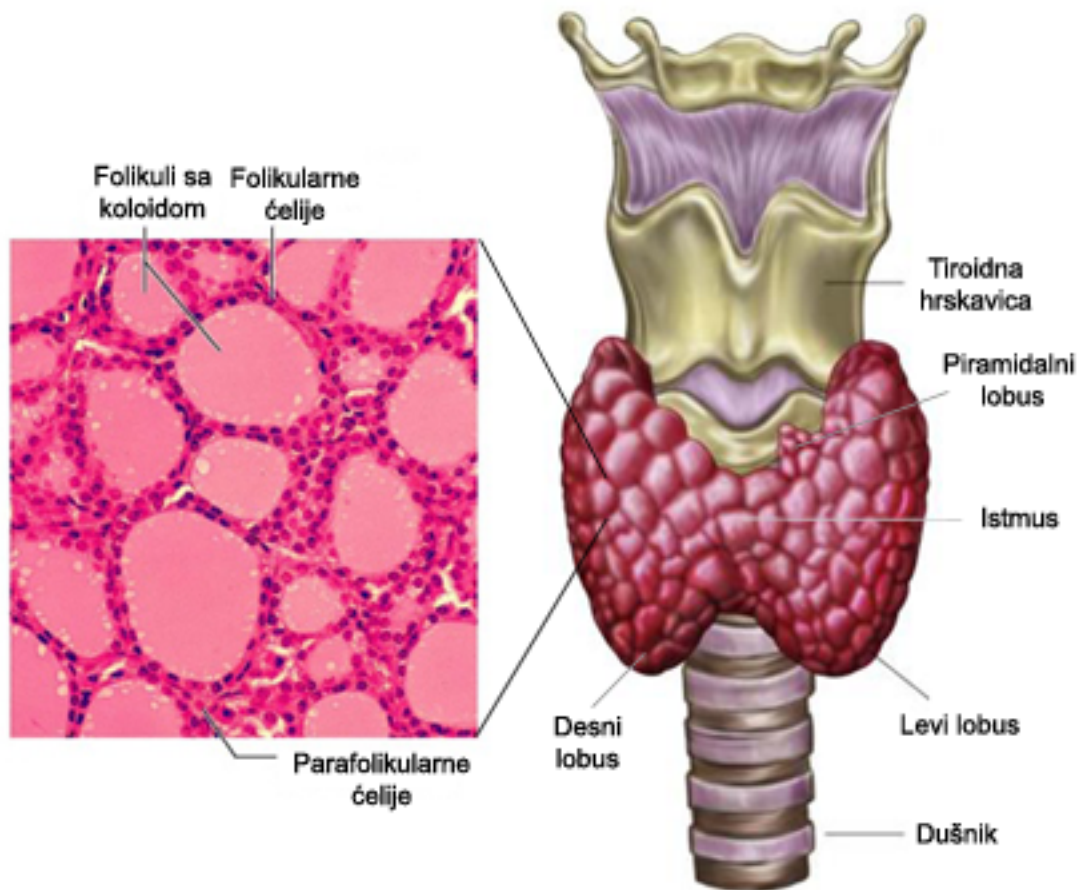
1. Uvod

1.1. Štitna žlezda

Štitna (štitasta) ili tiroidna žlezda je organ koji se nalazi na prednjem delu vrata ispred i oko dušnika. Dobila je naziv po tiroidnoj hrskavici koja je deo skeleta grkljana, a ima oblik štita (od grčke reči *thyreos* koja znači štit). Sastoji se od dva lobusa povezanih istmusom (tkivnim mostom) na koji se kod nekih osoba može nastavljati treći, piramidalni lobus [1]. Osnovna funkcija tiroidne žlezde je sinteza i sekrecija tiroidnih hormona (trijodtironina, tiroksina, kalcitonina) koji regulišu veliki broj metaboličkih procesa u organizmu.

1.1.1. Građa štitne žlezde

Tiroidna žlezda odraslih osoba teži od 15 do 25 g, dok su proporcije pojedinačnog lobusa u proseku 4,0 x 2,0 x 4,0 cm. Žlezdu okružuje fibrozna kapsula koja se spaja sa unutartiroidnom fibroznom septom (pregradom) i formiraju se lobulusi. Svaki lobulus je opskrbljen sa po jednom arterijom i sadrži 20 – 40 folikula. Folikuli predstavljaju osnovnu strukturnu jedinicu štitne žlezde, veličine su oko 200 nm, i ispunjeni su koloidom (**Slika 1**). Folikule uokviruje jednosloj niskih, kuboidnih folikularnih ćelija - tirocita. Visina i oblik tirocita su u korelaciji sa stepenom aktivnosti; hiperaktivne ćelije su izdužene, dok su manje aktivne spljoštene sa malo citoplazme. Koloid je bogat glikoproteinom tiroglobulinom koji predstavlja depo hormona štitne žlezde koji se prema potrebama organizma mobilize [1].



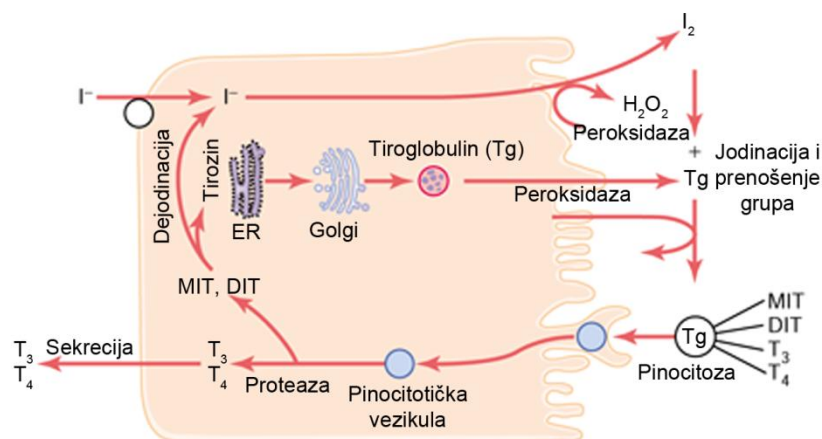
Slika 1. Anatomija i građa štitne žlezde. Izvor: Stocktrek Images/Getty Images.

Štitna žlezda sadrži i parafolikularne - C ćelije koje su u klasterima umetnute u međufolikulski prostor ili se nalaze na dodiru folikula sa bazalnom membranom. Ove ćelije su bogate kalcitoninom, hormonom koji reguliše metabolizam kalcijuma, odnosno sprečava resorpciju Ca^{2+} iz kostiju kada njegov nivo u serumu u poraste [2].

1.1.2. Folikularne ćelije i sinteza hormona štitne žlezde

Folikularne ćelije ili tirociti su mesta u kojima se vrši sinteza tiroidnih hormona i njihova sekrecija u krvotok. Sinteza hormona se odvija u nekoliko faza koje se odigravaju u različitim delovima tirocita. Folikularne ćelije su funkcionalno polarizovane - različiti procesi se odvijaju na različitim polovima ćelije. Bazalna membrana ćelije prima spoljne

stimuluse, preuzima jod i izlučuje tiroidne hormone, dok se na apikalnom polu vrši sinteza tiroidnih hormona (**Slika 2**).



Slika 2. Sinteza hormona štitne žlezde u folikularnoj ćeliji. Skraćenice: T3 – trijodtironin, T4 – tiroksin, MIT – monojodtirozin, DIT – dijodtirozin, Tg – tiroglobulin. Adaptirano iz [3].

Na bazalnoj membrani tirocita se nalaze receptori za tirostimulirajući hormon (TSH) koji reguliše aktivnost tirocita, kao i Na-I pumpa čija je uloga preuzimanje jodidnog jona (I^-) iz cirkulacije. Na-I pumpa aktivnim transportom unosi jod simportom sa natrijumom u ćelije štitne žlezde, nasuprot elektrohemijском gradijentu stvorenom radom Na-K pumpe. Jod se po preuzimanju u ćelije prenosi kroz citoplazmu i transportuje u koloid. Folikularne ćelije sintetišu tiroglobulin (Tg), protein velike molekulske mase (660 kDa) koji je donor tirozina za sintezu tiroidnih hormona. Tg se nakon sinteze izlučuje u koloid. Na apikalnoj membrani tirocita se zatim nastavlja sinteza tiroidnih hormona. Enzim tiroidna-peroksidaza (TPO), vezan za apikalni pol tirocita, u prisustvu vodonik-peroksida vrši oksidaciju jodida do joda, a zatim se pomoću enzima jodinaze, jod ugrađuje u tirozinske ostatke na Tg. Za ovu reakciju je bitan i enzim dualna-oksidaza (Duox) koja katalizuje nastajanje vodonik-peroksida. Ugradnjom joda na Tg nastaju monojodtirozin (MIT) i dijodidtirozin (DIT). Prenosom MIT ili DIT grupe na MIT ili DIT vezan za Tg formiraju se trijodtironin (MIT+DIT) i tetrajodtironin - tiroksin (DIT+DIT). Dakle, tiroidni hormoni se sintetišu unutar molekula tiroglobulina i ostaju za njega vezani i skladišeni u koloidu odakle se po potrebi mobilišu. U lumenu folikula se nalazi količina hormona koja

pokriva potrebe organizma za 2-3 meseca. Kada folikulska ćelija dobije stimulus od TSH, folikularne ćelije aktiviraju proces mikropinocitoze koji je poslednji korak u sintezi tiroidnih hormona. Endocitotska vezikula se spaja sa lizozomom gde se dešava proteoliza Tg čime se oslobađaju T3 i T4, kao i MIT i DIT. Trijodtironin i tiroksin se kroz bazalnu membranu otpuštaju u cirkulaciju, dok mono i dijodtirozin podležu dejodinaciji i slobodni I se ponovo ugrađuje u Tg [4].

Slobodni T3 i T4 se u cirkulaciji vezuju i prenose pomoću tiroksin-vezujućeg globulina (engl. *thyroxine binding globulin* - TBG), prealbumina ili albumina. Oko 99% sekretovanih hormona će se u cirkulaciji nalaziti vezano za transportne proteine, dok je samo mala frakcija slobodnih hormona biološki aktivna. Vezane frakcije se stoga ponašaju kao depo hormona u cirkulaciji, jer po utrošku slobodne frakcije, otpuštaju nove količine hormona [5].

1.1.3. Funkcija hormona štitne žlezde i regulacija njihove sekrecije

Po ulasku hormona u ćeliju, skoro sav tiroksin se pomoću enzima dejodinaze konvertuje u trijodtironin, pošto receptori za tiroidne hormone imaju veći afinitet za trijodtironin nego za tiroksin. Tiroidni hormoni se vezuju za receptore u praktično svim ćelijama organizma, s obzirom da utiču na sintezu proteina koji učestvuju u osnovnim energetske procesima. Receptori za tiroidne hormone su jedarni receptori koji se vezuju direktno za DNK, ili posredno, vezivanjem za druge transkripcione faktore.

Osnovna funkcija tiroidnih hormona je pojačavanje bazalnog metabolizma ćelije. Uopšteno, oni deluju na pojačavanje anabolizma, ali i katabolizma, utiču na pravilan razvoj fetusa i pravilan rast dece, pojačavaju mentalne procese i aktivnost drugih endokrinih žlezda. Neki od ćelijskih procesa na koje utiču tiroidni hormoni su:

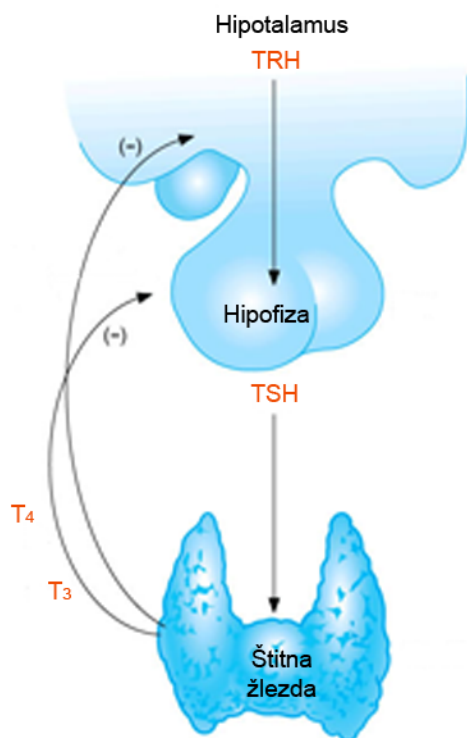
- povećavanje broja i aktivnosti mitohondrija, čime se povećava koncentracija ATP-a;
- aktiviranje Na/K pumpe koja troši veliku količinu energije, što ima za posledicu stvaranje toplote;
- stimulacija metabolizma ugljenih hidrata (glikolize, glukoneogeneze, usvajanje glukoze u gastrointestinalnom traktu, povećavanje sinteze insulina);

- stimulacija metabolizma masti (mobilizacija masti, oksidacija masnih kiselina, snižavanje koncentracije holesterola u plazmi).

Budući da kontolišu brzinu metaboličkih procesa u gotovo svim ćelijama organizma, tiroidni hormoni utiču na rad i pravilno funkcionisanje celog organizma. U pogledu delovanja na organe, tiroidni hormoni između ostalog utiču na:

- cirkulaciju i rad srca;
- brzinu varenja hrane uključujući i otpušanje enzima za varenje;
- kontrakciju mišića;
- prenos nervnih impulsa;
- sekreciju hormona drugih endokrinih žlezda (otpuštanje insulina iz pankreasa, paratiroidnog hormona iz paratiroidnih žlezda, adrenokortikotropnog hormona iz adenohipofize i glukokortikoida iz nadbubrežnih žlezda) [3].

Rad štitne žlezde je pod kontrolom hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine koja je prikazana na **Slici 3**.



Slika 3. Hipotalamo – hipofizno - tiroidna osovina. Adaptirano iz [6].

Hipotalamus sintetise i otpušta tirotropin-otpuštajući hormon (engl. *thyrotropin-releasing hormone* - TRH) koji se vezuje za receptore ćelija adenohipofize. Kao posledica tog vezivanja, hipofiza ekskretuje TSH, koji se otpušta u cirkulaciju i vezivanjem za receptore na bazalnoj membrani tirocita, aktivira sintezu i sekreciju tiroidnih hormona. Povratnom spregom tiroidni hormoni deluju na otpuštanje hormona hipotalamusa i hipofize. Serumski T4 koji se intracelularno dejodiniše reguliše otpuštanje TRH u hipotalamusu, dok je dejstvo na adenohipofizu direktno - dejodinacijom T4 u samoj hipofizi dolazi do smanjenog lučenja TSH, i indirektno, iz hipotalamusa, snižavanjem nivoa TRH [7].

1.1.4. Poremećaji funkcije štitne žlezde

Tiroidni poremećaji rezultiraju promenom nivoa hormona u cirkulaciji. Sniženi nivoi tiroidnih hormona izazivaju hipotiroidizam, dok povišeni nivoi T3 i T4 izazivaju hipertiroidizam. Oba ova poremećaja mogu izazvati pojavu gušavosti (strume) – uvećanja štitne žlezde. Težak hipotiroidizam u toku fetalnog razvoja i ranog detinjstva rezultira kretinizmom.

Najčešći uzrok hipertiroidizma je autoimuno oboljenje pod nazivom Grejvs-Bazedovljeva bolest, gde se stvaraju auto-antitela na TSH receptor (A-TSH-R). Dugotrajnom, nekontrolisanom stimulacijom TSH receptora, tirociti proliferišu i štitna žlezda se uvećava. Nivoi tiroidnih hormona u krvotoku rastu i povratnom spregom utiču na smanjenje TSH u cirkulaciji. Simptomi ove bolesti su gubitak težine, pojačano znojenje, nervoza, dijareja, slabost mišića, malaksalost i gubitak sna. Kod težih oblika javlja se egzoftalmus – protruzija očnih jabučica. Hipertiroidizam može biti i posledica adenoma koji sekretuje povećane količine tiroidnih hormona. Ovaj poremećaj se obično leči hirurškim uklanjanjem dela štitne žlezde ili tumora koji je uzročnik bolesti.

Hipotiroidizam je u većini slučajeva posledica autoimunog inflamatornog procesa u organizmu - Hašimotovog tiroiditisa. Tokom upalnog procesa koji se odigrava u tkivu štitne žlezde, stvaraju se antitela prema tireoglobulinu (A-TG) i/ili tiroidnoj-peroksidazi (A-TPO). Inflamatorni proces usmeren ka štitnoj žlezdi rezultira u progresivnom uništavanju ćelija i pojavom fibroze, čime se u velikoj meri gubi funkcija štitne žlezde i smanjuje

lučenje hormona. Njihov nedostatak izaziva simptome suprotne hipertiroidizmu: malaksalost sa dugim periodima sna, usporen rad srca, opstipacija, usporen rast kose i mišićna slabost. Hipotiroidizam se leči terapijom tiroksinom [4].

Oboljenja štitne žlezde se mogu javiti i u obliku nodularnih uvećanja odnosno čvorova koji su radiološki različiti od okolnog parenhima. Nodusi štitne žlezde su uobičajeni i za oko 60% odrasle populacije se pretpostavlja da ima tiroidni nodus [8]. U SAD-u se smatra da do 65 godine života oko polovina populacije razvije jedan ili više tiroidnih nodusa [9]. Većina tiroidnih nodusa je benigna, međutim, kod oko 7-15% slučajeva tiroidnih nodusa razvijaju se maligne lezije [10]. Maligni tumori štitne žlezde su najčešće incidentalni, a postoji jedna grupa naslednih oblika [11, 12].

1.2. Tumori štitne žlezde

Tiroidni tumori se javljaju u obliku benignih ili malignih nodularnih uvećanja žlezde. Oni se razlikuju prema poreklu, tj. vrsti ćelija, kao i prema histološkoj građi. U ovom poglavlju biće dat pregled faktora rizika za nastanak tiroidnih tumora, njihove incidence, mortaliteta, kao i vrsta tiroidnih tumora.

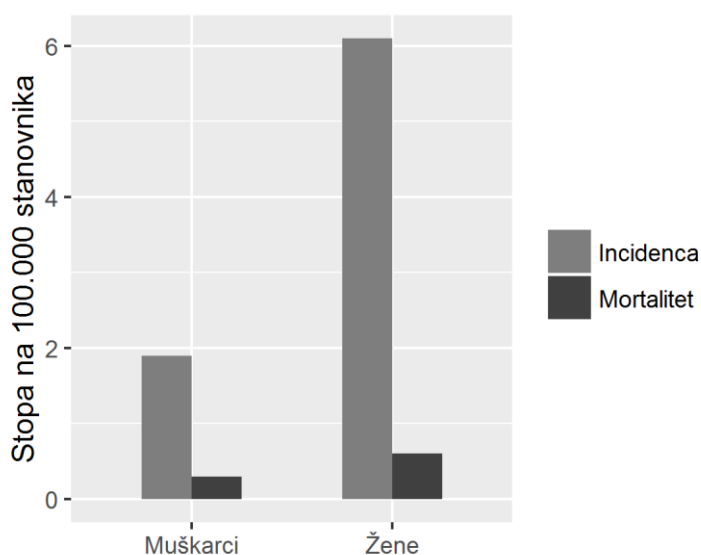
1.2.1. Faktori rizika za razvoj karcinoma štitne žlezde

Faktori rizika tiroidnog kancera uključuju godine, pol, izloženost jonizujućem zračenju, porodičnu istoriju bolesti i nedostatak joda u ishrani. Tiroidni kancer je redak kod dece, dok se sa godinama povećava rizik od obolevanja i od razvoja agresivnijeg tumora [13]; najčešće se tiroidni kancer javlja kod ljudi u petoj i šestoj deceniji života [14]. Incidenca kancera se razlikuje i prema polu - žene su u tri puta većem riziku da razviju neki od maligniteta tiroidne žlezde [15]. Kod ljudi koji su bili izloženi jonizujućem zračenju postoji veća šansa od razvoja kancera štitne žlezde zbog mutacija koje zračenje može da izazove [16]. Neke studije povezuju autoimuni tiroiditis i hronični limfocitni tiroiditis sa razvojem papilarnog tiroidnog karcinoma [17]. Postoji i nasledna predispozicija za tiroidni kancer. Medularni tiroidni karcinom (MTC) se u oko 25% slučajeva javlja u naslednim formama i u njegovoj osnovi stoji mutacija u *RET* proto-onkogenu [18]. Pored MTC, u oko 5% slučajeva ostalih karcinoma tireoidee je ustanovljena nasledna predispozicija [19]. Na

razvoj kancera može uticati i količina joda u ishrani. U regijama u kojima nema dovoljno namirnica bogatih jodom, ili u kojima se ne jodira so, česta je pojava uvećanja štitne žlezde, pošto se zbog nedovoljne proizvodnje tiroidnih hormona povećava sinteza TSH koji stimuliše proliferaciju tireoidee [20].

1.2.2. Incidenca i mortalitet karcinoma štitne žlezde

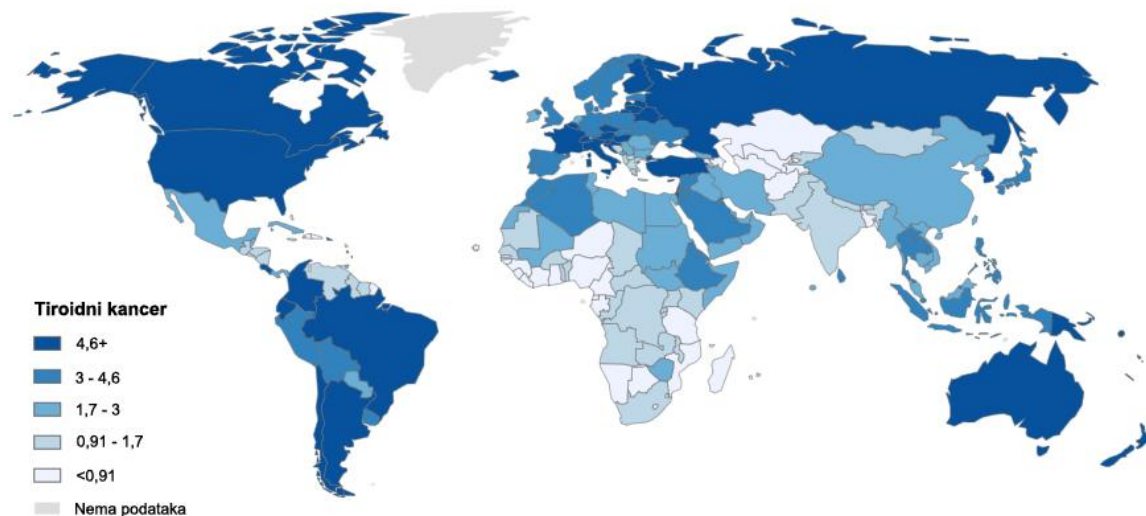
Tiroidni kancer je najčešći endokrini tumor [21] koji čini 2,1% svih karcinoma u svetu [14]. Incidenca tiroidnog karcinoma se u poslednjih trideset godina uvećava u skoro svim regijama sveta. U SAD je tiroidni karcinom malignitet sa najbržim rastom broja obolelih [22, 23]. U 2012. godini je 230.000 žena i 70.000 muškaraca obolelo od karcinoma štitne žlezde u svetu, odnosno incidenca za žene standardizovana prema godinama je iznosila 6,1 slučaj na 100.000 stanovnika, a za muškarce 1,9 slučajeva na 100.000 stanovnika (**Grafik 1**) [24].



Grafik 1. Incidenca i mortalitet karcinoma štitne žlezde u svetu kod muškaraca i žena. Izvor: [24].

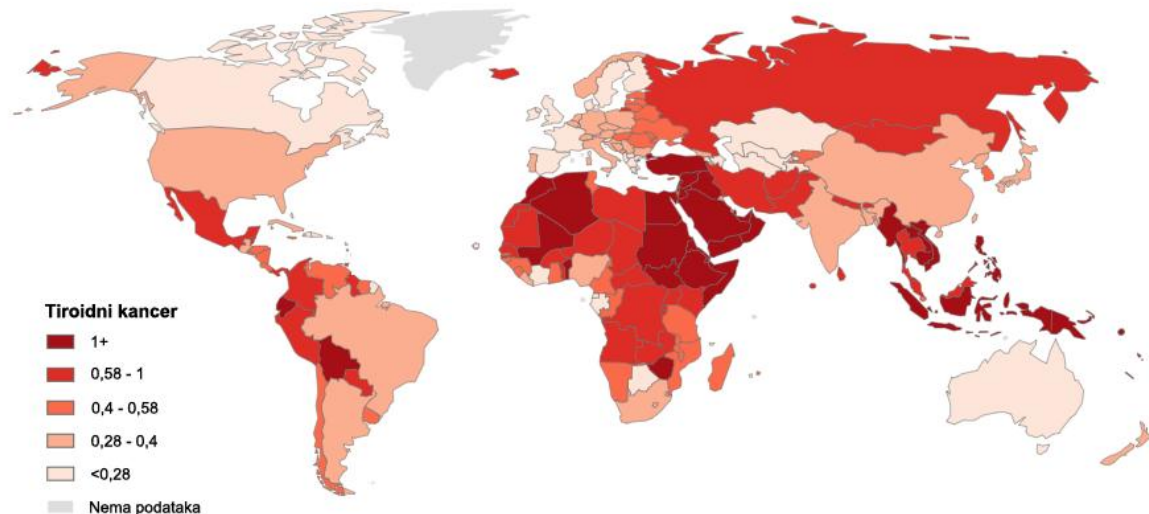
Prema GLOBOCAN podacima iz 2012. godine, incidenca se najviše povećava u razvijenim zemljama gde je veća dostupnost medicinskoj nezi (**Slika 4**). Porast je zabeležen najviše u Severnoj Americi i Australiji, zatim i u zemljama Zapadne i Centralne Evrope i

Južne Amerike, dok na afričkom kontinentu incidenca nije u porastu [25]. U Saudijskoj Arabiji tiroidni kancer je drugi najčešći karcinom kod žena [26]. Ako se porast broja obolelih nastavi ovim tempom i u sledećim decenijama, tiroidni kancer će zameniti kolorektalni kancer na mestu četvrtog najčešćeg malignog oboljenja u SAD-u do 2030. godine, odmah iza karcinoma dojke, prostate i pluća [27].



Slika 4. Incidenca tiroidnog karcinoma. Izvor: [14].

Suprotno tome, mortalitet kod tiroidnog karcinoma ne raste istom brzinom, a u nekim delovima i opada (**Slika 5**). Globalno, procenjeno je da je 2012. godine karcinom štitne žlezde doveo do smrtnog ishoda kod žena u oko 27.000 slučajeva, a kod muškaraca u oko 13.000 slučajeva, što znači da je mortalitet bio 0,6 na 100.000 žena i 0,3 na 100.000 muškaraca, što je predstavljeno na **Grafiku 1** [24]. Ako se preklope slike regija sa incidencom i mortalitetom tiroidnog kancera na svetu, vidi se da je mortalitet niži u zemljama sa većom incidencom, kao i da su to uglavnom socio-ekonomski razvijenije zemlje. Pretpostavlja se da je za ovo odgovorna povećana svest o riziku od kancera, dostupnost preoperativnih dijagnostičkih metoda i detekcija kancera u ranijim stadijumima kada terapija daje bolje rezultate [28].

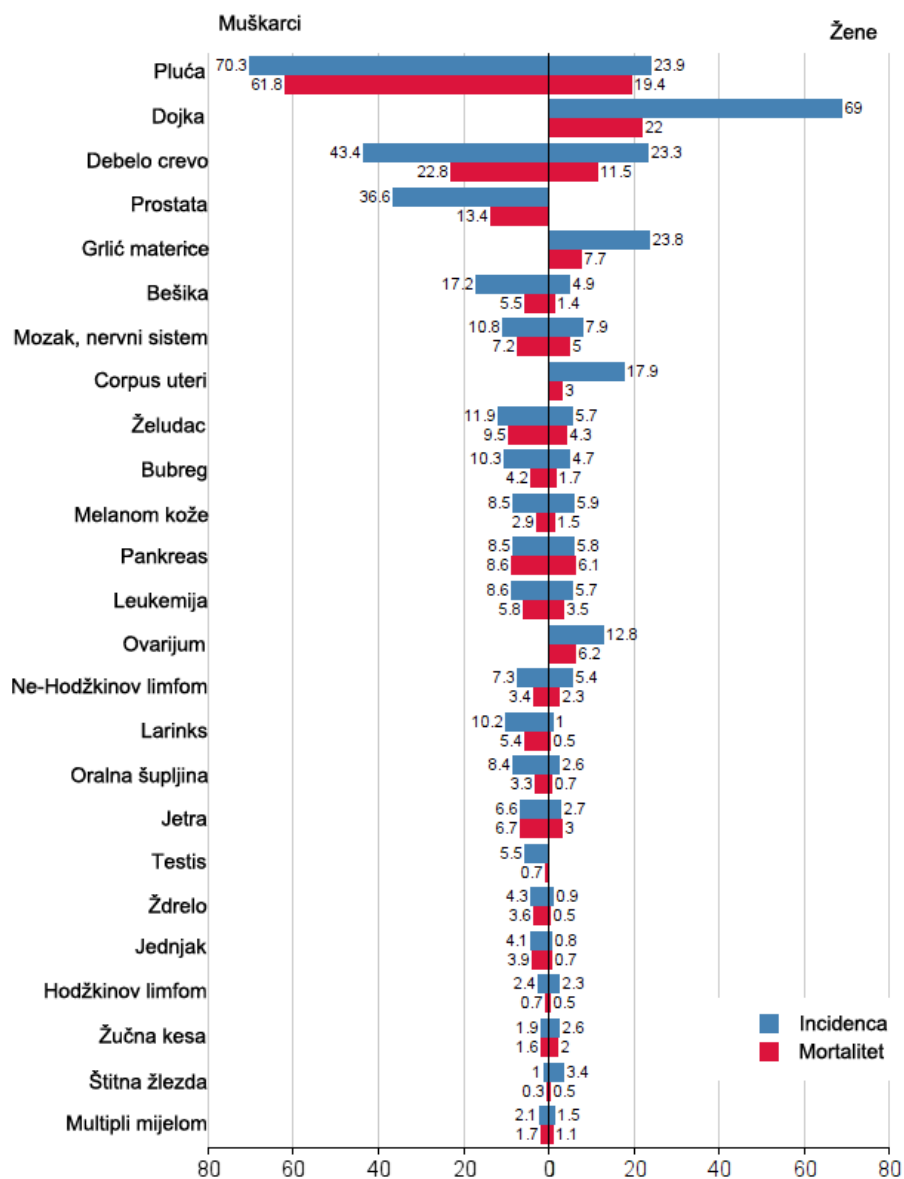


Slika 5. Mortalitet tiroidnog karcinoma. Izvor [14].

Smatra se i da porast broja karcinoma štitne žlezde potiče, barem u polovini slučajeva, od pojave nazvane *overdiagnosis* (prekomerna dijagnostika) [29]. Naime, čest ultrazvučni skrining stanovništva i uvođenje biopsije tankom iglom, kao lako dostupne dijagnostičke metode, su omogućili detekciju malih, asimptomatskih karcinoma, koji bi u suprotnom ostali neprimjećeni zbog svoje neagresivne prirode [30]. Iako je zabeležen porast lezija svih veličina, najveći broj novodijagnostikovanih slučajeva spada u kategoriju lezija do 2 cm, i to papilarnog histološkog tipa [31]. Ove lezije su uglavnom indolentne, sporo rastu i najverovatnije ne bi izazvale nikakve simptome i bez terapije. Prema jednoj studiji iz Japana samo 6% mikrokarcinoma koji nisu operisani je poraslo više od 2 mm za 5 godina [32].

Međutim, ovo samo donekle objašnjava povećanje incidence tiroidnog kancera, s obzirom da je zabeležen i porast malignih lezija većeg obima (>4 cm) [30]. Pretpostavlja se da kancerogene materije iz okoline, kao i jonizujuće zračenje, imaju uticaj na veći broj obolelih od kancera tiroidee [33], čemu u prilog govori i povećanje lezija pozitivnih na *BRAF* V600E mutaciju [34].

U Srbiji je tiroidni kancer mnogo ređi u poređenju sa drugim karcinomima - prema GLOBOCAN podacima, nalazi se na 24. mestu po učestalosti (**Slika 6**).



Slika 6. Učestalost malignih oboljenja u Srbiji. Izvor: [14].

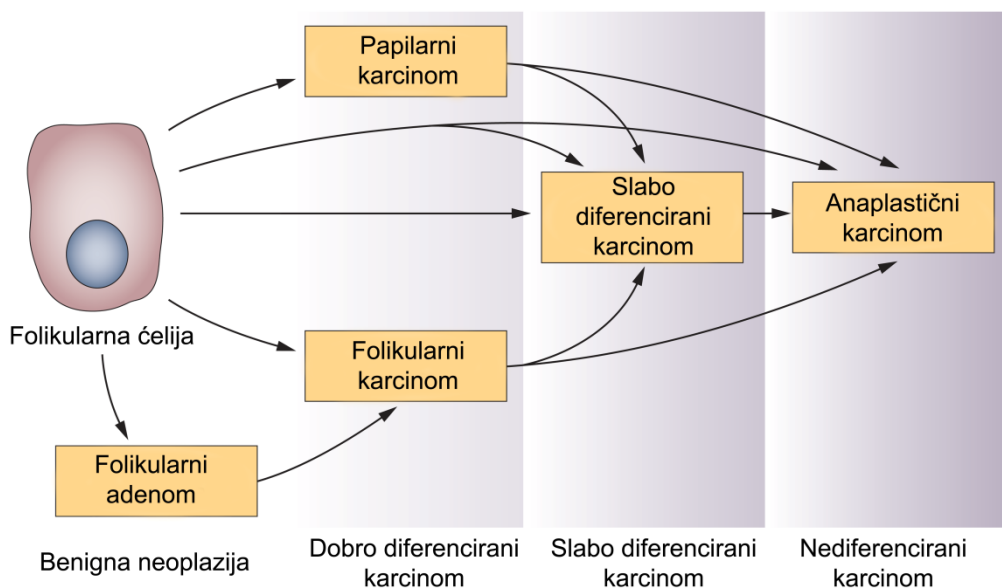
Incidenca za period od 1999. – 2008. je iznosila 3,2 na 100.000 stanovnika za žene i 1 na 100.000 za muškarce. Međutim, kada se prema starosnim grupama izračuna porast izražen kao godišnja promena udela bolesnih (*average annual percent change – AAPC*),

oko 25% novih slučajeva je dijagnostikovano u ovom periodu kod žena starosne dobi od 20-29 godina, a kod muškaraca je u starosnoj dobi od 30-39 povećan broj obolelih za oko 18%. Za oba pola u periodu 1999-2008 AAPC je iznosio +13%, što nesumnjivo pokazuje da i u Srbiji incidenca kancera štitne žlezde raste i da se u sledećim decenijama može očekivati značajan porast obolelih od ove bolesti [35].

1.2.3. Klasifikacija tumora štitne žlezde

Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO) epitelni tumori štitne žlezde se prema poreklu dele na tumore nastale od folikularnih ćelija i tumore nastale od parafolikularnih ćelija, sa pojedinim retkim vrstama koje pokazuju diferencijaciju poreklom od obe vrste ćelija [36].

Neoplazme sa folikularnom ćelijskom diferencijacijom mogu biti benigne i maligne (Slika 7).



Slika 7. Klasifikacija tumora štitne žlezde. Adaptirano iz [37].

Benigni tumori se nazivaju folikularnim adenomima, dok su dobro diferencirani maligni tumori (DTC) podeljeni u dve glavne kategorije – folikularni i papilarni. Jedan broj folikularnih karcinoma može nastati malignom diferencijacijom folikularnih adenoma, dok se drugi razvijaju bez ovog premalignog stanja. Slabo diferencirani karcinomi se mogu

razviti *de novo*, ali i dediferencijacijom dobro diferenciranih karcinoma. U poslednji stadijum su svrstani tumori koji nemaju nikakvu vidljivu diferencijaciju - nediferencirani odnosno anaplastični tumori [37].

Folikularni tiroidni adenom (FTA) je benigni tumor štitne žlezde koji se javlja kod 3 – 4,3% odraslog stanovništva i često se otkrije tek na autopsiji [38]. Histološki se u ovim tumorima nalaze folikuli približno iste veličine, sa malom količinom koloida. Oko tumora se nalazi jasna kapsula, a sa njene spoljašnje strane dobro očuvano tkivo žlezde, što su ujedno dva kriterijuma koja razlikuju ove benigne lezije od malignih tumora [2]. Ukoliko se na citološkom pregledu ustanovi da je lezija benigna, tretman za ove pacijente je tiroidna lobektomija, odnosno uklanjanje lobusa u kojem se nalazi nodus [39].

Papilarni tiroidni karcinom (PTC) je dobro diferencirani maligni tumor, koji je i najčešći maligni tumor štitne žlezde, javlja se u oko 80% slučajeva tiroidnog karcinoma [40]. Karakteriše se uvećanim, svetlim (hipohromnim) jedrima, koja se često preklapaju, nepravilnog su oblika i imaju unutar-jedarne zavoje [41]. Prisustvo ovakvih jedara je ključno za potvrdu dijagnoze PTC. Papilarni karcinom se javlja u nekoliko različitih histoloških varijanti, od kojih su najčešće klasična i folikularna varijanta. Klasična varijanta PTC ima karakteristične morfološke strukture u obliku papila, odnosno resica, koje se sastoje od fibrovaskularne strome okružene folikularnim ćelijama sa krupnim, hipohromnim jedrima. Folikularna varijanta PTC ima jasno folikularan rast, ali je prisustvo jedra sa karakterističnim osobinama papilarnog karcinoma svrstava u ovaj histotip [42]. Druge varijante PTC su ređe i obuhvataju *tall-cell* odnosno visokoćelijski podtip, solidni, difuzno-sklerozni, *Warthin like*, insularni i „kribriformni“ podtip PTC [43]. Papilarni karcinom se najčešće širi putem limfotoka, pa se javljaju metastaze u regionalnim limfnim čvorovima [4]. Papilarni karcinom ima dobru prognozu, leči se potpunim uklanjanjem štitne žlezde i terapijom radioaktivnim jodom. Procenat preživljavanja 10 godina nakon bolesti iznosi 90%, a kod mladih pacijenta dostiže i 98%. Prognoza je nešto lošija kod pacijenata starijih od 45 godina, sa prisutnim metastazama u limfnim čvorovima, većim obimom tumora i ređih histoloških varijanti [44].

Folikularni tiroidni karcinom (FTC) se ređe javlja (10-15%) i sastoji se od folikula različite veličine oivičenih dobro diferenciranim epitelnim ćelijama. Dijagnoza FTC se

postavlja nakon što se utvrdi prisustvo invazije kapsule ili vaskularne invazije i odsustvo karakterističnih osobina nukleusa tipičnih za PTC [45]. Folikularni karcinomi se šire putem krvotoka, a udaljene metastaze se javljaju u oko 20% slučajeva [44]. U morfološkom i prognostičkom smislu, folikularni karcinom se deli na minimalno invazivni i široko invazivni oblik [42]. Minimalno invazivni FTC se karakteriše invazijom tumorske kapsule ili vaskularnog endotela, dok je kod široko invazivnog podtipa prisutna invazija u velikom delu štitne žlezde i okolnom tkivu. Široko invazivni FTC metastazira na kosti, pluća, mozak i jetru [46]. Ishod bolesti kod pacijenata sa folikularnim karcinomom se razlikuje u zavisnosti od tipa – kod minimalno invazivnog FTC procenat preživljavanja nakon 5 godina iznosi 98%, dok je kod široko invazivnog taj procenat niži i iznosi 80% [47].

Tiroidne lezije se mogu javiti i u obliku onkocitnih (*Hürtle*) tumora – benignih *Hürtle* tiroidnih adenoma (HTA) i malignih *Hürtle* tiroidnih karcinoma (HTC). *Hürtle* karcinom se javlja u oko 3% karcinoma štitne žlezde [48]. Ove vrste tumora se prema WHO klasifikuju kao podvrsta folikularnih adenoma i karcinoma sa kojima dele osnovne histološke karakteristike (folikularni rast i kapsulacija). U pogledu drugih karakteristika, međutim, se razlikuju od njih – i benigni i maligni tumori imaju veliki broj mitohondrija u ćelijama, maligni ne reaguju na terapiju radioaktivnim jodom zbog čega imaju lošiju prognozu, često daju limfogene metastaze [49] i imaju različitu molekularnu osnovu [50, 51]. Zbog ovoga ga mnogi patolozi odvajaju i smatraju posebnom vrstom karcinoma [52]. *Hürtle* karcinom se od adenoma razlikuje samo po prisustvu vaskularne i/ili kapsularne invazije [53]. Do skoro je prognoza HTC bila lošija od prognoze FTC, međutim poslednjih decenija je zabeleženo poboljšanje u pogledu preživljavanja i u SAD trenutno je izjednačena sa procentom preživljavanja preko 5 godina kod FTC i iznosi blizu 90% [54].

Anaplastični karcinom (ATC) čini oko 1-2 % primarnih karcinoma tiroidee i najagresivniji je oblik karcinoma štitne žlezde. Javlja se kod starijih osoba [55] i karakterišu ga velike, nepravilne maligne ćelije sa džinovskim jedrima. Tumor brzo raste i infiltrira se u strukture vrata zahvatajući i limfne i krvne sudove, stoga metastazira i limfno i hematogeno. Udaljene metastaze se javljaju u plućima i jetri [56]. Anaplastični tiroidni karcinom u 100% slučajeva ima fatalan ishod – po dobijanju dijagnoze ATC, polovina

pacijenata ne preživi duže od 6 meseci, a procenat petogodišnjeg preživljavanja je samo 9% od ukupnog broja dijagnostikovanih slučajeva [57].

Medularni karcinom (MTC) je tiroidni karcinom poreklom od parafolikulskih, C ćelija. Ova vrsta karcinoma je retka; oko 5% slučajeva tiroidnog karcinoma čini MTC. Između 70 i 80% MTC su sporadični, dok oko 20-30% slučajeva MTC predstavljaju familijarne, odnosno nasledne oblike [58]. Medularni karcinom ima solidnu, insularnu ili trabekularnu arhitekturu, vretenaste, poligonalne ili okrugle ćelije i depozite amiloida u stromi [59]. Za ovaj tip karcinoma su karakteristični visoki nivoi kalcitonina u serumu. Nasledni oblik MTC nastaje autozomnim dominantnim nasleđivanjem mutacije u *RET* proto-onkogenu na hromozomu 10q11.2, i testiranje na ove genetičke alteracije se koristi kao skrining metod za nasledne oblike [60]. MTC se javlja sam ili u sklopu sindroma Multiple endokrine neoplazije tipa IIA ili IIB koju pored MTC karakteriše i prisustvo karcinoma srži nadbubrežnih žlezda - feohromocitoma [57]. MTC spada u dobro diferencirane karcinome, ali ima lošiju prognozu u odnosu na ostale maligne tumore tiroidee. Procenat prezivljavanja pet godina nakon lečenja za medularni karcinom iznosi 75% [61].

1.2.4. Dijagnostika karcinoma štitne žlezde

Dijagnostičke metode koje se primenjuju u tiroidnoj onkologiji dele se na preoperativne (ultrazvučni pregled i biopsija tankom iglom) i postoperativne (patohistološka analiza uklonjenih lezija).

Prisustvo nodusa štitne žlezde se potvrđuje ultrazvukom, nakon čega se, u zavisnosti od ultrazvučnog nalaza, primenjuje i biopsija nodusa u cilju postavljanja definitivne dijagnoze. Metoda biopsije tankom iglom (engl. *Fine Needle Aspiration Biopsy* - FNAB) je uvedena u redovnu kliničku praksu osamdesetih godina 20. veka i od tada se značajno umanjio broj pacijenata koji se šalju na operaciju radi dijagnostike [62].

Prilikom FNA biopsije se koristi tanka igla promera 0,5 mm kojom se aspirira tkivo iz sumnjivog nodusa i prebacuje na mikroskopske pločice u vidu razmaza. Citološkom analizom razmaza bojenih hematoksilinom i eozinom se određuje dijagnoza lezije. Na konferenciji pod nazivom *Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference*

u organizaciji američkog Nacionalnog Instituta za Kancer (NCI) održanoj u Betesdi (SAD), 2007. godine, definisana je jedinstvena terminologija i određeni su morfološki kriterijumi za citološku dijagnostiku tiroidnih nodusa, nazvani Betesda sistem za ocenjivanje u tiroidnoj citopatologiji [63]. Ova klasifikacija obuhvata šest dijagnostičkih kategorija datih u **Tabeli 1.**

Tabela 1. Betesda sistem za ocenjivanje u tiroidnoj citopatologiji. Adaptirano iz [63].

Dijagnostičke kategorije	
I	Nedijagnostički ili nezadovoljavajući nalaz
II	Benigni nalaz
III	Atipija neodređenog značaja ili folikularna lezija neodređenog značaja (engl. <i>Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance - AUS/FLUS</i>)
IV	Folikularna neoplazma ili sumnja na folikularnu neoplazmu (engl. <i>Follicular Neoplasm or Suspicious for a Follicular Neoplasm – FN/SFN</i>)
V	Sumnja na malignitet (engl. <i>Suspicious for Malignancy – SUSP</i>)
VI	Maligni nalaz

Prva kategorija obuhvata uzorke nezadovoljavajućeg kvaliteta, kod kojih dijagnoza ne može biti postavljena, pošto u aspiratu nisu prisutne ćelije. Razlog tome može biti loše uzorkovanje, ali i cistična lezija kod koje je koloid obilan i stoga je prinos ćelija na razmazu mali.

U drugu kategoriju spadaju benigni nodusi, folikularnog ili *Hürtle* histotipa. Za oko 2% pacijenata u ovoj kategoriji se na krajnjoj postoperativnoj dijagnozi ispostavi da su imali maligni tumor [64].

Treća kategorija prema Betesda sistemu su lezije definisane kao atipija neodređenog značaja ili folikularna lezija neodređenog značaja (engl. *Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance - AUS/FLUS*). Rizik od

kancera u ovoj kategoriji je u vreme formiranja Betesda klasifikacije iznosio 5-10%, međutim velike studije sa FNAB uzorcima su pokazale rizik od kancera od 7-48% [62].

Četvrtu kategoriju predstavljaju folikularne neoplazme ili sumnja na folikularne neoplazme (engl. *Follicular Neoplasm or Suspicious for a Follicular Neoplasm* – FN/SFN), gde je rizik od kancera od 20-30% [65].

U petu kategoriju spadaju lezije sumnjive na malignitet (engl. *Suspicious for Malignancy* – SUSP), sa velikim rizikom od kancera, koji iznosi 60-75% [66].

Šesta kategorija prema Betesda sistemu predstavlja maligne lezije kod kojih je potvrđeno prisustvo citoloških karakteristika maligniteta. U 99% slučajeva ove citološke dijagnoze se nakon operacije potvrdi malignitet [67].

Treća, četvrta i peta kategorija zajedno obuhvataju grupu neodređenih nodusa u koji se svrstava približno 15-30% FNAB dijagnoza. Pacijenti sa ovim dijagnozama se podvrgavaju operaciji i dve trećine pacijenata posle operacije ima dijagnozu benignog tumora [68].

Zlatni standard u dijagnostici kancera štitne žlezde predstavlja patohistološki pregled tkiva. Problemi u postoperativnoj dijagnostici se javljaju kod lezija folikularnog porekla koje se ne razlikuju jasno, jer im se morfološke karakteristike preklapaju. Kriterijumi koji razdvajaju benigne od malignih tumora u postoperativnoj dijagnostici nisu jasno definisani. Ovo se odnosi pre svega na lezije folikularne arhitekture – folikularne adenome, folikularne karcinome i folikularnu varijantu papilarnog karcinoma [69].

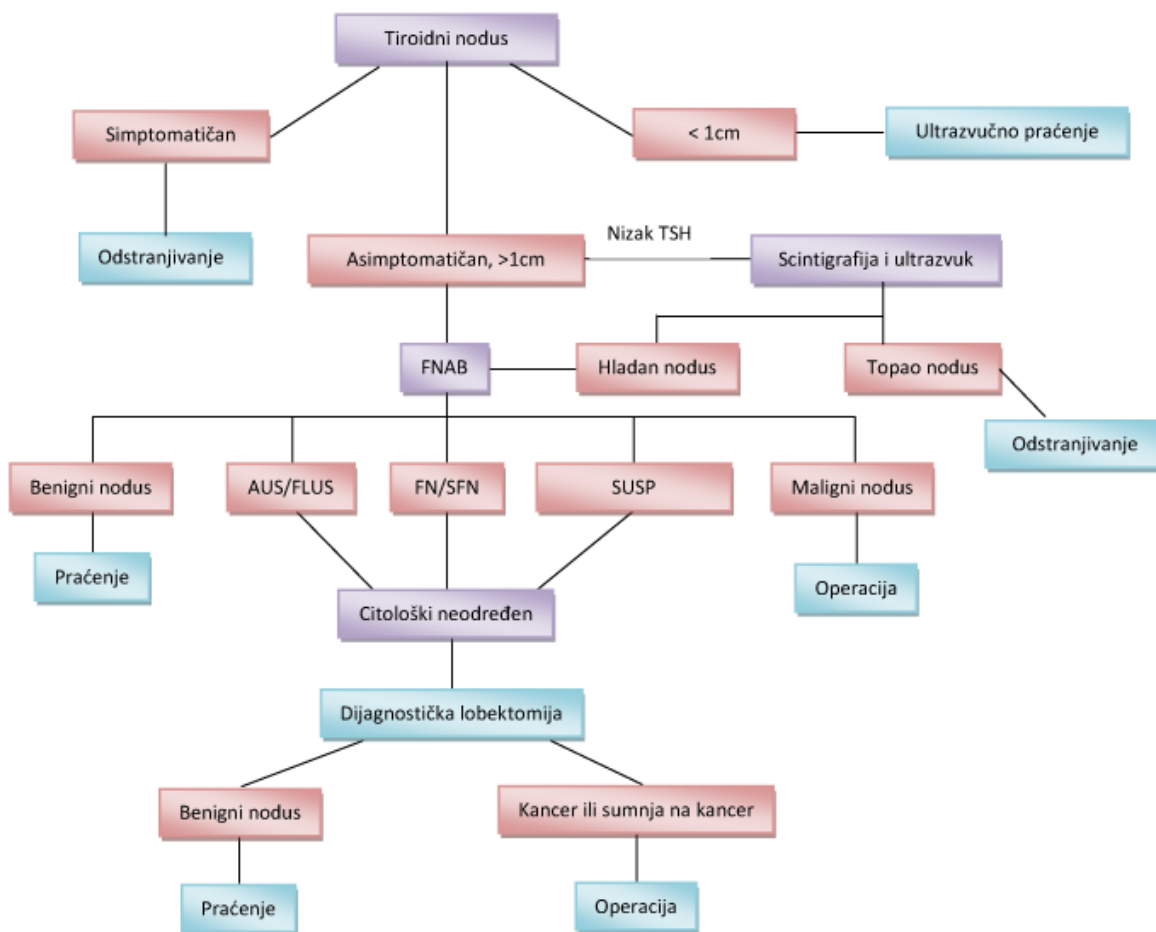
Razlikovanje folikularnog adenoma od folikularnog karcinoma je neophodno za prognozu daljeg toka bolesti. Suštinski, jedini kriterijum koji razlikuje folikularne karcinome od adenoma je invazija kancerskih ćelija kroz tumorsku kapsulu, kao i invazija u krvne sudove, što je znak metastatskog karaktera tumora. Da bi se utvrdilo da je lezija folikularni karcinom, više rezova se pregleda u cilju pronalaženja invazije tumorske kapsule i određivanja stepena invazije [70].

Papilarni karcinom je najčešći oblik maligniteta tiroidee i dijagnoza PTC se potvrđuje prisustvom hipohromnih i uvećanih jedara. Klasični papilarni karcinom je najlakše razlikovati zbog karakteristične histološke strukture u obliku resica. Međutim, podvrsta PTC fv (folikularna varijanta PTC) je građena od folikula koji su oivičeni

ćelijama, čime podseća na folikularne adenome i karcinome. Ono što ga svrstava u grupu papilarnih karcinoma je karakterističan izgled jedara i način širenja. Za razliku od folikularnog karcinoma, gde se ovaj histotip do skoro svrstavao, PTC fv se ne širi hematogeno, već limfogeno, pa je velika verovatnoća da će metastazirati u okolne limfne čvorove, i imati karakter poput PTC (dugo vreme preživljavanja, bez povratka bolesti i retke udaljene metastaze) [70]. Upravo zbog ovog manje agresivnog karaktera važno je razlikovati PTC fv od FTC, međutim to je u mnogim slučajevima otežano, jer se jedra sa karakteristikama PTC javljaju nekad u fokusima, umesto difuzno, dok je morfologija veoma slična FTC tipu [69].

Postavljanje dijagnoze karcinoma štitne žlezde se zavisno od slučaja radi pre ili postoperativno. Na šemi adaptiranoj iz [71] i [72] predstavljeni su koraci u odlučivanju o tretmanu i operaciji pacijenta (**Slika 8**).

Tiroidni nodusi koji izazivaju simptome (pritisak usled dijametra tumora, smetnje pri gutanju, nizak TSH) uklanjaju se hirurški ili odstranjuju radioaktivnim jodom. U slučaju asimptomatskih nodusa koji su manji od 1 cm, primenjuje se ultrazvučno praćenje jednom godišnje ili češće, a ukoliko dođe do nekih promena, šalju se na FNAB. Biopsija malih nodusa se savetuje i ukoliko postoje drugi faktori rizika poput porodične istorije, izlaganja zračenju, ili zabrinjavajućih sonografskih karakteristika. Suprotno tome, nodusi većeg obima se odmah šalju na FNAB i pregledom citoloških razmaza se određuje da li je lezija benigna, maligna ili neodređena. U slučaju benigne lezije, ukoliko ne postoje druge indikacije za operaciju, prepisuje se ultrazvučno praćenje lezije tokom nekoliko meseci, dok se maligne lezije uklanjaju operacijom (totalnom tiroidektomijom). Nodusi iz grupe neodređenih lezija se takođe tretiraju hirurški, parcijalnom ili totalnom tiroidektomijom.



Slika 8. Šema algoritma za klinički tretman pacijenata sa tiroidnim nodusima. Adaptirano iz [71] i [72].

FNA biopsija (FNAB) je omogućila da se dijagnoza postavi bez velikog rizika za pacijente, pošto se FNAB izvodi ambulantno i bez totalne anestezije, zbog čega je proceduru lako ponoviti u slučaju neuspešnog rezultata. Iako su troškovi laboratorijskih testova na biomarkere relativno niski, FNA biopsijom se dobija ograničena količina materijala što smanjuje broj biomarkera koji se mogu odrediti. U približno 20% slučajeva FNAB procedura se ne izvede uspešno, a za oko 30% se ne može odrediti tačna dijagnoza, te se i pored FNA biopsije, pacijent mora operisati. Suprotno tome, postavljanje dijagnoze patohistološkim pregledom postoperativno dobijenog tkiva je znatno preciznije. Značajno veća količina materijala dobijena nakon operacije daje prostora i za analiziranje velikog

broja biomarkera. Nedostatak postoperativne dijagnostike leži u činjenici da su operativni zahvati rizični i nose značajno veće troškove od biopsije, a kod pacijenata kod kojih se ispostavi da je lezija benigna, su nepotrebni.

U cilju rešavanja nedoumica koje se javljaju prilikom izbora tretmana lezija neodređenog malignog potencijala i diferencijalne postoperativne dijagnostike tumora tiroidee koriste se različiti biomarkeri (proteinski i genetički). Do sada se ipak nijedan marker, ili kombinacija markera, nije pokazala kao dovoljno pouzdana za razlikovanje benignih i malignih, odnosno histološki sličnih lezija, ali postoji određeni broj pomoćnih markera koji će biti detaljnije opisani u sledećem poglavlju.

1.3. Biomarkeri karcinoma štitne žlezde

U postavljanju dijagnoze karcinoma štitne žlezde mogu pomoći markeri koji se određuju u serumu, ili u uzorcima tkiva dobijenih punkcijom ili nakon operacije. Tumor markeri se mogu određivati u serumu, u FNAB uzorcima, ili u tkivu dobijenom posle operacije. Po sastavu, biomarkeri mogu biti organski molekuli, peptidi, proteini, ili nukleinske kiseline. U **Tabeli 2** su nabrojane metode koje se koriste za određivanje biomarkera.

Tabela 2. Klasifikacija biomarkera karcinoma štitne žlezde.

Vrsta uzorka	Metoda
Mali organski molekuli, polipeptidi, proteini	Imunoeseji (RIA, IRMA, ELISA), Imunohemijske metode (IHC, ICC, IF)
DNK	Konvencionalni PCR, sekvenciranje, <i>Microarray</i>
RNK	<i>Real time</i> PCR, <i>RNAseq</i>

1.3.1. Serumski biomarkeri

Serumski biomarkeri su prva generacija markera u dijagnostici tumora tiroidee. Koriste se u dijagnostici karcinoma tiroidee, ili za praćenje pacijenta nakon operacije. **Kalcitonin** je marker medularnog karcinoma tiroidee koji se određuje

imunoradiometrijskim testovima (IRMA). Ovaj marker je prilično pouzdan, jer su slučajevi medularnog karcinoma bez povišenog kalcitonina veoma retki [49]. **Tiroglobulin** (Tg) je marker za praćenje oporavka nakon operacije dobro diferenciranog karcinoma folikularnih ćelija. Koncentracija Tg se određuje nakon potpunog odstranjivanja žlezde i ablacije radioaktivnim jodom. Ukoliko se Tg ne detektuje u serumu, sa velikom pouzdanošću se može smatrati da bolest nije više prisutna [73]. Eseji za detekciju Tg-a su uglavnom bazirani na radioimunometrijskim metodama (RIA) [74]. **Tirostimulirajući hormon** bi u budućnosti mogao imati kliničku primenu u dijagnostici tiroidnog karcinoma. TSH je važan faktor koji utiče na rast ćelija štitne žlezde. Njegovom supresijom kod pacijenata visokog rizika se smanjuje mortalitet [75]. Primećeno je da se sa povećanjem nivoa TSH u serumu povećava rizik od maligniteta u tiroidnim nodusima [76]. Analizom studija koje su se bavile merenjem koncentracija TSH u serumu pacijenata sa karcinomom tiroidee, utvrđena je pozitivna povezanost između dijagnoze karcinoma i nivoa serumskog TSH [77]. Nivoi TSH u serumu se određuju imunoesejem (imunoradiometrijskim, imunofluorimetrijskim, imunochemiluminimetrijskim ili imunoenzimskim esejem).

1.3.2. Proteinski biomarkeri

U praksi se koriste različita antitela koja detektuju proteinske markere u tkivu štitaste žlezde uključene u ćelijsku adheziju (E-kaderin, galektin-3, fibronektin), ćelijski ciklus (ciklin D1, p27), transkripciju gena (TTF-1), sintezu i sekreciju hormona tiroidee (TPO, Tg), strukturu ćelije (CK19). Među njima su najbolje ispitani i ujedno najčešći u kliničkoj upotrebi galektin-3, citokeratin-19 (CK19) i *Hector Batiffora Mesotelial Antigen-1* (HBME-1). Određivanje ekspresije ovih markera se vrši imunohistohemijski.

HBME-1 je monoklonsko antitelo razvijeno prema površini mezotelnih ćelija u mezoteliomu (kanceru mezotelnih ćelija). Ono se vezuje za još uvek nepoznati antigen na ovim ćelijama, ali i na ćelijama adenokarcinoma i sarkoma [78, 79]. HBME-1 pokazuje imunopozitivnost u citoplazmi ili membrani tirocita karcinoma štitne žlezde i pokazao se kao marker koji ima visoku specifičnost [80]. Sa druge strane, zbog niske osetljivosti, u slučaju imunonegativnosti na HBME-1 ne može se isključiti malignitet.

Galektin-3 je član galektinske porodice lektina koji pripadaju visoko konzerviranoj porodici lektina sa karakterističnim domenom (engl. *Carbohydrate Recognition Domain* - CRD), odgovornim za vezivanje β -galaktozida [81]. Galektin-3 po svojoj strukturi spada u himerične galektine, jer na C-terminusu sadrži CRD domen, dok na N-terminusu ima poseban nelektinski domen kojim formira oligomere galektina-3 [82]. Galektin-3 monomer ima molekularnu masu od 31kDa. Kod tumora štitne žlezde je pokazano da se galektin-3 boji i u benignim slučajevima, međutim kod maligniteta tiroidee pokazuje intenzivno difuzno bojenje [83].

Citokeratin-19 (CK19) pripada citokeratinima – najvećoj grupi intermedijernih filamenata, komponenta citoskeleta eukariotskih epitelnih ćelija [84]. Ovaj protein spada u tip I citokeratina (kiseli citokeratini) i eksprimira se u jednoslojnom epitelu; pored citokeratina-8 i -18 jedan je od najčešćih citokeratina [85]. CK19 je efikasan u razlikovanju papilarnog od folikularnog karcinoma, jer se u FTC uglavnom ne boji, ili pokazuje fokalnu pozitivnost, ali izostanak pozitivnosti na CK19 ne isključuje malignitet [86].

Iako navedeni markeri potkrepljuju dijagnozu klasične varijante PTC, nijedan od njih ne pomaže u razlikovanju histoloških podtipova. Međutim, kada se upotrebe u kombinaciji (galektin-3 + HBME-1; HBME-1 + CK19; galektin-3 + HBME-1 + CK19), potvrđeno je da se poboljšava osetljivost i specifičnost za detekciju kancera, u uzorcima tkiva, i u FNA punktatima [87]. Kombinacija pozitivnog fibronektina-1, sa pozitivnim galektinom-3 ili HBME-1 prepoznaje karcinome, dok izostanak bojenja na ove markere ukazuje na benignu leziju [88].

Glavni nedostatak proteinskih markera je to što su imunohistohemijske metode semikvantitativne i ocenjivanje bojenja je subjektivno, što dovodi do različite osetljivosti i specifičnosti markera. Ukoliko se, pak, proteinski markeri kombinuju sa genetičkim markerima, može se postići veća dijagnostička tačnost.

1.3.3. Genetički biomarkeri

Mutacije i hromozomski rearanžmani

U malignim tumorima je na nivou DNK primećeno često prisustvo tačkastih mutacija i hromozomskih rearanžmana. Najučestalija mutacija je V600E transverzija

(zamena purinskih za pirimidinske baze i obrnuto) u genu za BRAF kinazu [89]. Mutacije u RAS genima koji kodiraju proteine iz Ras familije G-proteina, prenosiocce signala duž MAPK i PI3K/Akt puta [90], se u karcinomu tiroidee javljaju u tri gena - NRAS, KRAS, HRAS. Kod sva tri gena ove mutacije su lokalizovane u GTP-vezujućem domenu (kodoni 12/13) ili u GTP-aznom domenu (kodon 61) [91]. RAS mutacije su zastupljene u kancerima sa folikularnom strukturom (FTC, PTC fv), ali i u folikularnim adenomima [37].

U tiroidnim karcinomima su detektovani hromozomski rearanžmani koji se formiraju nakon prekida dvostrukog DNK lanca. Rearanžmani specifični za tiroideu su RET/PTC fuzije koje su dobile naziv po papilarnom tiroidnom karcinomu u kojem se javljaju. PAX8/PPAR γ fuzije, koje se formiraju između transkripcionog faktora PAX8 i PPAR γ gena koji je transkripcioni faktor uključen u metabolizam lipida [92], su česte u folikularnim karcinomima gde se javljaju sa frekvencijom od oko 30% [93].

Pored pomenutih mutacija i rearanžmana koji su najčešće genetske alteracije u tiroidnom kanceru, u određenoj meri su detektovane i mutacije u genima za TP53, CTNNB1, TERT, PI3KCA i PTEN, kao i rearanžmani NTRK1 i AKAP9/BRAF [37]. U malom procentu se javljaju EIF1AX mutacije [94, 95]. Kod medularnog karcinoma se javljaju mutacije u RET genu [96].

Prvi genetički panel u kliničkoj upotrebi je obuhvatao sedam čestih mutacija određivanih metodom *real-time* PCR-a: BRAF, NRAS, HRAS, KRAS, RET/PTC1, RET/PTC3 i PAX8/PPAR γ [97]. U velikoj studiji koja je evaluirala performanse ovog panela, obuhvaćeno je 1056 uzoraka FNAB prikupljenih u istom kliničkom centru [98]. Kod nodusa u kategoriji neodređenih, tj. AUS/FLUS, FN/SFN i SUSP najviše vrednosti su utvrđene za specifičnost (99%, 97%, 96%, redom), osetljivost nije prelazila 68%, dok su NPV i PPV varirale u zavisnosti od grupe. Zbog relativno niske osetljivosti, panel je proširen i promenjen je metod detekcije na sekvenciranje sledeće generacije (*Next Generation Sequencing* – NGS), te je panel dobio komercijalni naziv *ThyroSeq*. U *ThyroSeq* su dodati sledeći geni nosioci mutacija: AKT1, PTEN, TP53, TSHR, GNAS, CTNNB1, PI3KCA i TERT, kao i rearanžmani BRAF gena, NTRK, ALK i THADA. Ovaj panel je do sada pokazao obećavajuće rezultate za kliničku primenu [99, 100], ali je potrebna multicentrična studija koja bi potvrdila ove rezultate.

Pojedinačni genetički markeri su pokazali dobre rezultate u kliničkoj praksi. Mutacije na nivou DNK detektuju karcinome sa velikom specifičnošću, međutim oko 30% malignih lezija nema nijednu od gore navedenih mutacija, što snižava osetljivost DNK markera.

Ekspresija gena i mikro RNK

Različite studije su pokazale da je za dijagnostiku i prognostiku karcinoma tiroidee korisno paralelno pratiti ekspresiju različitih gena. Tako je na primer na osnovu nivoa ekspresije *ECM1*, *TMPRSS4*, *ANGPT2* i *TIMP1* gena moguće sa visokom tačnošću podeliti pacijente na visoko- i nisko-rizične [101]. Prasad i saradnici su pokazali da je ekspresija tri gena, *MRC2*, *HMGA2* i *SFN*, korisna u potvrdi dijagnoze tiroidnog kancera [102]. Jedan od najznačajnijih pomaka je načinjen u studiji koja je kao rezultat izdvojila 167 gena, na osnovu kojih je formiran test nazvan *Gene Expression Classifier* (GEC). GEC test za FNAB dijagnostiku kompanije *Veracyte* je razvijen merenjem preko 200.000 različitih transkripata, nakon čega su odabrani parametri koji su različito eksprimirani kod malignih i benignih uzoraka [103]. Konačno je od 200.000 gena, u *microarray* čip uključeno 167 gena i određen je algoritam za klasifikaciju uzoraka na maligne i benigne. Dobijena je visoka osetljivost (>93%) i negativna prediktivna vrednost (95%), dok je specifičnost dostigla 70%. Ovi dijagnostički parametri govore o tome da je test veoma dobar za odlučivanje da li je lezija benigna, s obzirom da daju lažno negativne rezultate u samo oko 5% slučajeva, što je okvirno i učestalost maligniteta u grupi benignih lezija ocenjenih citopatološkim pregledom FNAB razmaza. Pacijentima sa benignim rezultatom se, ukoliko nemaju drugih indikacija za operaciju, savetuje da se opredele za praćenje razvoja nodusa, dok se pacijentima sa sumnjivim nalazom savetuje operacija [104]. Nakon pregledanja svih urađenih studija o validaciji GEC testa u kliničkim uslovima, Američka tiroidna asocijacija navela je da se upotreba ovog testa izvodi samo uz detaljno obaveštavanje pacijenta o prednostima i nedostacima, jer je još uvek nedovoljan broj studija urađen da bi se sa sigurnošću moglo savetovati njegovo korišćenje [10].

Mikro RNK (miRNA) su mali molekuli koji se sastoje od oko 20-30 nukleotida i imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije [105]. Ovi biomolekuli su stabilniji od drugih RNK molekula, što olakšava njihovu izolaciju i kvantifikaciju [106]. S obzirom da je

primećeno da se nivoi miRNK menjaju u onkogenezi, ispitivan je potencijal mnogih pojedinačnih miRNK, kao i njihovih kombinacija za upotrebu u dijagnostičke svrhe. Kod tiroidnih karcinoma je nekoliko različitih panela miRNK molekula pokazalo dobre dijagnostičke parametre, i predloženi su za upotrebu u uzorcima FNA biopsija [107, 108], ili seruma pacijenata [109].

Panel mikro RNK je dospelo u komercijalnu primenu u okviru *ThyraMIR* testa kompanije *Interspace Diagnostics*. On se kombinuje sa ranije definisanim panelom koji prati mutacije na sedam gena [97], *ThyGenX*. Ovim je napravljen pomak ka kombinovanju markera koji detektuju promene na različitim ćelijskim nivoima - DNK (mutacije i hromozomski rearanžmani) i RNK (promena ekspresije miRNK). Namenjen je testiranju FNAB uzoraka; u prvom koraku se uzorci testiraju na panel od 7 mutacija i u slučaju negativnog rezultata, određuju se nivoi mikro RNK u okviru *ThyraMIR* panela (koji uključuje miR-29b-1-5p, miR-31-5p, miR-138-1-3p, miR-139-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375 i miR-551b-3p). Mikro RNK panel je dizajniran da ima visoku specifičnost, kako bi povećao osetljivost celokupnog testa [110]. Do sada je samo jedna studija evaluirala ovaj test na nodusima iz grupe AUS/FLUS i FN/SFN i određena je osetljivost 89%, specifičnost 85%, NPV 94% i PPV 74%. Visoka NPV ukazuje da bi se test mogao koristiti za isključivanje maligniteta, međutim kako NPV varira od prevalencije bolesti, ovaj test je pogodan za primenu samo u populacijama gde je prevalenca tiroidnog karcinoma oko 30% [111].

Merenje ekspresije više različitih gena pokazuje odlične rezultate u detektovanju benignih lezija, ali ne može da sa sigurnošću potvrdi malignitet. Upotreba mikroRNK je korisna za potvrdu maligniteta, ali je njihovo određivanje relativno skupo i još uvek nije sa sigurnošću određen panel miRNK koji treba koristiti.

U studiji koja je urađena u našoj laboratoriji kombinovani su markeri detektovani na različitim ćelijskim nivoima [112]. Dijagnostički panel je dizajniran da prati promene u ekspresiji proteina galektina-3, nivoje mikro RNK - 221 i 222 i prisustvo *BRAF* V600E mutacije. Time je dobijena kombinacija makera koja se detektuju na nivou proteina, RNK i DNK. Klasifikacija je bazirana na jednom od novijih algoritama za dizajn stabla

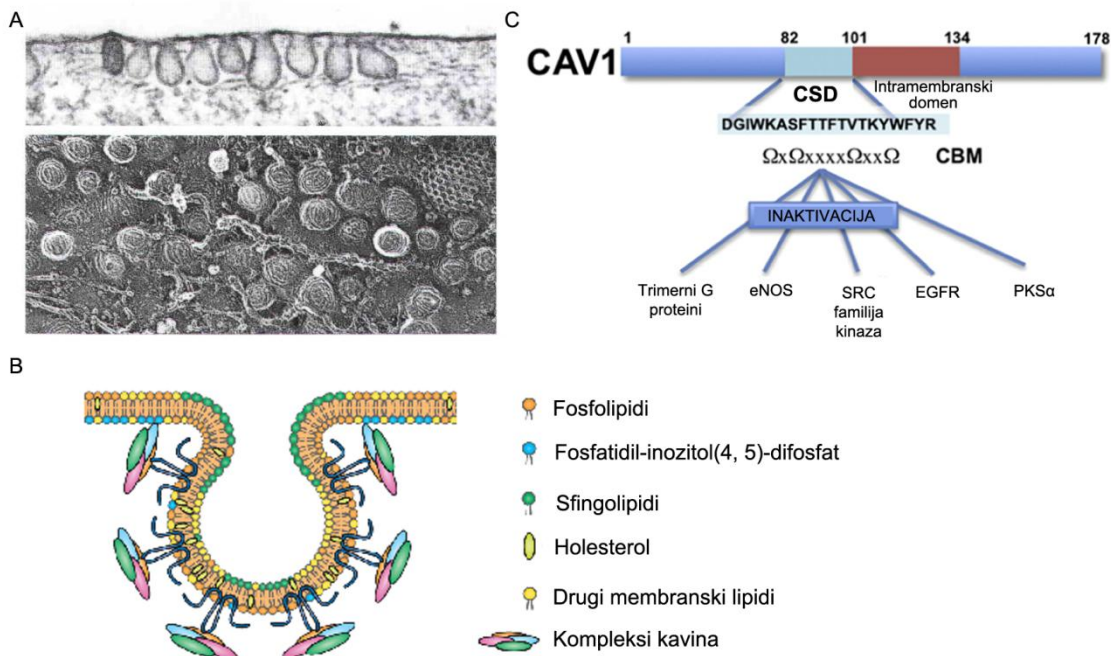
odlučivanja, C5,0 algoritma. U ovoj studiji test sa četiri markera je kod više od 50% pacijenata isključio malignitet.

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan dijagnostički i prognostički potencijal sledećih odabranih biomarkera: strukturnog proteina kaveolina-1, gena za EGF receptor, *BRAF* V600E tačkaste mutacije, *RET/PTC1* i 3 hromozomskih rearanžmana i EGFRvIII mutacije delecijom. U daljem tekstu je detaljnije opisana njihova struktura, uloga u onkogenezi i klinička primena.

1.3.4. Kaveolin-1

Struktura, lokalizacija i funkcija

Kaveolin-1 je mali protein mase 21-22 kDa, iz familije strukturnih proteina kaveolina, glavnih gradivnih jedinica membranskih invaginacija kaveola (**Slika 9A**). One se javljaju u okviru lipidnih raftova, membranskih mikrodomena koji predstavljaju rigidne delove ćelijske membrane bogate holesterolom i sfingolipidima i posebno su česte na endotelnim ćelijama, adipocitima, pneumocitima tipa 2, mišićnim ćelijama i fibroblastima [113] (**Slika 9B**). Zbog stabilnosti ovih struktura za njih su često pričvršćeni proteini koji igraju određenu ulogu na membrani, kao receptori, transporteri ili prenosiooci signala [114]. Kaveolin-1 ima nekoliko definisanih domena od kojih je najinteresantniji *Caveolin Scaffolding Domain* (CSD) preko kog on stupa u interakciju sa proteinima koji imaju *Caveolin Binding Domen* (CBD) [115]. Pretpostavka je da ovom interakcijom kaveolin-1 modulira njihovu aktivnost. Naime, stabilizacijom ovih molekula kaveolin-1 omogućava njihovo približavanje, a pretpostavlja se da vezivanjem drži neke molekule u neaktivnoj konformaciji (eNOS, β -katenin, EGFR) [116, 117] (**Slika 9C**).



Slika 9. A) Mikrografije kaveola na površini plazmine membrane fibroblasta, poprečni presek i gledano iz citosola (preuzeto iz [124]; **B)** Šema kaveole u okviru lipidnih raftova sa kaveolinom i kavinima koji je oblažu (adaptirano iz [117]; **C)** Prikaz sekvence *Caveolin Scaffolding Domen*-a (CSD) i konsenzus sekvence *Caveolin Binding Domen*-a (CBD) koji imaju prikazani proteini (adaptirano iz [125])

Uloga Kaveolina-1 u kanceru tiroidee

Rezultati više studija sugerišu da su nivoi ekspresije kaveolina-1 različiti u različitim histotipovima tumora štitne žlezde. Kod papilarnog karcinoma je ekspresija kaveolina-1 ista na nivou mRNK [118], ili povišena na proteinskom nivou [119, 120], u odnosu na normalno netumorsko tkivo. Kod folikularnog karcinoma, ekspresija je smanjena u poređenju sa normalnim, a time svakako i sa papilarnim karcinomom, što je pokazano na proteinskom [120], kao i na mRNK nivou [118, 121]. Ekspresija ovog proteina je ispitivana i u stromalnom odeljku, ali nije pronađena korelacija sa kliničko-patološkim faktorima [122]. Ipak, zbog razlike u ekspresiji između histotipova, kaveolin-1 bi mogao poslužiti kao marker u diferencijanoj dijagnostici - jedan je od pet gena čija ekspresija može da diskriminiše PTC od FTC [118], dok je zbog razlike u

imunohistohemijskom bojenju pogodan i za razlikovanje folikularne varijante papilarnog karcinoma i folikularnog karcinoma [120]. Zajedno sa galektinom-3, on je, kako tvrde *Shankar* i saradnici, dobar marker za dijagnozu diferenciranih tiroidnih karcinoma [123].

Povezanost kaveolina-1 i galektina-3 u invaziji i migraciji ćelijskih linija diferenciranog (DTC) i anaplastičnog karcinoma (ATC) je ispitivana u studiji koja je pokazala da na migraciju ćelija DTC utiče ekspresija i fosforilisanog kaveolina-1 i galektina-3, aktivacijom RhoA i stabilizacijom FAK (*focal adhesion kinase*) u fokalnim adhezijama [123]. Iz navedenog sledi da ekspresija galektina-3 menja tumor supresivna svojstva kaveolina-1, preobražavajući ga u tumor promotera. Predložena je i terapijska uloga ovog para, naime, kako im je ekspresija u lokalnim metastazama nepromenjena u poređenju sa primarnim tumorom, ciljano inhibišući galektin-3, mogla bi se opet promeniti uloga kaveolina-1 iz promoterske u supresorsku.

Kaveolin-1 kao dijagnostički marker

Kod karcinoma dojke je predloženo da se negativni stromalni kaveolin-1 upotrebi za izdvajanje visoko-rizičnih pacijenata sa ovim oboljenjem [126]. Kaveolin-1 bi mogao biti i marker lošije prognoze kancera dojke, jer je njegova niska ekspresija u stromi povezana sa lošijim kliničko-patološkim parametrima [127, 128]. P132L mutacija gena za kaveolin-1 je dovedena u vezu sa estrogenskim receptorom, pošto je nađena kod 35% pacijenata pozitivnih na ER α (receptor za estrogen), a pokazano je da kod ER- α /P132L pozitivnih postoji 82% šanse da se bolest vrati, čime je mutacija ušla u grupu potencijalnih prognostičkih markera [129].

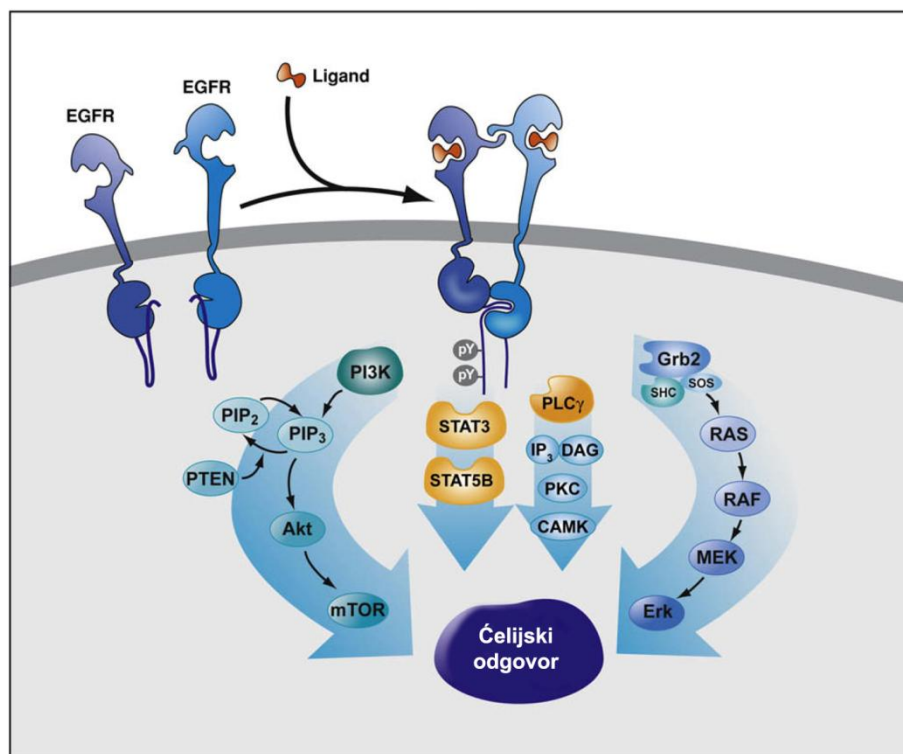
Kod ćelija kancera prostate je primećeno sekretovanje kaveolina-1, najverovatnije u okviru prostazoma – egzozoma poreklom od tumorskog epitela prostate [130]. Kaveolin-1 ima potencijalnu primenu i u prognostici kancera prostate, s obzirom da korelira sa lošijom prognozom i potencijalni je aktivator metastatskog procesa [131]. Sekretovani kaveolin-1, koji se može detektovati u serumu, je ovde posebno bitan, jer bi se njegovim određivanjem iz seruma mogli razdvojiti pacijenti koji boluju od manje opasnog kancera prostate od pacijenata sa klinički značajnim, invazivnim kancerom [132].

1.3.5. Receptor za epidermalni faktor rasta - EGFR

Struktura, lokalizacija i funkcija

Receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor* – EGFR) pripada EGFR familiji receptora koji se još nazivaju i ErbB familija i pripadaju super-familiji tirozin kinaznih receptora (engl. *receptor tyrosine kinase* - RTK).

EGFR se sastoji od vanćelijskog domena, hidrofobnog transmembranskog segmenta i unutarćelijskog regiona sa tirozin kinaznom aktivnošću [133]. Za vanćelijski domen se vezuju različiti ligandi, između ostalih EGF i TGF α . Vanćelijski domen ima dve konformacije, otvorenu i zatvorenu, i po vezivanju liganda EGFR prelazi u otvorenu konformaciju što favorizuje formiranje homo i hetero dimera [134]. Dimerizacija izaziva unakrsnu fosforilaciju tirozina na unutarćelijskom regionu dimera za koje se zatim efektorski molekuli mogu vezivati, aktivirati i preneti signal (**Slika 10**).



Slika 10. Signalni putevi koje aktivira EGFR. Vezivanjem liganda za EGFR, receptor dimerizuje i aktivira nekoliko signalnih puteva (MAPK, PI3K/Akt, STAT3, fosfolipaza γ signalni put) koji izazivaju specifične ćelijske odgovore kao što su diferencijacija, proliferacija, migracija i preživljavanje. Adaptirano iz [135].

U prvom redu, EGFR aktivira RAS/RAF/MAPK signalni put, zatim PI3K/AKT kinazni put i fosfolipazu C. Ovi signalni putevi vode proliferaciji, angiogenezi, migraciji, preživljavanju i adheziji ćelija [136]. Po prestanku signala, receptori se uklanjaju sa membrane endocitozom pomoću klatrinskih vezikula, nakon čega se recikliraju natrag na membranu [137, 138], dok ne-klatrska internalizacija, primarno kaveolin-vezikularnim putem, vodi degradaciji receptora [139].

Uloga EGFR u kanceru tiroidee

Povišena ekspresija EGFR je detektovana kod anaplastičnog karcinoma, kao i kod nediferenciranih odnosno slabo diferenciranih tiroidnih karcinoma [140, 141] i PTC [142] [143], a utvrđena je i povišena ekspresija kod papilarnih karcinoma koji imaju karakteristike nediferenciranih karcinoma [144], čime je pretpostavljeno da EGFR ima ulogu u dediferencijaciji PTC. Njegova ekspresija je povezana sa faktorima lošijeg ishoda bolesti, i zbog toga bi mogao da se koristi kao prognostički marker kod karcinoma koji nemaju *BRAF* mutaciju [145]. Međutim, postoje i studije u kojima EGFR ekspresija u PTC nije pokazala značajnu povezanost sa limfnim nodalnim metastazama kao faktorima agresivnosti [142].

Iako su mutacije u EGFR u drugim karcinomima česte i negde su uzrok pojačane EGF signalizacije, ispitivanje prisustva mutacije u EGFR genu kod karcinoma štitne žlezde je dalo uglavnom negativne rezultate. U studiji iz Japana identifikovano je 30% pacijenata pozitivnih na L858R mutaciju i kratku *in-frame* deleciju egzona 19 [146]. *Mitsiades* i saradnici su našli tačkaste mutacije u kinaznom domenu EGFR u 3,2% slučajeva tiroidnog kancera [147]. Suprotno tome, pojedine studije uopšte nisu uspele da detektuju mutacije u EGFR genu [140, 148].

Kako je povećana ekspresija EGFR pokazana kod ATC, EGFR je ispitivan kao meta za terapiju u anaplastičnom karcinomu. Istraživanja su pokazala da se delovanjem na EGFR u anaplastičnim karcinomima može usporiti njihov rast i širenje [140, 149, 150]. U studiji iz 2015. godine, na mišijem modelu ATC je pokazano značajno povećanje preživljavanja korišćenjem inhibitornih terapeutika za EGFR, HER2 i histon deacetilazu [151].

EGFR kao prognostički marker i primena u terapiji inhibitorima

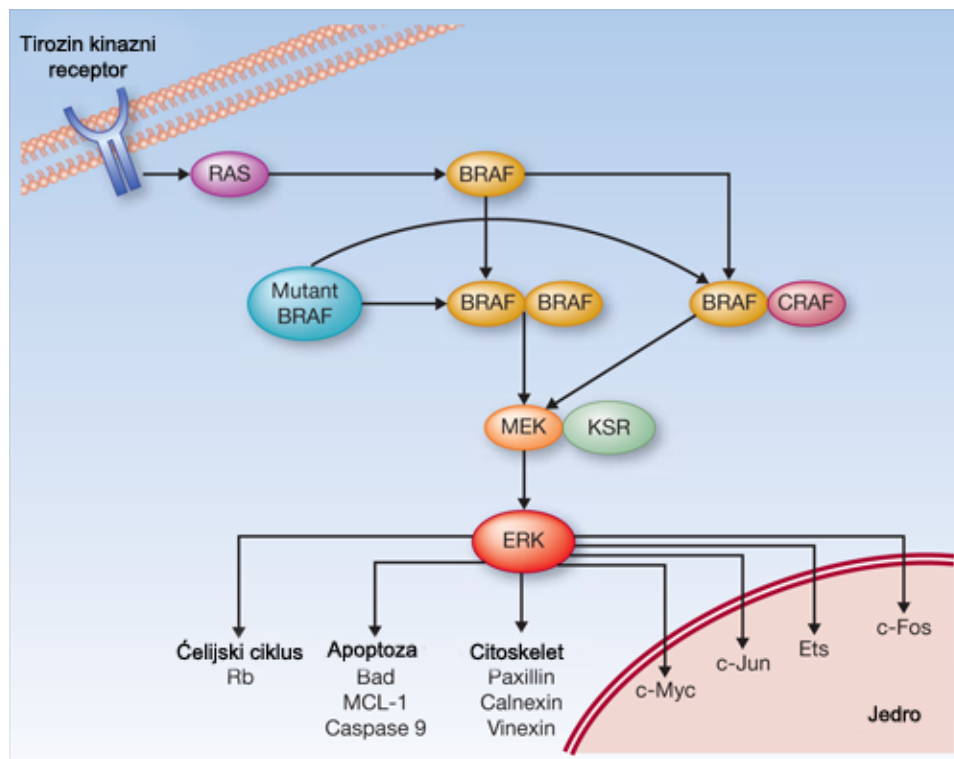
EGFR je povezivan sa lošijim ishodom bolesti i pokazano je da je pogodan marker za prognozu karcinoma glave i vrata, jajnika, bešike i jednjaka, gde se povišena ekspresija EGFR javlja kod pacijenata sa lošim ishodom bolesti [152-154]. Sa manjom tačnošću, EGFR se koristi i za predviđanje toka bolesti kod karcinoma želuca, dojke i debelog creva [155]. U analizi zasnovanoj na rezultatima TCGA projekta (*The Cancer Genome Atlas* projekat), pokazano je da je visoka ekspresija EGFR i amplifikacija *EGFR* gena karakteristična za klasični podtip glioblastoma [156]. Kod pacijenata sa kancerom pluća, česte su mutacije u genu za EGFR u kasnijim stadijumima, zbog toga se testiranje pacijenata na neku od ovih mutacija koristi za određivanje personalizovane terapije koja će ciljati mutantne receptore [157].

Postoje dve strategije u EGFR ciljanoj terapiji: primena monoklonskih atitela i primena tirozin kinaznih inhibitora [137]. Monoklonska antitela se uspešno koriste u terapiji kolorektalnog karcinoma i kod uznapredovalog kancera glave i vrata [134]. Za tirozin kinazne inhibitore pokazano je da imaju značajan uticaj na poboljšavanje kliničke slike bolesti kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, kao i da im se pojačava efekat kod karcinoma koji nose neku od mutacija u kinaznom domenu [158]. Oni se koriste i kod lečenja pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa [159].

1.3.6. BRAF V600E mutacija

Struktura, lokalizacija i funkcija

BRAF (poznat i kao v-Raf *murine sarcoma viral gene homolog B1*) je serin-treonin kinaza iz RAF familije kinaza koje utiču na RAS/RAF/MEK/ERK signalni put [160]. *BRAF* V600E je tačkasta mutacija u egzonu 15 koja uzrokuje zamenu timina sa adeninom na nukleotidu 1799, što na proteinskom nivou ima za posledicu zamenu valina za glutamat. Ova zamena rezultira narušavanjem neaktivnog stanja, a kao posledica toga mutantna BRAF kinaza je konstitutivno aktivirana, što rezultuje hroničnom stimulacijom MAPK signalnog puta [161, 162]. Na ovaj način, *BRAF* V600E mutacija utiče na mrežu gena koji deluju na agresivnost kancera, preko mehanizama ćelijske adhezije, migracije i invazije [163] (Slika 11).



Slika 11. MAPK signalizacija sa *BRAF wild type* i *BRAF V600E* mutantnom kinazom. Po dobijanju signala sa membrane, RAS aktivira *wild type* BRAF koji dimerizacijom prenosi signal na MEK i ERK kinazu koje indukuje efekte kao što su proliferacija i preživljavanje. *BRAF V600E* dimerizuje bez stimulusa od RAS. Adaptirano iz [164].

Učestalost i klinička primena

BRAF V600E mutacija se javlja kod benignih nevusa (mladeža) i melanoma (90% i 40%, redom), kolorektalnog karcinoma (10-15%) i u manjoj meri kod karcinoma pluća i jajnika [89]. Istraživanje iz 2011. godine je pokazalo da se ova mutacija javlja u 100% slučajeva leukemije vlasastih celija [165]. Iako veliki broj melanoma nosi ovu mutaciju, ona se ne koristi u dijagnostičke svrhe jer se javlja i kod velikog broja benignih nevusa i spekuliše se da je *BRAF* mutacija u osnovi kancerogeneze melanoma [166]. Kod kolorektalnog kancera, *BRAF V600E* se javlja samo kod karcinoma koji imaju mikrosatelitsku nestabilnost (MSI), a nemaju mutacije u genima za reparaciju pogrešno sparenih baza (*mismatch repair* geni) [167]. Kako su mutacije u ovim genima karakteristika naslednog oblika kolorektalnog karcinoma - Linč sindroma - testiranje na *BRAF* je korisno

za skrining pacijenata [168]. Budući da je *BRAF* V600E mutacija pronađena u 100% slučajeva leukemije vlasastih ćelija, to bi moglo imati veliki uticaj na dijagnostiku, kao i terapiju ove vrste maligniteta.

***BRAF* V600E u kanceru tiroidee**

BRAF V600E mutacija je najčešća genetska alteracija u papilarnom tiroidnom karcinomu, nađena u 40-45% ovih tumora [169]. *BRAF* V600E nije nađena u folikularnim karcinomima i benignim nodusima i zato predstavlja specifičan marker papilarnog karcinoma i srodnih tipova tumora [170-172]. Ova mutacija je pronađena i u 10-20% slabo diferenciranih karcinoma i 20-40% anaplastičnih karcinoma [173-175]. Kod anaplastičnih karcinoma često postoje regije dobro diferenciranog papilarnog karcinoma, a kako je *BRAF* V600E zamena detektovana i u regiji sa anaplastičnom i sa dobro diferenciranom histološkom strukturom, postoji hipoteza da je ova mutacija jedan od ranih događaja koji predodređuje tumor na dediferencijaciju [173], što ukazuje da su dobro diferencirani tiroidni karcinomi sa *BRAF* V600E mutacijom agresivniji. *BRAF* mutacija ima visoku pozitivnu prediktivnu vrednost, koja iznosi 98,9-100% [176-179]. Kod nodusa sa neodređenom FNA biopsijom, određivanje *BRAF* V600E statusa bi moglo da olakša postavljanje dijagnoze [162].

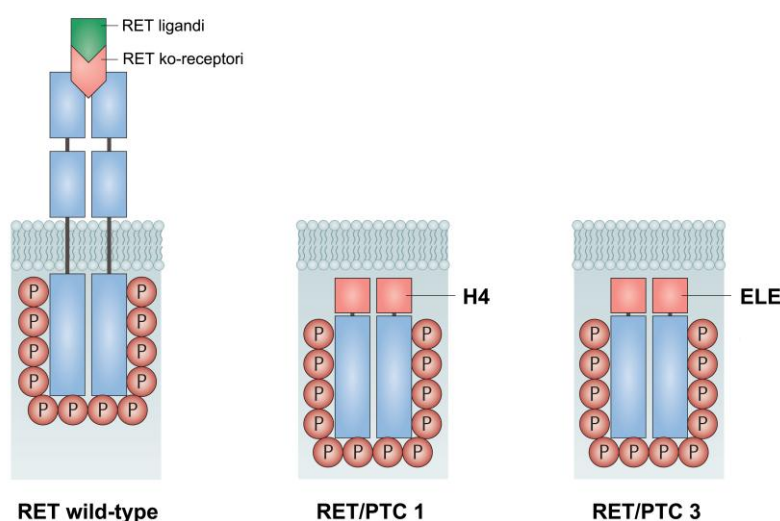
Pokazano je da je *BRAF* V600E mutacija u korelaciji sa agresivnim karakteristikama papilarnog karcinoma: ekstratiroidnom invazijom, visokim TNM stadijumom tumora i limfnim i udaljenim metastazama [180], kao i većim rizikom od povratka bolesti [181], a može biti povezana i sa mortalitetom [182].

1.3.7 *RET/PTC* rearanžmani

Struktura, lokalizacija, funkcija

RET/PTC je hromozomski rearanžman kod kog se deo *RET* gena fuzioniše sa drugim genom što rezultuje nastankom himernog gena. Naziv je dobio po tome što je otkriven u papilarnom tiroidnom karcinomu. Postoji više različitih himernih gena i svi oni sadrže deo *RET* gena koji kodira intaktnu tirozin kinazu fuzionisanu sa aktivnim promotorom drugog gena koji utiče na ekspresiju i ligand-nezavisnu dimerizaciju *RET/PTC*

proteina. Ovo dovodi do hronične stimulacije MAPK ili PI3K/Akt signalnog puta i za posledicu ima proliferaciju folikularnih ćelija. Himerni RET receptor nema vanćelijski deo kao *wild type* RET, već je lokalizovan sa citosolne strane membrane, ali sadrži domen upredene zavojnice (engl. *coiled coil*) koji omogućava dimerizaciju nezavisnu od vezivanja liganda [183] (Slika 12). Dva najčešća rearanžmana su *RET/PTC1* i *RET/PTC3*, kod kojih je 3' kraj *RET* gena fuzionisan sa 5' terminalnim regionom gena *CCDC6*, odnosno *NCOA4* koji potiču sa istog hromozoma 10 [184].



Slika 12. RET receptor i RET/PTC 1 i 3 himerni proteini. *Wild type* RET sadrži vanćelijski segment za koji se vezuju ligandi koji indukuju dimerizaciju i prenošenje signala. *RET/PTC* fuzijama se *RET* kinazni domen kombinuje sa domenima drugih proteina što omogućava ligand - nezavisnu dimerizaciju i aktivaciju signalnog puta. Adaptirano iz [183].

***RET/PTC* rearanžmani u kanceru tiroidee**

RET/PTC rearanžmani se najčešće javljaju kod mlađih pacijenata (40-70%) i kod pacijenata koji su bili izloženi jonizujućem zračenju (50-80%) [185]. Velika prevalenca uočena je kod pojedinaca izloženih jonizujućem zračenju posle Černobiljske katastrofe (~50%) [186]. Osim u slučaju loše diferenciranih tumora, *BRAF* mutacije i *RET/PTC* rearanžmani se međusobno isključuju. Od ukupnog broja *RET* rearanžmana *RET/PTC1* je detektovan u 60-70% slučajeva, dok *RET/PTC3* čini oko 20-30% *RET* rearanžmana [187].

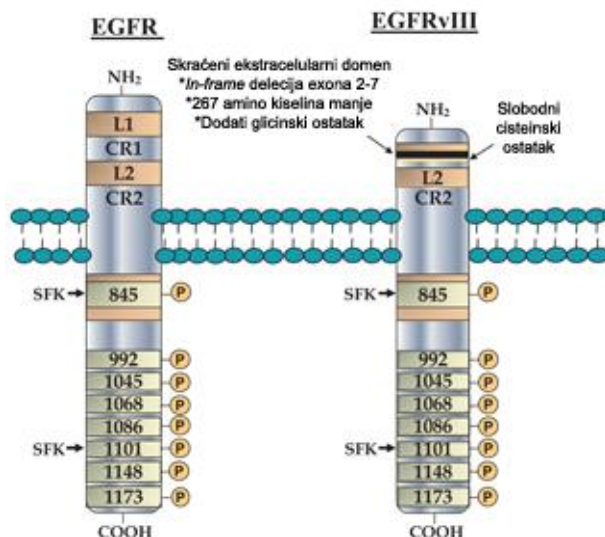
RET/PTC rearanžmani su detektovani i u benignim uzorcima [188, 189], kao i u uzorcima sa Hašimotovim tiroiditisom [190], ali je predmet debate koliko su ovi rezultati relevantni, pošto su rearanžmani detektovani visoko osetljivim metodama koje mogu da detektuju i subklonalne mutacije [191].

RET rearanžmani se koriste kao dijagnostički marker u panelima mutacija. U prognostičkom smislu, njihova klinička upotreba je još uvek neizvesna. *RET/PTC1* mutacije su povezane sa klasičnim histotipom PTC i sa karcinomima koji se retko dediferenciraju [192]. Suprotno njima, *RET/PTC3* rearanžmani su pokazali pozitivnu korelaciju sa veličinom tumora, kasnijim stadijumom i metastatskim širenjem [193, 194].

1.3.8. EGFRvIII

Struktura, lokalizacija, funkcija

Mutacije u *EGFR* genu su česte i raznolike, najučestalije su one u vanćelijskom regionu koje rezultiraju skraćivanjem receptora [135]. Među njima je najbolje opisana EGFRvIII mutacija koja je specifična za tumorsko tkivo. Ona je rezultat *in-frame* delecije 801 baznog para koji se prostiru od egzona 2 do egzona 7 kodirajućeg regiona [195]. Ovom delecijom se gubi 267 amino kiselina iz ekstraćelijskog domena EGF receptora, zbog čega je EGFRvIII ligand-nezavisan, čime se objašnjava njegova pro-tumorska aktivnost (**Slika 13**).



Slika 13. *Wild type* EGFR i EGFRvIII mutantni receptor. Adaptirano iz [196].

EGFRvIII utiče na aktivaciju RAS/RAF/MAPK puta, a smatra se da najveći efekat ispoljava aktivacijom PI3K/Akt puta, a utiče i na STAT3 i NFκB signalizaciju [196]. Mutantni EGFRvIII ne podleže endocitozi, te je njegovo zadržavanje na membrani prolongirano, što za posledicu ima produženu aktivaciju signalnih puteva [197].

Učestalost i klinička primena

EGFRvIII se javlja kod glioblastoma sa frekvencijom između 25-64% [198-200]. Kako se EGFRvIII eksprimira samo u tumorskom tkivu, ispituju se mogućnosti korišćenja ovog mutanta kao mete za terapeutike [201]. Prisustvo EGFRvIII kod glioblastoma je povezano i sa rezistencijom na radio i hemoterapiju [202], te bi se njegovom inhibicijom mogla povratiti osetljivost ćelija na radioterapiju. EGFRvIII je uključen u *Next Generation Sequencing* (NGS) panel biomarkera, koji je predložen za korišćenje u profilisanju malignih tumora mozga [203]. Kod karcinoma dojke postoje studije koje su detektovale EGFRvIII i čija se frekvencija kreće u rasponu 20-78% [204-206], dok su neke studije objavile da je frekvencija 0-4% [207, 208]. U 16-38% slučajeva nesitnoćelijskog karcinoma pluća je detektovano prisustvo EGFRvIII [209, 210]. *In vitro* je pokazano da EGFRvIII utiče na stimulaciju proliferacije MCF-7 ćelijskih linija karcinoma dojke [211].

EGFRvIII u kanceru tiroidee

Kod karcinoma tiroidee, za sada postoji samo jedna publikacija, u kojoj je EGFRvIII mutacija ispitivana imunohistohemijski [212]. Uzorci strume su bili negativni na EGFRvIII, dok su ostale lezije pokazale pozitivnost u sledećem rastućem redosledu: FA (37,5%), MTC (50%), FTC (71,4%), PTC (75%).

U ovoj doktorskoj disertaciji su analizirani potencijalni biomarkeri opisani u Poglavljima 1.3.4. – 1.3.8., koji su određivani na nivou DNK, RNK i proteina. U analizama je korišćen klinički materijal dobijen FNA biopsijom, ili nakon operacije štitne žlezde, dakle apsirati i tkivo štitne žlezde. Za svaki biomarker je određen njegov pojedinačni potencijal za dijagnostičku upotrebu, a nakon toga i dijagnostički potencijal kombinacije odabranih markera. Dodatno je određena i povezanost ovih markera sa parametrima agresivnosti karcinoma u cilju evaluacije njihovog prognostičkog potencijala.

2. Cilj istraživanja

Dosadašnji rezultati su pokazali da je preoperativna dijagnostika karcinoma štitne žlezde bazirana samo na citološkoj analizi u približno trećini slučajeva nepouzdana i da se mora kombinovati sa testovima na različite molekulske markere. Na osnovu imunocitohemije, testiranja na somatske mutacije, merenja ekspresije gena i ekspresije miRNK, pacijenti se mogu svrstati u nisko- ili visoko-rizične grupe za kancer. Uprkos tome, debata o izboru najboljih molekulskih markera, kao i najbolje kombinacije molekulskih markera, još uvek traje.

Predmet rada ove doktorske disertacije je obuhvatio ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog potencijala odabranih biomarkera na DNK, RNK i proteinskom nivou kod pacijenata sa tumorom štitne žlezde. Ovom studijom su obuhvaćeni uzorci dobijeni od pacijenata pre operacije (biopsijom tankom iglom), uzorci tkiva nakon operacije i serumi pacijenata. Istraživanje je obuhvatilo nekoliko faza:

- U prvoj fazi ovog istraživanja ispitani su pojedinačni markeri u postoperativnim uzorcima;
- Druga faza je predstavljala ispitivanje istih markera u aspiratima štitaste žlezde dobijenih preoperativnom punkcijom nodusa;
- Treća faza je obuhvatila objedinjavanje ovih rezultata, odabir pojedinačnih markera koji imaju dijagnostički potencijal veći od same citološke analize i formiranje kombinacije markera, koja bi bila dijagnostički superiornija u odnosu na pojedinačne markere.

3. Materijal i metode

3.1. Aparati i uređaji

Aparat za PCR 2720 Thermal Cycler, *Applied Biosystems*

Aparat za Real-Time PCR 7500, *Applied Biosystems*

Centrifuga 5804R, *Eppendorf*

Centrifuga Rotofix 32, *Hettich*

Centrifuga MiniSpin plus, *Eppendorf*

Kinetor, *GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH*

Kombinovani pH/konduktometar InoLab 720, *WTW*

Magnetna mešalica ARE, *VELP Scientifica*

Mikroskop Carl Zeiss Axio Imager 1.0 sa Canon A640 digitalnom kamerom i AxioCam HR monohromatskom kamerom

Nanodrop Nano Vue, *GE Healthcare*

Sistem za elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Cell, *Bio-Rad Laboratories*

Sistem za horizontalnu elektroforezu Sub-Cell® GT Agarose Gel Electroforetic System

Sistem za transfer Trans-Blot SD semidry Electroforetic Transfer Cell, *Bio-Rad*

Transiluminator, *Vilber Lourmat*

Vaga analitička B6, *Mettler*

Victor ELISA čitač ³V, *PerkinElmer*

Vortex ZX3, *VELP Scientifica*

3.2. Osnovne hemikalije

Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

AmpliTaq Gold DNA Polymerase

Beolab, Beograd

Etanol

Tween-20

ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA

Akrilamid

Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris)

Kapa Biosystems, Wilmington, USA

KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix

KODAK, Paris, France

Hemikalije za razvijanje i fiksiranje rentgen filmova

Rentgen film MXB (100 NIF- 13x18)

Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Intekalirajuća boja - SYBR® Safe DNA Gel Stain

Trizol reagens

Prajmeri za PCR

Merck, Darmstadt, Germany

Brom-fenol plavo

Natrijum-dihidrogen fosfat

Natrijum-hidrogenfosfat

Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, USA

Nitrocelulozna membrana (0,45µm), Whatman® Protran®

Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

ECL reagens

BCA kit za određivanje koncentracije proteina

Serva, Heidelberg, Germany

Agaroz

Hloroform

Izopropanol

Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Amonijum-persulfat

Glicin

Kazein

Koktel inhibitora proteaza

N, N, N', N' – tetrametilen-diamin (TEMED)

N,N'- metilen-bisakrilamid

Natrijum-dodecil-sulfat (SDS)

Ponso S boja

Proteinaza K

Proteinski standardi za elektroforezu – ColorBurst™ Electroforesis marker

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Inhibitor RNaza – RiboLock Rnase Inhibitor

Markeri za elektroforezu – O'GeneRuler 100bp DNA Ladder

Prajmeri - Random Hexamer Primer

Reverzna transkriptaza – RevertAid Reverse Transcriptase

Reagens za stabilizaciju RNK – RNAlater®

Smeša dNTP nukleotida

Vector Laboratories Inc., Burlingame, UK

VectaMount Permanent mounting smola

Vectastain Elite ABC reagens

VectashieldAntifade medijum za montiranje

Supstrat za peroksidazu - DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit

Rastvor normalnog konjskog seruma za blokiranje

Hematoksin

Eozin

Zorka Pharma, Šabac

Dinatrijum-etilendiamin-tetrasirćetna kiselina (EDTA)

Glicerol

Hlorovodonična kiselina

Ksilen

Metanol

Natrijum-hidroksid

Natrijum-hlorid

Sirćetna kiselina

Vodonik-peroksid, 30% rastvor

3.3. Pufferi i rastvori

Imunohistohemija i imunocitohemija

1% H₂O₂ u etanolu

5% kazein u PBS pufferu

70% etanol

PBS puffer – 50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄/0,15 M NaCl, pH 7,4

Rastvor za fiksiranje ćelija - aceton/metanol 1:1

Izolacija proteina

RIPA puffer – 50 mM Tris/ 150 mM NaCl/2 % SDS/1% Triton X100, pH 8

PBS puffer – 50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄/0,15M NaCl, pH 7,4

Izolacija RNK, DNK

0,1 M Na-citrat u 10% etanolu

6 M NaCl

70% EtOH

75% etanol

DEPC tretirana voda

Puffer za digestiju – 50 mM Tris-HCl/100 mM EDTA/100 mM NaCl/1% SDS, pH 8,0

PCR

Pufer za uzorke (Loading buffer) - 50% glicerol/0.1% brom-fenol plavo

TAE (Tris-Acetate-EDTA) pufer – 400 mM Tris-HCl/1,1% (V/V) sirćetna kiselina/10 mM EDTA, pH 8.3

SDS PAGE i Western Immunoblot

PBS pufer – 50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄/0,15 M NaCl, pH 7,4

Pufer za elektrotransfer (pufer za blot) – 25 mM Tris-HCl/0,19 M glicin/20% metanol, pH 8,3

Pufer za uzorke (Laemlli pufer) – 0,125 M Tris-HCl/2%(m/V) SDS/20% glicerol/0,01% brom-fenol-plavo/5% 2-merkaptotanol, pH 6,8

TANK pufer – 25 mM Tris-HCl/0,19 M glicin/0,1% SDS, pH8,3

TBST pufer – 10 mM Tris-HCl/0,15 M NaCl/0,1% Tween-20, pH 7,4/0,15 M NaCl/0,1% Tween-20, pH 7,4

3.4. Antitela

Primarna

Poliklonska anti-kaveolin-1 antitela (zečija), Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

Poliklonska anti-EGFR antitela (zečija), Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

Monoklonska anti-β-aktin (mišija), Abcam, Cambridge, UK

Sekundarna

Biotinilovana IgG antitela (kozija) spram zeca, Vector Laboratories, Burlingame, UK

Biotinilovana IgG antitela (konjska) spram miša, Vector Laboratories, Burlingame, UK

HRP obeležena IgG antitela (ovčija) spram miša, Biosource International, Camarillo, USA

HRP obeležena IgG antitela (kozija) spram zeca, Cell Signaling, Danvers, USA

3.5. Klinički materijal

Prikupljanje uzoraka korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji je urađeno po odobrenju Etičkog komiteta INEP-a i Etičkog komiteta Centra za endokrinu hirurgiju, Kliničkog centra Srbije, uz pismenu saglasnost pacijenata. Prikupljeni su uzorci tkiva uzimani pre i nakon operacije.

3.5.1. Uzorci FNA biopsije

Preoperativni uzorci tkiva štitne žlezde su dobijeni od Centra za endokrinu hirurgiju, Kliničkog centra Srbije. FNA uzorci su uzimani biopsijom tankom iglom kod pacijenata koji su imali tiroidni nodus potvrđen ultrazvukom. Nakon punktiranja, sadržaj igle je izlivan u RNAlater, pufer za stabilizaciju RNK. Jedan deo uzorka je upotrebljen za izolaciju nukleinskih kiselina, a drugi za pripremu citoloških preparata.

Za citospin preparate, ćelije su prenete na mikroskopske pločice centrifugiranjem 50 µL uzorka na 250 rpm 2 minuta i fiksirane smešom acetona i metanola u odnosu 1:1. Od svakog uzorka, jedan preparat je obojen hematoksilinom i eozinom (HE bojenje), a drugi preparat je imunocitohemijski obojen na kaveolin-1. Na pločice je prvo nanet hematoksilin, koji je zatim ispran vodom i nanet je eozin. Nakon ispiranja eozina, pločice su kratko uronjene u 70% etanol, a zatim po 5 minuta u 100% etanol i po 5 minuta u ksilol, nakon čega su pokrovna stakalca fiksirana VectaMount smolom. Nakon HE bojenja, preparati su analizirani od strane patologa. Citološkom analizom FNAB uzoraka je određena kategorija nodusa prema Betesda klasifikaciji za preoperativnu dijagnostiku nodusa štitne žlezde [63]. U slučajevima gde je uočeno prisustvo tirocita na HE bojenom preparatu, uzorak je ocenjen prema pomenutoj klasifikaciji i korišćen u imunocitohemijskoj analizi. Uzorci kod kojih nije utvrđeno prisustvo ćelija tiroidee su odbacivani.

Svi pacijenti nakon biopsije su operisani radi uklanjanja nodusa, te su dobijene i finalne histopatološke dijagnoze.

Od pacijenata od kojih su dobijeni uzorci punktata, uzeti su i podaci o nivoima hormona štitne žlezde i auto-antitela na štitnu žlezdu u serumu. Serumski parametri su uključivali tirostimulirajući hormon (TSH), trijodtironin (T3), tiroksin (T4), slobodni trijodtironin (FT3), slobodni tiroksin (FT4), paratiroidni hormon (PTH), kalcitonin,

tiroglobulin (TG), antitela na tiroglobulin (A-TG), antitela na tiroidnu peroksidazu (A-TPO), antitela na receptor za tirostimulirajući hormon (A-TSH-R).

3.5.2. Tkivo štitne žlezde - arhivski materijal

Arhivski uzorci parafinskih kalupa i mikroskopskih preparata su dobijeni sa Odeljenja za patologiju, Instituta za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije. Parafinski kalupi su dobijeni fiksiranjem tkiva dobijenog posle operacije u formaldehidu i kalupljenjem u parafinu. Od njih su isečeni listići debljine 5 μm i fiksirani na mikroskopske pločice, tako da je svaka pločica brojala po dva reza od istog kalupa.

Kod pacijenata sa potvrđenom malignom dijagnozom određeni su kliničko-patološki parametri koji se analiziraju radi prognoze bolesti. Kliničko-patološki parametri su uključivali godine (u određenim analizama je *cut-off* uveden na 45 godina), pol (muški i ženski), pT status [213] (parametar TNM klasifikacije koji opisuje veličinu i širenje primarnog tumora: pT1 – tumor veličine ≤ 2 cm po najvećoj dimenziji, ograničen na štitnu žlezdu; pT2 – tumor veći od 2 cm i ≤ 4 cm, ograničen na štitnu žlezdu; pT3 – tumor veći od 4 cm, ograničen na štitnu žlezdu ili sa minimalnom ekstratiroidnom invazijom; pT4 – tumor bilo koje veličine koji se širi izvan štitne žlezde i zahvata okolna tkiva), dubinu neoplastične infiltracije [214] (A – inkapsulisani tumori, B – tumori bez kapsule i bez invazije tiroidne kapsule, C – tumori sa invazijom tiroidne kapsule, D – tumori sa ekstraglandularnom invazijom), veličinu tumora, kao i prisustvo limfnih nodalnih metastaza, intraglandularne diseminacije i hroničnog limfocitnog tiroiditisa.

3.5.3. Tkivo štitne žlezde - sveže postoperativno tkivo

Sveža tkiva su dobijena od pacijenata koji su operisani na Centru za endokrinu hirurgiju, Kliničkog centra Srbije. Neposredno posle operacije, tkiva su zamrznuta u tečnom azotu i čuvana na temperaturi -80°C do momenta izolacije biomolekula. Kako su svi pacijenti koji su podvrgnuti operaciji dobili finalne patohistološke dijagnoze, kod onih slučajeva gde je utvrđen malignitet, dobijeni su i podaci o kliničko-patološkim parametrima koji su opisani u prethodnom odeljku.

3.6. Izolovanje DNK

DNK iz parafinskih kalupa je izolovana korišćenjem komercijalnog RecoverAll kompleta. Od parafinskih kalupa su sečeni listići debljine 5-20 μm sterilnim skalpelom i količina tkiva ekvivalentna rezu od 80 μm je inkubirana dva puta po 10 minuta na 50°C sa 1 mL ksilola u cilju deparafinizacije. Zatim je tkivo rehidratirano ispiranjem sa 1 mL etanola tri puta. Po uklanjanju parafina uzorci su prvo tretirani smešom 200 μL pufera za digestiju i 4 μL proteaze po uzorku i inkubirani preko noći na 50°C. Po završetku inkubacije je dodata smeša aditiva za izolaciju (240 μL po uzorku) i 100% etanola (550 μL po uzorku) i nakon kratkog mućkanja i centrifugiranja, supernatant je propušten kroz filtere od silikata koji vezuju nukleinske kiseline centrifugiranjem na 10000 x g. Filteri su zatim ispirani sa 700 μL *Wash 1* reagensa za ispiranje i sa 500 μL *Wash 2/3* reagensa za ispiranje. Na membrane je zatim dodata RNK-aza. Nakon inkubacije sa enzimom 30 minuta na sobnoj temperaturi, filteri su ponovo isprani sa reagensima za ispiranje u istoj količini kao i u prethodnom koraku, osim što je ispiranje sa *Wash 2/3* puferom ponovljeno jednom. U poslednjem koraku, DNK je eluirana vodom ugrijanom na 95°C.

Nukleinske kiseline iz svežih tkiva i punktata su izolovane Trizol reagensom. 50-100 mg tkiva, ili 300 μL punktata u *RNA later* reagensu, je inkubirano na rotirajućem točku sa 400 μL Trizola 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodato 80 μL hloroforma, i centrifugirano na 12000 x g, 15 minuta na 4°C. Ovim su organska, međufaza i vodena faza razdvojene i vodena faza je odvojena za izolaciju RNK. Za izolovanje DNK je u organsku fazu i međufazu dodato 120 μL etanola i nakon kratke inkubacije od 3 minuta, centrifugirano na 2000 x g 5 minuta na 4°C. Supernatant je odbačen, a DNK pelet je ispran dva puta inkubacijom od 30 minuta sa natrijum-citratom u 10% etanolu u zapremini od 400 μL po uzorku, i potom sa 800 μL 75% etanola inkubacijom od 20 minuta. Između svakog ispiranja, supernatant je odbacivan nakon centrifugiranja na 2000 x g 5 minuta na 4°C. Nakon poslednjeg ispiranja, pelet je osušen na sobnoj temperaturi i rastvoren u vodi, inkubacijom preko noći na 4°C.

Kod pojedinih uzoraka svežeg tkiva DNK je izolovana postupkom sa proteinazom K. 50-100 mg tkiva je inkubirano sa 500 μL pufera za digestiju i 50 μg proteinaze K preko noći na 55°C. Nakon toga su uzorci 10 minuta inkubirani na ledu i u ovu smešu je zatim

dodato 300 μL 6 M natrijum-hlorida. Posle inkubacije 5 minuta na ledu, uzorci su centrifugirani 20 minuta na 12000 x g na 4°C i supernatant je odvojen za dalju izolaciju. U njega je dodata zapremina etanola jednaka zapremini supernatanta i uzorci su inkubirani na ledu 20 minuta. Nakon centrifugiranja na 12000 x g 20 minuta na 4°C, pelet je ispran sa 1 mL hladnog 70% etanola, a zatim ponovo centrifugiran 15 minuta na 12000 x g na 4°C. Pelet je rastvoren inkubacijom u vodi preko noći na 4°C. Koncentracija DNK je izmerena spektrofotometrijski na NanoVue® aparatu.

3.7. Izolovanje RNK

Iz parafinskih kalupa, RNK je izolovana uz pomoć RecoverAll kompleta. Sterilnim skalpelom su isečeni listići debljine do 20 μm i ekvivalent od 80 μm je deparafinizovan grejanjem uzoraka sa 1 mL ksilola na 50°C. Ksilol je uklonjen trostrukim ispiranjem sa 1 mL etanola i nakon sušenja peleta proteini su digestovani smešom 200 μl pufera za digestiju i 4 μl proteinaze. Uzorak je inkubiran 15 minuta na 80°C a zatim 15 minuta na 50°C. U ovu smešu je zatim dodato 240 μl aditiva za izolaciju rastvorenog u 550 μl 100% etanola. Nakon kratkog centrifugiranja, supernatant je centrifugiranjem na 10000 x g propušten kroz filtere sa silikatnim membranama koje su vezale RNK i DNK. Membrane su zatim isprane sa 700 μl *Wash 1* reagensa i 500 μl *Wash 2/3* reagensa. U cilju izolovanja RNK na membrane je dodata DNK-aza koja je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Filteri su zatim ponovo isprani sa reagensima za ispiranje u istoj količini kao i u prethodnom koraku, osim što je ispiranje sa *Wash 2/3* puferom ponovljeno jednom. RNK je sa membrane eluirana DEPC – tretiranom vodom.

RNK iz svežih tkiva i punktata su izolovane Trizol reagensom. Nakon inkubacije sa 400 μL Trizola na rotirajućem točku 2 h na sobnoj temperaturi, dodato je 80 μL hloroforma, smeša je dobro promućkana i centrifugirana na 12000 x g, 15 minuta na 4°C. Ovako su dobijene tri faze - vodena, međufaza i organska faza - i vodena faza je odvojena za izolovanje RNK. U nju je dodato 5 μg glikogena i 200 μL izopropanola, a zatim je ova smeša inkubirana preko noći na -20°C. Nakon toga je centrifugirana na 12000 x g 10 minuta na 4°C, pelet je ispran sa 400 μL 75% etanola koji je uklonjen nakon centrifugiranja na 7500 x g 5 minuta na 4°C i talog je ostavljen da se osuši. Po završetku sušenja pelet je

resuspensovan u DEPC-tretiranoj vodi inkubacijom na 55°C 15 minuta. Koncentracija RNK je izmerena spektrofotometrijski na NanoVue® aparatu.

3.8. Reverzna transkripcija

Približno 1 µg RNK templata rastvorenog u vodi je upotrebljen u reakciji reverzne transkripcije. Smeša RNK templata, 0,2 µg heksamernih prajmera i 1 mM dNTP nukleotida je inkubirana 5 minuta na 70°C, a po dodatku 4 µl 5x reakcionog pufera, 200 jedinica enzima reverzne transkriptaze i 20 jedinica RiboLock® inhibitora RNaza, reakcija je nastavljena u sledećim uslovima: 25°C (15 min), 42°C (60 min), 70°C (15 min) i 4°C (5 min).

3.9. Alel - specifični PCR

Detekcija *BRAF* V600E mutacije i *CAVI* P132L mutacije je urađena metodom alel-specifičnog PCR umnožavanja DNK fragmenta korišćenjem dva različita para prajmera. Jedan par je dizajniran da umnoži *wild type* oblik, dok se drugi vezuje sa mutantnu formu. U slučaju da mutacija nije prisutna, umnožavanje sa ovim parom prajmera će izostati. Sekvence prajmera su date u **Tabeli 3**.

Reakciona smeša je sadržala: 1x AmpliTaq pufer, 25 mM magnezijum-hlorida, 200 µM dNTPs, 0,5 µM *forward* prajmera, 0,5 µM *reverse* prajmera, 1,25 jedinica Taq polimeraze i 100 ng DNK.

Amplifikacija je urađena pod sledećim uslovima:

- Za *BRAF* V600E: početna denaturacija na 94°C (2 min), 35 ciklusa na temperaturama 94°C (30 s), 58°C (30 s) i 70°C (30 s), finalna ekstenzija na 72°C (2 min) i hlađenje na 4°C;
- Za *CAVI* P132L: početna denaturacija na 95°C (5 min), 15 ciklusa na temperaturama 95°C (30 s), 63,3°C zatim svaki sledeći ciklus za 0,5°C manje (30 s) i 72°C (10 s), 20 ciklusa na temperaturama 95°C (30 s), 58°C (30 s) i 72°C (10 s), finalna ekstenzija na 72°C (5 min) i hlađenje na 4°C.

Tabela 3. Sekvence prajmera korišćenih u alel-specifičnom i kvantitativnom PCR.

Gen	Vrsta	Sekvenca	Veličina fragmenta [bp]
<i>BRAF</i> V600E	F - wt	5' – GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT - 3'	125
	F- mut	5' – GTGATTTTGGTCTAGCTACAGA – 3'	
	R	5' – GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA – 3'	
<i>CAVI</i> P132L	F – wt	5' – CACATCTGGGCAGTTGTACC - 3'	94
	F- mut	5' – CACATCTGGGCAGTTGTRCT – 3'	
	R	5' – CACAGACGGTGTGGACGTAG – 3'	
<i>CAVI</i>	F	5' – CCAGCTTCACCACCTTCACT - 3'	136
	R	5' – CACAGACGGTGTGGACGTAG – 3'	
<i>EGFR</i>	F	5' - TACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTT - 3'	89
	R	5' – CCACTGTGTTGAGGGCAATG - 3'	
<i>RET/PTC 1</i>	F	5' – GGAGACCTACAAACTGAAGTGCAA – 3'	137
	R	5' – CCTTCTCCTAGAGTTTTTCCAAGA – 3'	
<i>RET/PTC 3</i>	F	5' – CCAGTGGTTATCAAGCTCCTTACA – 3'	106
	R	5' – GGGAATTCCCCTTTGGATCCTC – 3'	
EGFRvIII	F	5' - GCTCTGGAGGAAAAGAAAGGTAATTAT - 3'	98
	R	5' – ACGCCGTCTTCCTCCATCT - 3'	
<i>GAPDH</i>	F	5' – GAAGGTGAAGGTCGGAGT – 3'	226
	R	5' – GAAGATGGTGTATGGGATTTC – 3'	

F – engl. *forward*, nizvodni prajmer , R – engl. *reverse*, uzvodni prajmer, wt – *wild type*, mut - mutant

Fragmenti su detektovani elektroforetskim razdvajanjem na 2% agaroznom gelu sa dodatkom interkalirajuće fluorescentne boje SYBR® SAFE i analizirani na transiluminatoru pod UV svetlom.

Za pozitivnu kontrolu *BRAF* V600E mutacije su korišćene TPC-1 ćelije papilarnog kancera štitne žlezde koje imaju ovu mutaciju. Za *CAVI* P132L mutaciju, pozitivna i negativna kontrola su bili plazmidi sa odnosno bez *CAVI* P132L mutacije, dobijeni

ljubaznošću dr Monike Rit sa Departmana za hemiju, Lihaj Univerziteta u Pensilvaniji, SAD.

3.10. Kvantitativni PCR

Za merenje ekspresije gena za kaveolin-1 i EGFR je upotrebljena metoda kvantitativnog PCR umnožavanja. Za umnožavanje je korišćena smeša cDNK templa, 5 µL 2x SYBR® FAST master miksa, 50 nM ROX low pasivne boje i po 0,4 µM specifičnih prajmera. Kao endogena kontrola je korišćen gen za GAPDH. Sekvence prajmera su date u

Tabeli 3.

Efikasnost umnožavanja je proverena korišćenjem serije serijskih razblaženja cDNK i konstruisanjem standardne krive. Iz nagiba standardne krive je određena efikasnost umnožavanja za dati par prajmera koja je ulazila u preporučeni okvir od 90 – 110%.

Umnožavanje je urađeno pod sledećim uslovima:

- Za *CAVI*: 95°C (20s), a zatim 40 ciklusa na temperaturama 95°C (3 s) i 60,3°C (30 s);
- Za *EGFR*: 95°C (10 min), a zatim 40 ciklusa na temperaturama 95°C (15 s) i 60°C (1 min).

Dobijene C_t vrednosti (C_t – *cycle threshold*, ciklus na kome intenzitet fluorescence prelazi zadati prag) iskorišćene su za izračunavanje relativne ekspresije uporednom *delta delta C_t* metodom [215]:

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

Gde je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{test uzoraka}) - \Delta Ct(\text{kalibrator uzoraka})$$

$$\Delta Ct(\text{test uzoraka}) = Ct(\text{target gen u test uzorcima}) - Ct(\text{referentni gen u test uzorcima})$$

$$\Delta Ct(\text{kalibrator uzoraka}) = Ct(\text{target gena kalibratora}) - Ct(\text{referentnog gena kalibratora})$$

3.11. Detekcija rearanžmana i delecija

U uzorcima tkiva štitne žlezde dobijenih biopsijom tankom iglom, analizirano je prisustvo *RET/PTC1* i 3 rearanžmana i EGFRvIII mutacije na *real time* PCR aparatu. PCR proizvod je bio detektovan samo ukoliko je rearanžman (*RET/PTC*) ili delecija (EGFRvIII) prisutna. Reakciona smeša je sadržala cDNK templat, 5 µL 2x SYBR® FAST master miksa

i po 0,4 μ M specifičnih prajmera 50 nM ROX low pasivne boje. Sekvence prajmera su date u **Tabeli 3**. Umnožavanje je urađeno u duplikatima pod sledećim uslovima: 95°C 10 minuta, a zatim 40 ciklusa na temperaturama 95°C (15 s) i 60°C (60 s).

Kao prag detekcije je uzeta Ct vrednost od 35 ciklusa; Ct vrednosti niže od 35 su označavale pojavu rearanžmana ili mutacija u uzorku.

3.12. Izolovanje proteina

Proteini su iz svežih tkiva i parafinskih kalupa izolovani primenom RIPA pufera za liziranje ćelija.

Parafinski kalupi su usitnjeni sečenjem sterilnim skalpelom na listiće debljine 5-20 μ m i količina tkiva ekvivalentna rezu od 80 μ m je inkubirana dva puta po 10 minuta na 50°C sa 1 mL ksilola. Zatim je tkivo rehidratirano ispiranjem sa 1 mL etanola tri puta. Nakon sušenja je urađena ekstrakcija proteina dodavanjem 200 μ l RIPA pufera sa dodatkom proteaznih inhibitora u koncentraciji 1:100. Ova smeša je inkubirana 10 minuta na 100°C, a zatim 2h na 60°C. Po isteku inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10000 x g i supernatant sa ekstrahovanim proteinima je odvojen za dalju analizu.

Sveže tkivo mase oko 100 mg je homogenizovano u tečnom azotu, a zatim je urađena ekstrakcija RIPA puferom prema gore opisanom protokolu.

3.13. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza i Western blot

Ukupna ekspresija kaveolina-1 je određena iz tkivnih lizata karcinoma štitne žlezde. Proteini u količini od 20 μ g su razdvojeni na 15% poliakrilamidnom gelu u redukujućim uslovima i preneti na membranu pomoću *Semi-dry* sistema za elektrotransfer. Nespecifično vezivanje je blokirano 5% kazeinom na sobnoj temperaturi, a zatim je membrana inkubirana sa primarnim antitelima u koncentraciji 1:200 za kaveolin-1 preko noći na 4°C. Nakon ispiranja sa TBST puferom, primenjena su biotinizovana antitela i ABC reagens, posle čega je signal vizuelizovan ECL reagensom i metodom autoradiografije. Ista membrana je sledeći dan inkubirana sa primarnim antitelom prema kontroli za *loading* (anti- β -aktin u koncentraciji 1:1000) i signal je vizuelizovan na isti način.

Signali na filmu su analizirani denzitometrijski u programu Master Total Laboratory v2.01 (Amersham BioSciences, Buckinghamshire, USA). Signal od kaveolina-1 dobijen na očekivanoj molekulskoj masi je normalizovan na signal od β -aktina. U svaki WB eksperiment je uključen jedan kontrolni uzorak, kako bi različiti eksperimenti mogli da se uporede.

3.14. Imunocitohemija

Citološki preparati pripremljeni citospinom od FNAB uzoraka su obojeni imunocitohemijski na kaveolin-1.

Inkubacijom u ksilolu dva puta po 30 minuta je uklonjen medijum za montiranje, a zatim su ćelije rehidratirane sa 100% etanolom. Inhibicija endogenih peroksidaza je izvršena inkubiranjem ćelija u 1% rastvoru vodonik peroksida u 100% etanolu 30 minuta, nakon čega su pločice ispirane u 70% etanolu i PBS puferu. Inkubacijom sa normalnim konjskim serumom je inhibirano nespecifično vezivanje, nakon čega su pločice inkubirane sa primarnim anti-kaveolin-1 antitelima u koncentraciji 1:200 preko noći na 4°C. Nakon primarnih, upotrebljena su biotinilovana sekundarna antitela, a zatim kompleks avidin-biotin sa kuplovanom peroksidazom iz Vectastain Elite ABC kompleta. DAB komplet koji sadrži 3, 3' - diaminobenzidin kao supstrat za peroksidazu je korišćen za vizuelizaciju, nakon čega su pločice ispirane običnom vodom i bojene hematoksilinom kao kontrastnom bojom. Uzorci su dehidratirani inkubacijom u 70% etanolu, a zatim u 100% etanolu i ksilolu. Uzorci su montirani pomoću VectaMount smole i analizirani na Carl Zeiss Axio Imager 1.0 mikroskopu sa Canon A640 digitalnom kamerom.

Imunocitohemijsko bojenje je ocenjivano prema prisustvu ili odsustvu bojenja na kaveolin-1 sa 0 i 1, respektivno.

3.15. Imunohistohemija

Imunohistohemijsko bojenje na kaveolin-1 je urađeno na parafinskim isečcima tumorskog tkiva štitaste žlezde debljine 5 μ m. Parafinski isecci su deparafinisani u ksilolu, a zatim rehidratirani u 100% etanolu. Pločice su dalje tretirane prema protokolu opisanom u prethodnom poglavlju.

Imunohistochemijsko bojenje je ocenjivano sa četiri nivoa imunoreaktivnosti i to: 0 - odsustvo bojenja ili fokalna pozitivnost, 1 – slabo, 2 – umereno i 3 – jako citoplazmatsko bojenje.

3.16. Imunofluorescenca

Imunofluorescentno bojenje kaveolina-1 i EGFR je urađeno na isečcima parafinskih kalupa. Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidratacije u etanolu, nespecifično vezivanje je blokirano sa 2% normalnim konjskim serumom i isečci su inkubirani sa anti-kaveolin-1 antitelom u koncentraciji 1:200 preko noći na 4°C. Nakon ispiranja u PBS, isečci su inkubirani sa prvim biotinom obeženim sekundarnim antitelom, 2h na sobnoj temperaturi, a zatim sa fluoresceinom obeženim streptavidinom, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je usledilo drugi korak blokiranja u 2% konjskom serumu, a potom inkubacija sa anti-EGFR antitelom koncentracije 1:100 preko noći na 4°C. Posle ispiranja, primenjena je druga inkubacija sa biotiničanim sekundarnim antitelom, kao i inkubacija sa streptavidinom obeženim *Texas red* bojom. Isečci su prekriveni pokrovnim stakalcima fiksiranim Vectashield Antifade medijumom sa dodatkom DAPI reagensa za vizuelizaciju jedara i analizirani na Carl Zeiss Axio Imager 1.0 mikroskopu sa AxioCam HR monohromatskom kamerom.

3.17. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je urađena u programu IBM SPSS 22.0 za Windows (IBM Corp., Armonk, USA), dok je za vizuelizaciju podataka korišćen programski jezik R (*R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*). Za poređenje razlika po grupama kod varijabli parametrijske raspodele su korišćeni Studentov t test ili ANOVA, dok su kod neparametrijskih varijabli korišćeni *Mann Whitney U* test ili *Fisher exact* test. Korelacija između parametara je određena merenjem Spirmanovog koeficijenta.

Dijagnostičke performanse markera su određene izračunavanjem osetljivosti, specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV), negativne prediktivne vrednosti (NPV) i dijagnostičke tačnosti (ACC) (**Slika 14**), a dijagnostička upotrebljivost testa *Receiver Operating Curve* (ROC) analizom. ROC analiza određuje balans, odnosno

kompromis (*trade-off*) između osjetljivosti i specifičnosti. Ako se za svaku vrednost testa uzme da je ona *cut-off* ili prag, mogu se izračunati osjetljivost i specifičnost za svaku datu tačku. Pomoću ovih vrednosti konstruiše se ROC kriva, koja prikazuje na x osi 1-specifičnost, a na y osi osjetljivost; površina ispod ROC krive nazvana AUC (engl. *Area Under the Curve* - AUC) se koristi kao mera dijagnostičkih performansi. Dobar dijagnostički test će imati visoku AUC, odnosno kriva će biti udaljena od dijagonalne linije. Test bez dijagnostičke upotrebljivosti će imati krivu sa AUC = 0,5, odnosno krivu koja se poklapa da dijagonalnom linijom. Što je veća AUC, test ima bolje performanse, dok je maksimalna vrednost površine ispod ROC krive 1, što predstavlja tačku u kojoj su osjetljivost i specifičnost 100%.

	OBOLELI	ZDRAVI	
POZITIVNI	TAČNO POZITIVNI TP	LAŽNO POZITIVNI LP	$PPV = \frac{TP}{TP + LP}$
NEGATIVNI	LAŽNO NEGATIVNI LN	TAČNO NEGATIVNI TN	$NPV = \frac{TN}{TN + LN}$
	Osetljivost = $\frac{TP}{TP + LN}$	Specifičnost = $\frac{TN}{TN + LP}$	$DT = \frac{TP + TN}{N}$

Slika 14. Formule za izračunavanje parametara dijagnostičkog potencijala markera. PPV – pozitivna prediktivna vrednost, NPV – negativna prediktivna vrednost, DT – dijagnostička tačnost, N – ukupan broj pacijenata.

Na osnovu ovakve analize određena je *cut-off* tačka i izračunata osjetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost i dijagnostička tačnost markera korišćenih u ovoj disertaciji.

4. Rezultati

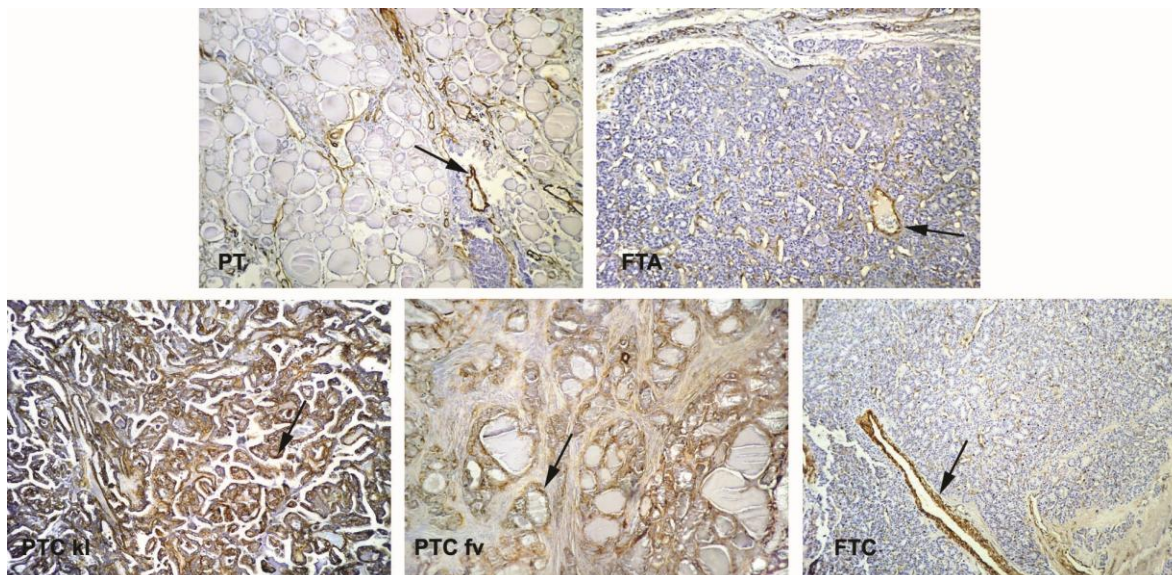
4.1. Ispitivanje odabranih biomarkera u postoperativnim uzorcima tumora štitne žlezde

Na isečcima parafinskih kalupa i uzorcima svežeg tkiva dobijenih posle operacije određena je ekspresija kaveolina-1 na nivou mRNK i proteina, njegova tkivna distribucija, genotipizacija P132L mutacije, kao i dijagnostički i prognostički potencijal ovog markera. Pored toga, uzorci papilarnog karcinoma su genotipizirani na *BRAF* V600E mutaciju i ispitivana je promena ekspresije kaveolina-1 u uzorcima različitog *BRAF* mutacionog statusa.

4.1.1. Imunohistohemijsko određivanje nivoa ekspresije kaveolina-1 u benignim i malignim tumorima štitne žlezde

U analizu ekspresije kaveolina-1 na nivou proteina je uključeno 20 uzoraka benignih lezija, odnosno folikularnih tiroidnih adenoma, i 49 uzoraka malignih lezija od čega po 18 uzoraka klasične i folikularne varijante papilarnog karcinoma i 13 uzoraka folikularnog karcinoma. Na 42 uzorka je uočeno prisustvo peritumorskog tkiva, koje je uključeno u analizu kao normalno tkivo prema nalazu patologa. Na **Slici 15** su dati reprezentativni primeri imunohistohemijskog bojenja.

Imunobojenje epitelnih ćelija na kaveolin-1 u ispitivanim tipovima tiroidnog kancera je zavisno od histotipa. Sa slike se može uočiti da je kaveolin-1 kod peritumorskog tkiva bio negativan. Epitelne ćelije folikularnog adenoma su bile negativne na kaveolin-1, dok je imunoreaktivnost uočena u stromalnim ćelijama. Kod klasičnog papilarnog karcinoma imunopozitivnost kaveolina-1 bila je intenzivna, dok je folikularna varijanta PTC pokazala umereno bojenje na kaveolin-1. Folikularni karcinom nije pokazao pozitivnu imunoekspresiju. Za razliku od tirocita, ćelije vaskularnog endotela su se intenzivno bojile na kaveolin-1 u svih 5 vrsta ispitivanih tkiva.



Slika 15. Mikrografije imunohistohemijskog bojenja na kaveolin-1 u peritumorskom tkivu i tumorima štitne žlezde. Strelice pokazuju imunopozitivnost na kaveolin-1. Uvećanje 10x.

Ekspresija je ocenjivana prema intenzitetu bojenja i to: 0 - odsustvo bojenja ili fokalna pozitivnost, 1 – slabo, 2 – umereno i 3 – jako citoplazmatsko bojenje. U **Tabeli 4** su sumirane ocene imunoreaktivnosti prema ispitivanim tipovima lezija.

Tabela 4. Ocene imunohistohemijskog bojenja na kaveolin-1 u peritumorskom tkivu i različitim tiroidnim tumorima.

Histotip tumora	Ocena imunoreaktivnosti				Ukupno
	0	1	2	3	
Benigni					
PT	23	13	5	1	42
FTA	17	3	0	0	20
Maligni					
PTC kl	1	7	7	3	18
PTC fv	7	7	3	1	18
FTC	8	3	2	0	13

Statistički značajna razlika (*Mann Whitney U test*, $p < 0,05$)
uočena između PT vs FTA, FTA vs PTC fv, PTC kl vs PTC fv

Ekspresija kaveolina-1 kod benignih tumora (folikularnih adenoma) je u 85% slučajeva bila negativna, dok su maligne lezije pokazale imunonegativnost u 32,7% slučajeva. U poređenju sa peritumorskim tkivom, gde je imunopozitivnost pokazalo 45,2% uzoraka, od čega je u oko 30% slučajeva uočena visoka ekspresija (ocene 2 i 3), folikularni adenomi su pokazali statistički značajno nižu ekspresiju kaveolina-1 (određeno *Mann Whitney U* testom, $p < 0,05$) sa samo 15% imunopozitivnih, od čega su svi bili slabog intenziteta bojenja (ocena 1). Folikularni adenomi su imali i statistički značajno manju imunopozitivnost na kaveolin-1 u poređenju sa PTC fv. Kod malignih lezija, najviša imunopozitivnost je uočena kod klasične varijante papilarnog tiroidnog karcinoma, gde je oko 95% uzoraka bilo pozitivno na kaveolin-1, od čega 58,8% sa intenzivnim bojenjem. Kod folikularne varijante papilarnog karcinoma, pozitivno bojenje je uočeno u statistički značajno manjem broju uzoraka nego u klasičnoj papilarnoj varijanti (određeno *Mann Whitney U* testom, $p < 0,05$), sa 61,1% imunopozitivnih, od čega 36,4% intenzivno obojenih. Folikularni karcinom je bio pozitivan samo u 38,5% slučajeva, ali ipak ne statistički značajno manje u poređenju sa PTC fv, kao ni FTA.

U cilju ispitivanja dijagnostičke moći imunodetekcije kaveolina-1 u postoperativnoj diferencijalnoj dijagnostici, odnosno ispitivanja osetljivosti i specifičnosti imunohistohemijskog bojenja na kaveolin-1, urađena je ROC analiza. Rezultati su sumirani u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Dijagnostičke performanse kaveolina-1 određene ROC analizom.

Poređene grupe	AUC	p	Cut-off	AUC posle cut-off-a	p	OS	SP	PPV	NPV	DT
FTA vs PT	0,662	0,041	1	0,651	<i>n.s.</i>	/	/	/	/	/
FTA vs FTC	0,629	<i>n.s.</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
FTA vs PTCfv	0,747	0,009	1	0,731	0,015	61,1%	85,0%	78,5%	70,8%	73,6%
FTC vs PTCfv	0,613	<i>n.s.</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
PTCfv vs PTCKl	0,735	0,016	1	0,667	<i>n.s.</i>	/	/	/	/	/
PTC vs FTC	0,720	0,020	1	0,697	0,037	77,8%	61,5%	84,8%	50,0%	73,5%
PTC vs Nemaligno	0,745	0,000	1	0,711	0,001	77,8%	64,5%	56,0%	83,3%	69,4%
FTC vs Nemaligno	0,522	<i>n.s.</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
Maligno vs Nemaligno	0,681	0,001	1	0,659	0,004	67,3%	64,5%	60,0%	71,4%	65,8%

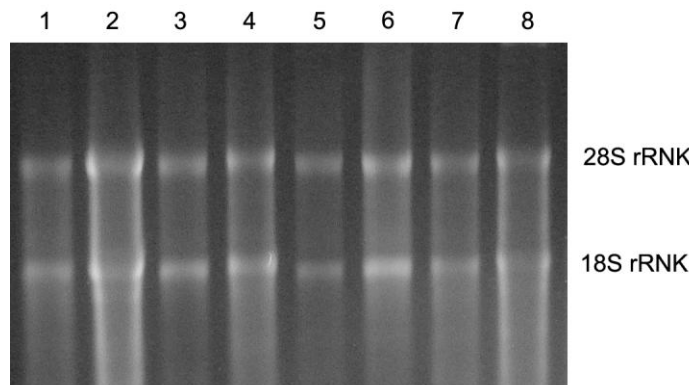
Statistička značajnost određena ROC analizom. AUC – površina ispod krive, OS – osetljivost, SP – specifičnost, PPV – pozitivna prediktivna vrednost, NPV – negativna prediktivna vrednost, DT – dijagnostička tačnost, *n.s.* – nema statističke značajnosti (od engl. *not significant*)

Cut-off vrednost je uvedena na oceni 1. ROC analiza je pokazala da je opšta dijagnostička moć imunotesta na kaveolin-1 srednjeg kapaciteta, jer površina ispod krive (AUC) nije prelazila 0,7. Najveću AUC i samim tim i najveću dijagnostičku tačnost je test pokazao kod poređenja FTA sa PTC fv (AUC=0,731; $p<0,05$; DT=73,6%). Nešto nižu AUC, ali sličnu dijagnostičku tačnost, test je pokazao u slučaju diskriminacije PTC i FTC (AUC=0,697; $p<0,05$; DT=73,5%). Ovde je izračunata visoka pozitivna prediktivna vrednost od 84,8%, što znači da ovaj marker oko 15% pacijenata sa FTC-om pogrešno dijagnostikuje kao PTC. Imunobojenje ukupnih malignih i nemalignih lezija na kaveolin-1 je bilo statistički značajno: AUC=0,659; $p<0,05$ i DT=65,8%. Iako posle uvođenja praga na tački 1 diskriminacija PTC kl od PTC fv nije bila statistički značajna, ove dve vrste lezije

se sa ocenama u rasponu od 0 do 3 mogu razlikovati sa solidnom diskriminatornom moći (AUC=0,735; p<0,05).

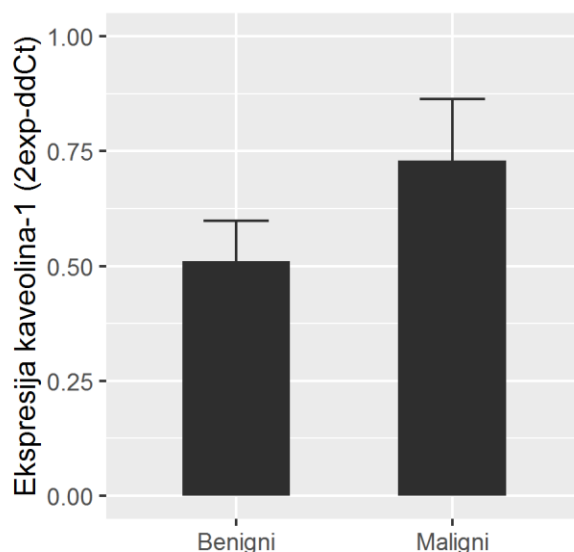
4.1.2. Ekspresija kaveolina-1 na mRNK nivou u uzorcima benignih i malignih tumora štitaste žlezde

Iz uzoraka svežih tkiva dobijenih posle operacije, izolovana je RNK korišćena za analizu genske ekspresije kaveolina-1. Kvalitet RNK je proveren agaroznom elektroforezom (**Slika 16**), a koncentracija RNK spektrofotometrijski. Sa slike se vide dve jasno razdvojene trake koje predstavljaju 28S i 18S podjedinicu ribozomalne RNK, što ukazuje da nije došlo do degradacije RNK u toku izolovanja.



Slika 16. Reprezentativni primer agarozne elektroforeze ukupne RNK izolovane iz svežeg tkiva štitne žlezde od osam pacijenata (1 – 8). Jasne trake za 28S i 18S podjedinice rRNA ukazuju na očuvanost RNK.

U analizu je uključeno 15 benignih i 35 malignih lezija, od čega 6 struma, 9 folikularnih adenoma, 13 papilarnih karcinoma klasične varijante, 17 papilarnih karcinoma folikularne varijante i 5 folikularnih karcinoma. Relativna ekspresija kaveolina-1 je izračunata korišćenjem ddCt metode i rezultati poređenja ekspresije u benignim i malignim uzorcima su sumirani na **Grafiku 2**.

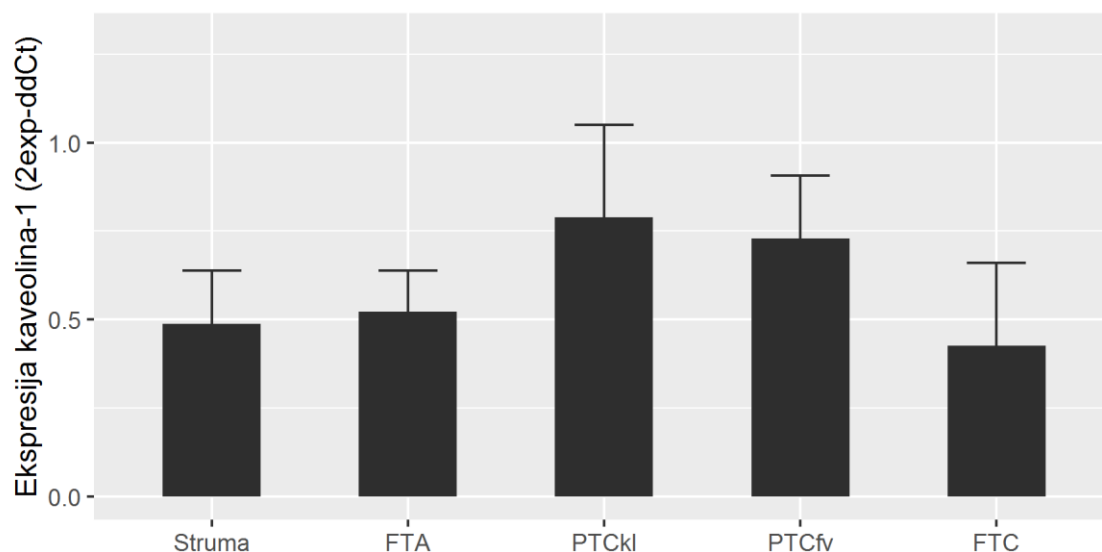


Grafik 2. Ekspresija kaveolina-1 na nivou mRNK u benignim i malignim uzorcima tumora štitne žlezde izračunata ddCt metodom. Rezultat predstavlja srednju vrednost ekspresije \pm SEM za svaku grupu.

Kod malignih vrsta tumora je detektovana viša ekspresija kaveolina-1, međutim ova razlika nije bila statistički značajna (Studentov t-test; $p > 0,05$).

Nivoi mRNK ekspresije kaveolina-1 su analizirani i kada su uzorci podeljeni prema histotipovima i na **Grafiku 3** je predstavljena relativna ekspresija kaveolina-1 prema ovim grupama.

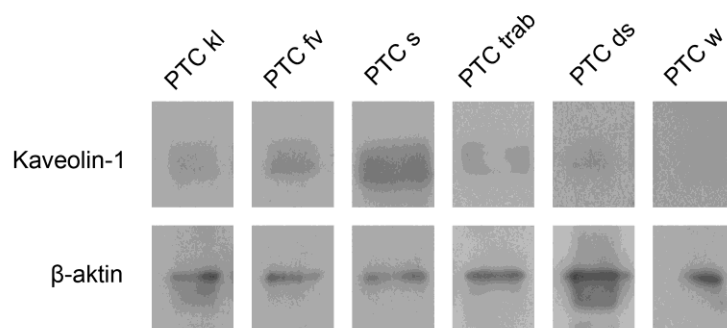
Kaveolin-1 je najviše eksprimiran u papilarnom karcinomu, i to više u klasičnoj nego folikularnoj varijanti. U folikularnim adenomima je detektovana niža ekspresija nego u PTC, ali opet viša u odnosu na FTC i strume. Uzorci iz grupe FTC su imali najnižu ekspresiju kaveolina-1. Nijedna od ovih razlika u ekspresiji nije bila statistički značajna (Studentov t-test, $p > 0,05$).



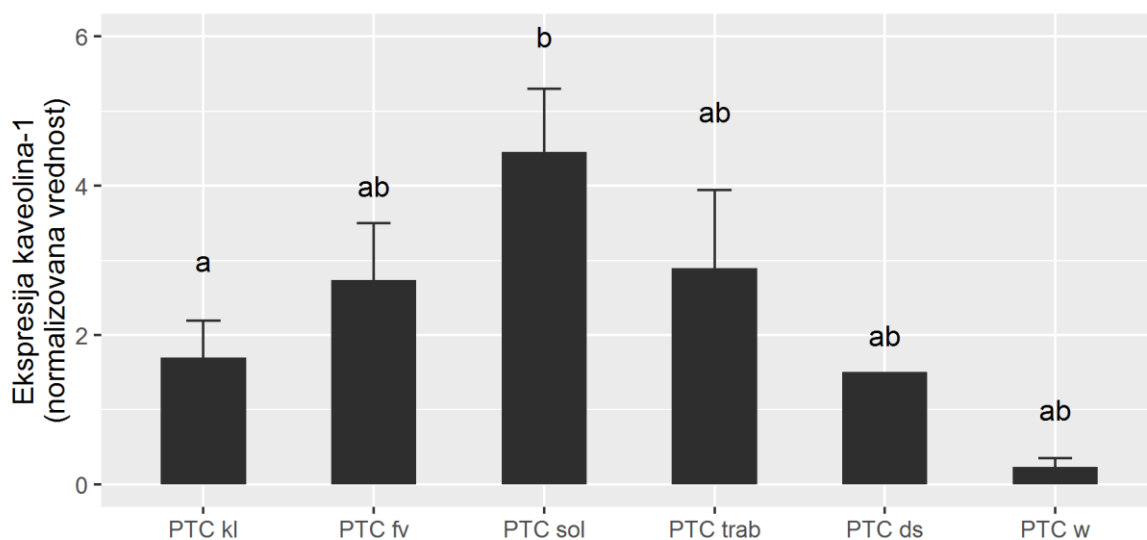
Grafik 3. Ekspresija kaveolina-1 na nivou mRNK u različitim lezijama tiroidne žlezde izračunata ddCt metodom. Rezultat predstavlja srednju vrednost ekspresije ± SEM za svaku grupu.

4.1.3. Ekspresija kaveolina-1 na proteinskom nivou u papilarnom tiroidnom karcinomu

Tkivni lizati dobijeni izolovanjem proteina RIPA puferom iz svežih postoperativnih uzoraka su korišćeni za analizu. Histotipovi PTC koji su ušli u analizu uključivali su 16 klasičnih, 12 folikularnih, 15 solidnih, 3 trabekularna, 1 difuzno – sklerozni i 2 *Warthin-like* tipa papilarnih karcinoma. **Slika 17** prikazuje reprezentativan rezultat imunoblota, a **Grafik 4** ekspresiju kaveolina-1 dobijenu denzitometrijskom kvanifikacijom signala svih uzoraka sa imunoblota i normalizacijom na *loading* kontrolu.



Slika 17. Reprezentativni uzorci analize ukupne ekspresije kaveolina-1 u različitim histotipovima papilarnog tiroidnog karcinoma određene imunoblotom u postoperativnom tkivu štitne žlezde. β -aktin je korišćen kao *loading* kontrola.



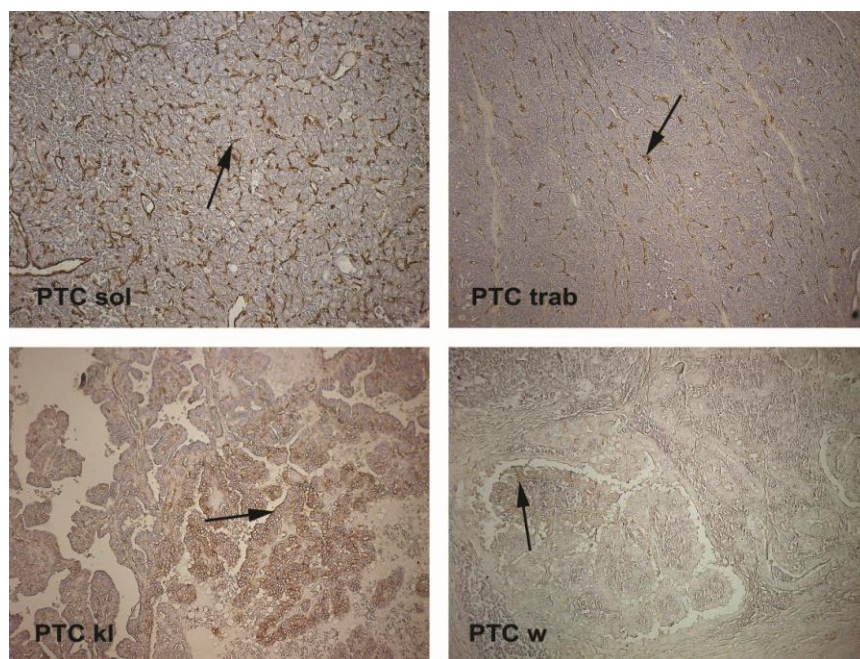
Grafik 4. Ekspresija ukupnog kaveolina-1 u različitim histotipovima papilarnog tiroidnog karcinoma određena denzitometrijskom analizom rezultata imunoblota, normalizovana na β -aktin. Rezultati prikazuju srednju vrednost grupe \pm SEM. Grupe koje ne dele isto slovo pokazuju statistički značajnu razliku u ekspresiji ($p < 0,05$; *Mann Whitney U* test).

Sa slike imunoblota se vidi da su za približno jednaku količinu ($15\mu\text{g}$) proteina nanetu u svim uzorcima detektovani različiti nivoi kaveolina-1 u različitim varijantama PTC. Denzitometrijska analiza je pokazala najveću ukupnu ekspresiju kod solidnog podtipa papilarnog karcinoma, kod kog je ekspresija bila statistički značajno viša nego kod klasične varijante PTC-a ($p=0,009$; *Mann Whitney U* test). Rezultati denzitometrijskog merenja su

za potrebe poređenja ekspresije po varijantama PTC normalizovani u odnosu na solidni tip PTC koji je uzet kao 100%. Kada su grupe poređane po rastućoj ekspresiji, rezultati pokazuju da je kaveolin-1 najniže eksprimiran u *Warthin-like* PTC (5,3%), zatim u difuzno-skleroznoj varijanti PTC-a (33,9%) i klasičnoj varijanti PTC (40,9%), dok su folikularna i trabekularna varijanta PTC-a imale veoma sličnu ekspresiju (61,6% i 64,9%, redom).

4.1.4. Tkivna distribucija kaveolina-1 u papilarnom tiroidnom karcinomu

U prethodno opisanom eksperimentu je određena ukupna ekspresija kaveolina-1, koja potiče ne samo od tirocita, nego i od ćelija strome, stoga je u sledećem koraku bliže ispitana raspodela ekspresije u tkivu. S tim ciljem smo imunohistohemijski ocenjivali bojenje kaveolina-1 posebno u tireocitima, a posebno u stromi tumora. Reprezentativni primeri različitih podtipova PTC bojenih na kaveolin-1 su prikazani na **Slici 18**.



Slika 18. Mikrografije imunohistohemijskog bojenja kaveolina-1 u različitim varijantama papilarnog karcinoma. Strelice pokazuju imunopozitivnost na kaveolin-1. Uvećanje 10x.

Epitelno bojenje kaveolina-1 je bilo najjače kod klasične varijante PTC, kod koje je u stromalnim ćelijama uočeno slabo bojenje ili izostanak imunopozitivnosti. Solidni i

trabekularni podtipovi PTC su pokazali duplo jaču imunopozitivnost u stromalnom odeljku u poređenju sa epitelnim, dok je kod *Warthin-like* tipa PTC kaveolin-1 bio slabo pozitivan u stromi, a negativan u tirocitima. Ocene imunoekspresije kaveolina-1 u stromi i epitelu različitih podtipova PTC su date u **Tabeli 6**, a ukupna imunoreaktivnost kaveolina-1 prema ovim odeljcima je prikazana na **Grafiku 5**.

Tabela 6. Ocene imunohistohemijskog bojenja kaveolina-1 u epitelu i stromi različitih varijanti papilarnog karcinoma.

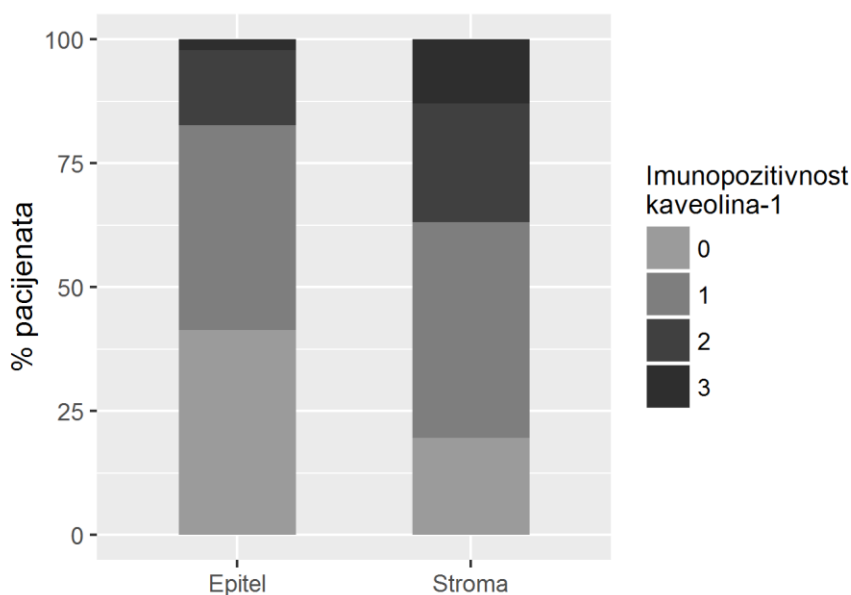
	PTC podtip	Broj slučajeva	Ocena				Srednja ocena
			0	1	2	3	
Epitel	PTC kl	13	2	7	3	1	1,23
	PTC fv	12	5	3	4	0	0,92
	PTC s	15	8	7	0	0	0,47
	PTC trab	3	1	2	0	0	0,67
	PTC ds	1	1	0	0	0	0
	PTC w	2	2	0	0	0	0
	Ukupno		46				
Stroma	PTC kl	13	7	5	1	0	0,54
	PTC fv	12	0	5	3	4	1,92
	PTC s	15	1	7	5	2	1,53
	PTC trab	3	0	1	2	0	1,67
	PTC ds	1	0	1	0	0	1
	PTC w	2	1	1	0	0	0,5
	Ukupno		46				

Ocene: 0 - odsustvo bojenja ili fokalna pozitivnost, 1 – slabo, 2 – umereno i 3 – jako bojenje epitelnih ili stromalnih ćelija. Razlike između grupa su analizirane *Mann Whitney U* testom: epitel, *p< 0,05 za PTC kl vs PTC sol, stromalno, *p< 0,05 za PTC kl vs PTC fv, PTC kl vs PTC sol.

Epitelni odeljak je ukupno imao nižu srednju ocenu bojenja od stromalnog (0,78 epitel, 1,30 stroma). Isto tako, stromalno i epitelno bojenje je bilo različito i u okviru istog histotipa, pa je u slučaju PTC ds i PTC w kaveolin-1 detektovan samo u stromalnom

odeljku. Najvišu ekspresiju kaveolina-1 u epitelu su pokazali slučajevi iz grupe PTC kl, a zatim PTC fv. Statistički značajno niža ekspresija u poređenju sa PTC kl je detektovana kod PTC s (*Mann Whitney U test, p<0,05*). Uopšteno gledano, ekspresija kaveolina-1 u epitelu je opadala po sledećem redosledu: PTC kl, PTC fv, PTC trab, PTC s, sa potpunim izostankom ekspresije kod PTC ds i PTC w.

Stromalni kompartman je pokazao drugačiju raspodelu ekspresije kaveolina-1. Najveći intenzitet bojenja je detektovan kod PTC fv, što je bilo statistički značajno veće nego kod PTC kl (*Mann Whitney U test, p<0,05*). Uzorci iz grupe PTC s su takođe imali statistički značajno višu ekspresiju stromalnog kaveolina-1 u poređenju sa PTC kl (*Mann Whitney U test, p<0,05*). Visoka ekspresija kaveolina-1 u stromi je detektovana i kod PTC trab, a veoma niska kod PTC w. Difuzno-sklerozna varijanta PTC je pokazala umerenu imunoreaktivnost kaveolina-1 u stromi.



Grafik 5. Imunoreaktivnost epitelnog i stromalnog odeljka na kaveolin-1 u uzorcima papilarnih tiroidnih karcinoma, prikazana kao procentualni udeo pacijenata (n=46) sa datom ocenom u svakom odeljku.

Ukupna imunoreaktivnost kaveolina-1 u epitelnom i stromalnom odeljku se razlikuje prema tkivnim kompartmanima, što se vidi sa **Grafika 5**. Procenat pacijenata sa negativnim epitelnim bojenjem (41,3%) je bio dvostruko veći od procenta pacijenata sa

negativnim stromalnim bojenjem (19,6%). Jaka imunopozitivnost u stromalnom delu je detektovana u 13% pacijenata, nasuprot imunobojenja u epitelu koji je u 2,1% pokazao jaku imunopozitivnost.

Ispitana je korelacija ukupne ekspresije kaveolina-1 (imunoblot) (Poglavlje 4.1.3.) sa ekspresijom u epitelnom i stromalnom odeljku (imunohistohemija) (**Tabela 7**).

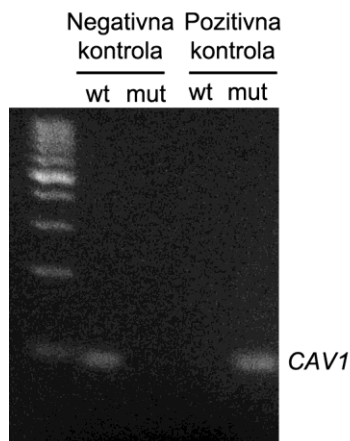
Tabela 7. Međusobne asocijacije ukupne, stromalne i epitelne ekspresije kaveolina-1 u postoperativnom tkivu štitne žlezde.

	Stromalni kaveolin-1		Ukupni kaveolin-1	
	Spearman's ρ	p	Spearman's ρ	p
Epitelni kaveolin-1	-0,004	0,979	0,03	0,847
Ukupni kaveolin-1	0,311	0,038	/	/

Poređenje ukupne ekspresije kaveolina-1 sa imunoreaktivnošću u stromalnom i epitelnom odeljku, ukazuje na pozitivnu korelaciju ukupnog i stromalnog kaveolina-1. Sa druge strane, ekspresija u epitelu nije pokazala statistički značajnu korelaciju sa ukupnim kaveolinom-1. Korelacija između stromalnog i epitelnog odeljka takođe nije bila statistički značajna. Ipak, zapažen je negativan trend, odnosno niža ekspresija u stromi se poklapala sa višom epitelnom ekspresijom. Ovo ukazuje da je kaveolin-1 inverzno ekspresiran u stromalnom i epitelnom odeljku.

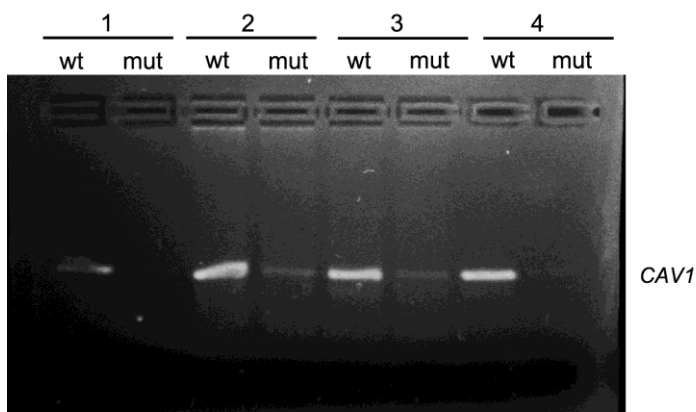
4.1.5. Detekcija CAVI P132L mutacije u benignim i malignim tumorima tiroidee

CAVI P132L mutacija detektovana je alel-specifičnim PCR-om. Kao pozitivna i negativna kontrola su korišćeni plazmidi sa, odnosno bez P132L mutacije (**Slika 19**).



Slika 19. Alel – specifična PCR detekcija *CAV1* P132L mutacije u plazmidima sa *CAV1* *wild type* (negativna kontrola) i *CAV1* P132L genotipom (pozitivna kontrola). wt – *wild type*, mut - mutant

U analizu je uključeno ukupno 83 uzorka, 68 malignih lezija (19 papilarnih karcinoma klasične varijante, 33 papilarna karcinoma folikularne varijante, 4 *Hürtle* karcinoma, 6 retkih papilarnih karcinoma (solidne, insularne ili trabekularne varijante PTC), 3 folikularna karcinoma, 2 anaplastična karcinoma i 1 medularni karcinom) i 15 nemalignih (5 struma, 9 folikularnih i 1 *Hürtle* adenom). Reprezentativni uzorci su prikazani na **Slici 20**.



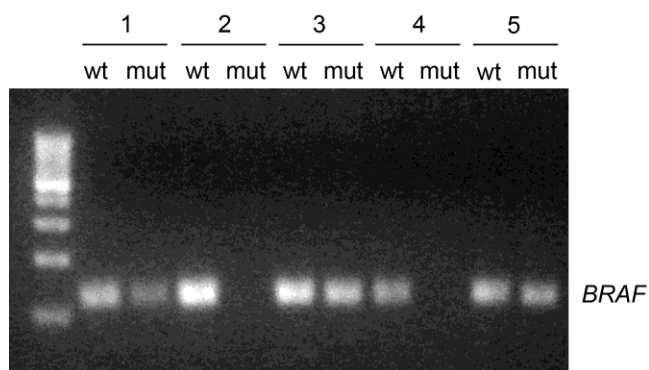
Slika 20. Alel – specifična PCR detekcija *CAV1* P132L mutacije u reprezentativnim uzorcima (1 – 4) postoperativnog tkiva štitne žlezde. wt – *wild type*, mut - mutant

Sa slike gela se može videti da je uzorak 1 imao *wild type* genotip, dok se u ostalim uzorcima uočava signal u koloni za mutantni proizvod, što govori o prisustvu *CAVI* P132L mutacije u ovim uzorcima.

Mutacije su detektovane u ukupno 6 uzoraka (6/83; 7,2%), od čega 5 kod malignih tumora (5/68; 7,4%) i jedna kod benignih tumora štitne žlezde (1/15; 6,7%). Kod tumorskih mutacija, jedna je detektovana u karcinomu *Hürtle* tipa, jedna u klasičnoj varijanti papilarnog karcinoma, 3 kod folikularne varijante papilarnog karcinoma, jedna u *Hürtle* adenomu i jedna u *Hürtle* karcinomu. Navedeni rezultati ukazuju da je frekvencija *CAVI* P132L mutacije u tiroidnim karcinomima previše niska da bi se mogla koristiti u dijagnostičke svrhe.

4.1.6. Detekcija *BRAF* V600E mutacije u papilarnom tiroidnom karcinomu

Uzorci papilarnog karcinoma u kojima je određena ekspresija kaveolina-1, genotipizirani su na *BRAF* V600E mutaciju alel-specifičnim PCR-om. Reprezentativni uzorci su prikazani na **Slici 21**.



Slika 21. Alel – specifična PCR detekcija *BRAF* V600E mutacije u reprezentativnim uzorcima (1 – 5) postoperativnog tkiva papilarnih karcinoma štitne žlezde. wt – *wild type*, mut - mutant

Od ukupno 49 ispitivanih papilarnih karcinoma, mutacija je detektovana u 13 PTC kl, 2 PTC fv, 1 PTC ds i 1 PTC w (**Tabela 8**).

Tabela 8. Učestalost *BRAF* V600E mutacije u papilarnim tiroidnim karcinomima.

PTC podtip	Broj slučajeva	<i>BRAF</i> V600E	Frekvencija %
PTC kl	16	13	81,2
PTC fv	12	2	16,7
PTC s	15	0	0
PTC ds	1	1	100
PTC w	2	1	50
PTC trab	3	0	0
Ukupno	49	17	35

Učestalost *BRAF* mutacije u papilarnom karcinomu je iznosila 35%, ali ako izuzмено grupe koje imaju manje od 5 slučajeva (PTC ds, PTC w i PTC trab), učestalost u preostalim varijantama PTC-a iznosi 34,9%. Grupa sa najvećom učestalošću mutacija je bila PTC kl (81,2%).

Analizom asocijacije *BRAF* statusa i kliničko-patoloških parametara, otkrivene su značajne pozitivne korelacije sa pT statusom, prisustvom limfnih nodalnih metastaza i dubinom neoplastične infiltracije (**Tabela 9**).

Tabela 9. Asocijacija *BRAF* V600E mutacije sa kliničko–patološkim parametrima papilarnih karcinoma.

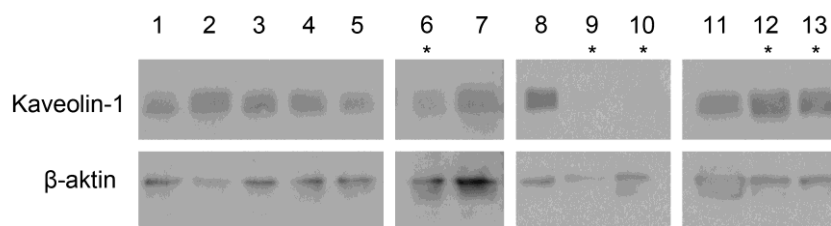
<i>Spearman's test</i>	pT status	Limfne nodalne metastaze	Dubina neoplastične infiltracije	Intraglandularna diseminacija
<i>BRAF</i>	ρ 0,426**	0,514**	0,724**	0,178
V600E	p 0,003	0,000	0,000	0,226
	N 48	48	42	48

Boldovane vrednosti označavaju statistički značajne korelacije.

**Korelacije su značajne na nivou $\alpha=0,01$

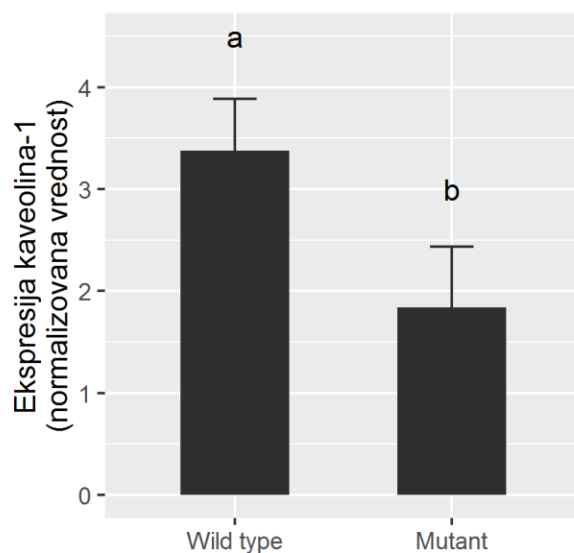
4.1.7. Promena ekspresije kaveolina-1 u odnosu na *BRAF* V600E mutacioni status

Pacijenti sa dijagnozom PTC-a su podeljeni u dve grupe: *BRAF* wt i *BRAF* V600E i za svakog pacijenta su uzete vrednosti ekspresije kaveolina-1 dobijene denzitometrijskom analizom rezultata imunoblota. Na **Slici 22** su prikazani reprezentativni imunoblotovi za pojedinačne slučajeve.



Slika 22. Reprezentativni rezultati imunoblot analize ekspresije kaveolina-1 kod trinaest pacijenata sa i bez *BRAF* mutacije (1 – 13). Zvezdica označava uzorke pozitivne na *BRAF* V600E. β -aktin je korišćen kao *loading* kontrola.

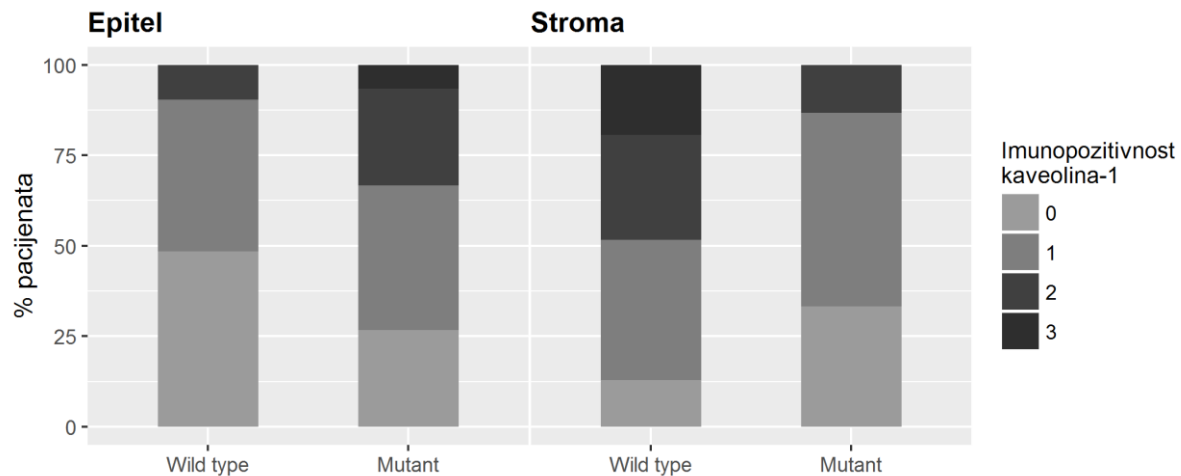
Kod uzoraka sa *BRAF* V600E mutacijom (uzorci 6, 9, 10, 12 i 13) nivoi kaveolina-1 su kod dva uzorka bili gotovo nemerljivi (uzorci 9 i 10), dok su u uzorcima sa *wild type* genotipom, detektovane veće količine ovog proteina (uzorci 1-5 i 7, 8, 11). Relativna ekspresija kaveolina-1, određena denzitometrijski, podeljena je na grupe prema *BRAF* genotipu i srednja vrednost svake grupe je prikazana na **Grafiku 6**.



Grafik 6. Ekspresija kaveolina-1 normalizovana na β -aktin određena denzitometrijskom analizom imunoblota u pacijentima podeljenim prema *BRAF* V600E mutacionom statusu. Rezultati prikazuju srednju vrednost grupe \pm SEM. Različita slova iznad stubova označavaju statistički značajnu razliku između grupa ($p < 0,05$; *Mann Whitney U* test).

Ukupna ekspresija kaveolina-1 je bila veća kod uzoraka PTC koji nisu imali *BRAF* V600E mutaciju u poređenju sa uzorcima pozitivnim na ovu mutaciju i ovo je bilo statistički značajno (*Mann Whitney U* test, $p < 0,05$).

Na **Grafiku 7** su prikazani nivoi kaveolina-1 određeni imunohistohemijom u epitelnom i stromalnom odeljku kod uzoraka sa i bez V600E mutacije.



Grafik 7. Stromalna i epitelna ekspresija kaveolina-1 u *BRAF wild type* i V600E uzorcima određena imunohistohemijom bojenjem.

Ekspresija kaveolina-1 u epitelnim ćelijama je veća kod pacijenata koji imaju *BRAF* V600E mutaciju nego kod *wild type* *BRAF* genotipa, gde je oko 50% uzoraka bilo negativno na kaveolin-1, što je dvostruko više nego kod mutantnih uzoraka. Suprotno tome, u stromalnim ćelijama kaveolin-1 je više eksprimiran u *wild type* (preko 80%) uzorcima, nego u *BRAF* V600E pozitivnim (oko 65%).

4.1.8. Prognostički potencijal kaveolina-1 kao markera agresivnosti karcinoma štitne žlezde

U cilju određivanja prognostičkog potencijala kaveolina-1, ispitana je asocijacija nivoa ovog proteina određena imunoblotom i imunohistohemijom sa kliničko-patološkim faktorima. *BRAF* V600E mutacija je uvrštena kao dodatni pokazatelj karaktera maligniteta. Rezultati su sumarno prikazani u **Tabeli 10**.

Ukupna ekspresija kaveolina-1 negativno korelira sa prisustvom hroničnog limfocitnog tiroiditisa (*Spearman* test, $\rho=-0,353$; $p<0,05$) i prisustvom *BRAF* V600E mutacije (*Spearman* test, $\rho=-0,327$; $p<0,05$). Nivoi kaveolina-1 u epitelu su u pozitivnoj korelaciji sa pojavom limfnih nodalnih metastaza (*Spearman* test, $\rho=0,299$; $p<0,05$). Stromalni kaveolin-1 je u negativnoj korelaciji sa prisustvom *BRAF* V600E mutacije (*Spearman* test, $\rho=-0,375$; $p<0,05$), kao i sa dubinom neoplastične infiltracije (*Spearman* test, $\rho=-0,339$; $p=0,01$).

Tabela 10. Povezanost ukupne, epitelne i stromalne ekspresije kaveolina-1 sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom tiroidee.

Kliničko – patološki parametri	Ukupno	Western blot		Imunohistohemija							
		Ukupni kav-1 ±SEM	Spearman's		Epitelni kav-1		Stromalni kav-1		Srednja vrednost ±SEM	Spearman's	
			ρ	P	Srednja vrednost ±SEM	ρ	P	ρ		P	
1. Godine											
< 45 god	19	2,66±0,53	0,012	0,936	0,89±0,20	-0,099	0,513	1,47±0,22	-0,160	0,288	
≥ 45 god	30	2,96±0,54			0,70±0,14			1,19±0,18			
2. Pol											
Muški	14	2,95±0,58	0,125	0,394	0,79±0,19	0,031	0,839	1,21±0,30	-0,070	0,646	
Ženski	35	2,80±0,49			0,78±0,15			1,34±0,15			
3. Veličina tumora [mm]											
≤ 20	11	2,85±0,84	0,125	0,392	0,73±0,27	0,031	0,838	0,91±0,29	0,286	0,054	
20 do 40	19	2,02±0,36			0,84±0,19			1,32±0,22			
> 40	19	3,67±0,77			0,75±0,17			1,56±0,22			
4. pT status											
pT1	4	3,05±0,41	0,049	0,736	0,25±0,25	0,156	0,300	1,25±0,63	-0,058	0,702	
pT2	18	2,12±0,46			0,88±0,23			1,41±0,24			
pT3	22	3,23±0,69			0,71±0,14			1,29±0,18			
pT4	5	3,61±1,54			1,25±0,48			1,00±0,58			
5. Intraglandularna diseminacija											
Pristna	21	2,69±0,58	-0,087	0,550	0,76±0,17	-0,012	0,935	1,10±0,19	-0,215	0,150	
Odsutna	28	2,96±0,52			0,80±0,16			1,48±0,19			
6. Limfne nodalne metastaze											
Prisutne	10	2,96±0,81	0,075	0,608	1,25±0,25	0,299	0,044*	0,88±0,30	-0,203	0,176	
Odsutne	39	2,82±0,44			0,68±0,13			1,39±0,15			
7. Dubina neoplastične infiltracije											
A	6	1,60±0,34	-0,250	0,106	0,80±0,20	0,265	0,098	2,00±0,32	-0,339	0,033*	
B	11	3,70±0,79			0,40±0,22			1,30±0,30			
C	12	1,82±0,53			0,75±0,31			1,00±0,21			
D	14	2,07±0,66			1,08±0,18			0,92±0,27			
8. Hronični limfocitni tiroiditis											
Prisutan	6	0,98±0,44	-0,353	0,015*	0,83±0,31	0,023	0,855	0,83±0,17	-0,223	0,145	
Odsutan	41	3,20±0,43			0,82±0,13			1,42±0,16			
9. BRAF mutacioni status											
Wild type	32	3,34±0,49	-0,327	0,022*	0,61±0,12	0,285	0,055	1,55±0,17	-0,375	0,010*	
Mutant	17	1,91±0,56			1,13±0,24			0,80±0,18			

Kategorije za pT status i dubina neoplastične infiltracije definisane su u Materijalu i metodama.
 Boldovane vrednosti označavaju statistički značajne korelacije.
 *Korelacija značajna na nivou $\alpha=0,05$

4.2. Ispitivanje odabranih biomarkera u preoperativnim uzorcima tumora štitne žlezde

Do sada prikazani rezultati ove disertacije ukazuju na mogućnost upotrebe kaveolina-1 i *BRAF* V600E mutacije u postoperativnoj dijagnostici i prognostici. Naredni korak je bio testiranje ovih markera u preoperativnoj dijagnostici. Preoperativni uzorci dobijeni su FNA biopsijom od pacijenata koji su imali indikacije za operaciju. Dodatno, od istih pacijenata su prikupljeni podaci o hormonskom statusu i auto-antitelima. U uzorcima biopsije je određena proteinska ekspresija kaveolina-1, kao i frekvencija četiri genska markera određenih na nivou DNK ili RNK: *BRAF* V600E mutacije, hromozomskih rearanžmana *RET/PTC1* i *RET/PTC3*, i EGFRvIII mutacije EGFR receptora. Svi pacijenti su potom bili operisani, te su dobijene finalne patohistološke dijagnoze koje su korišćene za proveru tačnosti navedenih markera.

4.2.1. Citološka analiza uzoraka sa FNA biopsije

Od FNAB uzoraka su pripremljeni HE preparati za patocitološku analizu. Nodusi su klasifikovani prema Betesda klasifikaciji za preoperativnu dijagnostiku nodusa štitne žlezde u sledeće kategorije: 88 nedijagnostičkih – prva kategorija, 114 benignih – druga kategorija, 30 atipija neodređenog značaja/folikularnih lezija neodređenog značaja – treća kategorija, 27 folikularnih neoplazija – četvrta kategorija, 14 sumnjivih na malignitet – peta kategorija i 1 maligni FNAB uzorak – šesta kategorija. Nedijagnostički uzorci su izostavljeni iz daljih analiza.

Prema finalnim histopatološkim dijagnozama u ovu studiju je uključeno 148 uzoraka benignih lezija, od kojih: 120 struma, 23 folikularna adenoma i 5 *Hürtle* adenoma, i 126 uzoraka malignih lezija, od kojih: 103 papilarna karcinoma, 3 folikularna karcinoma, 12 *Hürtle* karcinoma, 7 medularnih karcinoma i 1 anaplastični karcinom.

4.2.2. Analiza hormona i proteinskih markera u serumu pacijenata sa indikacijom za operaciju štitne žlezde

Za potrebe ove studije, sakupljeni su podaci o nivoima sledećih hormona povezanih sa funkcijom štitne žlezde: tirostimulirajuću hormon (TSH), trijodtironin i slobodni

trijodtironin (T3 i FT3), tiroksin i slobodni tiroksin (T4 i FT4), paratiroidni hormon (PTH), kalcitonin, tiroglobulin (TG), kao i sledećih auto-antitela: anti-tiroglobulinska antitela (A-TG), antitela na tiroidnu peroksidazu (A-TPO) i anti-TSH receptorska antitela (A-TSH-R). Prema referentnom opsegu za svaki serumski marker, pacijenti su podeljeni u grupe sa niskim, normalnim i visokim vrednostima za dati marker.

Mann Whitney U i *Fisher*-ovim testom je ispitano da li se nivoi markera statistički značajno razlikuju između benignih i malignih gupa pacijenata (**Tabela 11**).

Statistički značajna razlika između benignih i malignih uzoraka je utvrđena samo kod nivoa hormona T3. Kod ovog serumskog parametra, sličan procenat pacijenata sa normalnim nivoima je uočen i kod benigne i maligne grupe (89% i 91,1%, redom), međutim kod malignih uzoraka je uočen veći procenat niskih nivoa (7,6% nasuprot 3,7% kod benignih), dok je kod benignih uzoraka uočen veći procenat pacijenata sa nivoom T3 koji prelazi referentni opseg (7,3% u poređenju sa 1,3% kod malignih). Međutim zbog malog broja pacijenata kod kojih su pokazani nivoi T3 izvan referentnog opsega (deset pacijenata sa niskim i devet sa visokim nivoima T3), ovaj marker nije ušao u dalju analizu. Nivoi drugih hormona, kao i nivoi svih auto-antitela, se nisu značajno razlikovali između pacijenata sa benignim i malignim tumorima štitne žlezde.

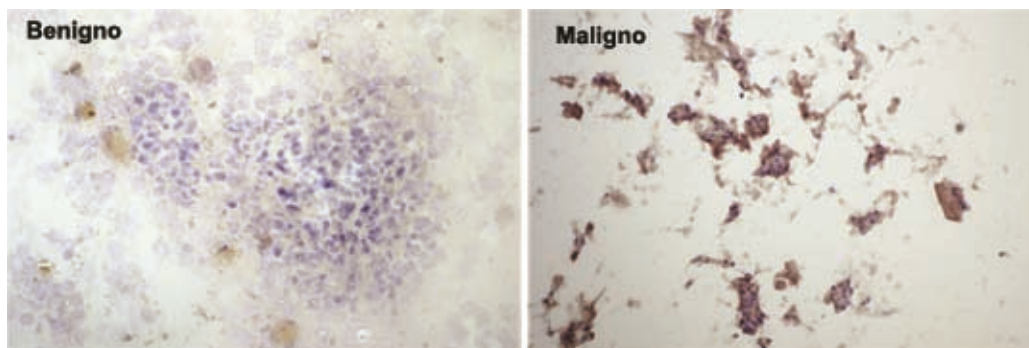
Tabela 11. Poređenje nivoa hormona i serumskih proteinskih markera u benignim i malignim FNAB uzorcima lezija štitne žlezde.

Parametar	Referentni opseg	Nivoi	Benigno (%)	Maligno (%)	p-vrednost
TSH	0,27-4,20 mIU/L	Nizak	12,9	6,8	0,134
		Normalan	84,2	89,7	
		Visok	2,9	3,4	
T3	1,30-3,10 nmol/L	Nizak	3,7	7,6	0,034
		Normalan	89,0	91,1	
		Visok	7,3	1,3	
T4	66,0-181,00 nmol/L	Nizak	2,0	2,4	0,861
		Normalan	97,0	97,6	
		Visok	1,0	0,0	
FT3	3,10-6,80 pmol/L	Nizak	6,3	13,8	0,322
		Normalan	93,8	86,2	
FT4	12,00-22,00 pmol/L	Nizak	20,0	23,8	0,920
		Normalan	80,0	72,3	
		Visok	0,0	4,0	
PTH	15,00-65,00 pmol/L	Nizak	10,8	14,1	0,261
		Normalan	60,8	65,6	
		Visok	28,4	20,3	
Kalcitonin	0,00-6,40 ng/L	Normalan	89,5	84,3	0,379
		Visok	10,5	15,7	
TG	0,00-78,00 µg/L	Normalan	50,0	54,0	0,738
		Visok	50,0	46,0	
A-TG	0,00-115,00 kIU/L	Normalan	84,4	91,0	0,239
		Visok	15,6	9,0	
A-TPO	0,00-34,00 kIU/L	Normalan	68,3	71,1	0,743
		Visok	31,7	28,9	
A-TSH-R	0,00-1,30 IU/L	Normalan	89,5	91,2	1,000
		Visok	10,5	8,8	

Razlike između grupa su određene *Mann Whitney U* testom ili *Fišerovim* testom u zavisnosti od vrste varijable. Boldovane vrednosti označavaju statistički značajne razlike na nivou $\alpha=0,05$. TSH – tirostimulišući hormon, T3 – trijodotironin, T4 – tiroksin, FT3 – slobodni trijodtironin, FT4 – slobodni tiroksin, PTH – paratiroidni hormon, TG - tiroglobulin, A-TG – anti-tiroglobulinska antitela, A-TPO – antitela na tiroidnu peroksidazu, A-TSH-R – anti-TSH receptorska antitela.

4.2.3. Analiza proteinske ekspresije kaveolina-1 u uzorcima FNA biopsije

Preparati pripremljeni citospinom uzoraka FNA biopsije su obojeni imunocitohemijski na prisustvo kaveolina-1. Ekspresija kaveolina-1 je ocenjivana sa 0 – odsustvo bojenja i 1 – prisutvo bojenja na kaveolin-1. Primeri imunocitohemijskog bojenja kod benignih i malignih lezija tiroidne žlezde su prikazani na **Slici 23**.



Slika 23. Mikrografije ekspresije kaveolina-1 u citospin preparatima benignih i malignih FNAB uzoraka. Uvećanje 20x.

U benignim uzorcima FNAB tirociti se ne boje na kaveolin-1, dok je bojenje makrofaga slabo do umereno. Reprezentativan primer malignog uzorka prikazuje intenzivno bojenje citoplazme folikularnih ćelija štitne žlezde. Sumirani rezultati bojenja imunoekspresije kaveolina-1 su prikazani u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Ekspresija kaveolina-1 u benignim i malignim FNAB uzorcima određena imunocitohemijom.

Kaveolin-1	Benigni	Maligni	p-vrednost
Negativan	35	24	0,021
Pozitivan	18	32	

Razlike između grupa su određene *Fisher exact* testom.
Boldovana vrednost označava statistički značajnu razliku.

Ekspresija kaveolina-1 je bila viša kod malignih FNAB uzoraka nego kod benignih i razlika je bila statistički značajna (*Fisher exact* test, $p < 0,05$).

4.2.4. Analiza genetičkih markera u uzorcima sa FNA biopsije

Na nivou DNK i RNK ispitano je prisustvo četiri genetička markera tiroidnog karcinoma i to: *BRAF* V600E mutacije, hromozomskih rearanžmana *RET/PTC1* i *RET/PTC3*, i EGFRvIII mutacije. Frekvencija mutacija je data u **Tabeli 13**.

Tabela 13. Frekvencija *BRAF* V600E mutacije, EGFRvIII mutacije i *RET/PTC1*, *RET/PTC3* rearanžmana u preoperativnim uzorcima lezija štitne žlezde.

Parametar	Genotip	Benigno (%)	Maligno (%)	p-vrednost
<i>BRAF</i> V600E	<i>Wild type</i>	98,5	81,8	0,001
	Mutant	1,5	18,2	
EGFRvIII	<i>Wild type</i>	92,3	84,2	0,629
	Mutant	7,7	15,8	
<i>RET/PTC 1</i>	<i>Wild type</i>	96,8	95,7	1,000
	Mutant	3,2	4,3	
<i>RET/PTC 3</i>	<i>Wild type</i>	91,9	92,8	1,000
	Mutant	8,1	7,2	

Razlike između grupa su određene *Fisher exact* testom. Boldovane vrednosti označavaju statistički značajne razlike.

Fisher-ovim testom je pokazano da se samo frekvencija *BRAF* V600E mutacije statistički značajno razlikuje između malignih i benignih pacijenata ($p < 0,01$).

Dodatno su ispitane asocijacije između genetičkih markera i rezultati su sumirani u **Tabeli 14**.

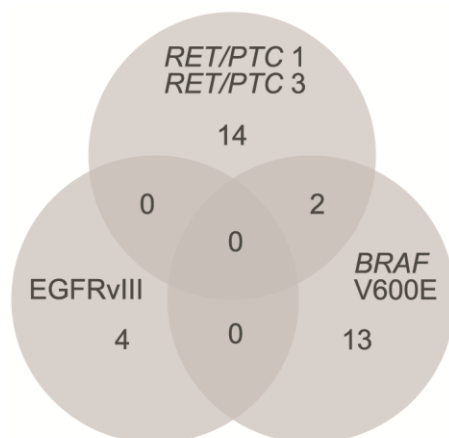
Tabela 14. Međusobne korelacije genetičkih markera.

Parametar	<i>Spearman's</i> test	<i>BRAF</i> V600E	<i>RET/PTC1</i>	<i>RET/PTC3</i>	<i>EGFRvIII</i>
<i>BRAF V600E</i>	ρ	/	0,127	0,004	-0,196
	p	/	0,201	0,965	0,299
	N	/	103	103	30
<i>RET/PTC1</i>	ρ	0,127	/	0,393**	/
	p	0,201	/	0,000	/
	N	103	/	131	/
<i>RET/PTC3</i>	ρ	0,004	0,393**	/	-0,105
	p	0,965	0,000	/	0,581
	N	103	131	/	30
<i>EGFRvIII</i>	ρ	-0,196	/	-0,105	/
	p	0,299	/	0,581	/
	N	30	/	30	/

Boldovane vrednosti označavaju statistički značajne korelacije.

**Korelacije značajne na $\alpha=0,01$ nivou

Značajne korelacije su potvrđene samo između *RET/PTC1* i 3 mutacija, međutim, iako nije pokazana statistička značajnost, *EGFRvIII* mutacija je pokazala negativan trend povezanosti sa ostalim mutacijama. Na Venovom dijagramu (**Grafik 8**) je prikazano koliko različitih slučajeva nosi iste mutacije.



Grafik 8. Raspodela *BRAF* V600E, *RET/PTC1*, *RET/PTC3* i *EGFRvIII* mutacija u FNAB uzorcima.

Venov dijagram otkriva da se preklapaju samo slučajevi sa *RET/PTC1* ili 3 i *BRAF* mutacijom (ukupno dva), dok se *EGFRvIII* i *BRAF* mutacija, ili *EGFRvIII* i *RET/PTC1* i 3 rearanžmani, međusobno isključuju.

4.3. Dijagnostički potencijal biomarkera

Rezultati prikazani u prethodnom poglavlju, izdvajaju markere koji mogu doprineti poboljšanju preoperativne dijagnostike karcinoma štitne žlezde - serumski nivoi hormona T3, proteinska ekspresija kaveolina-1 i pojava *BRAF* V600E mutacija. Na osnovu finalne histopatološke dijagnoze, vrednosti kaveolina-1 i prisustva *BRAF* V600E, pacijenti su podeljeni u grupe, šifre za grupe su date u **Tabeli 16**. Nivoi T3 nisu uzeti za stratifikaciju pacijenata zbog nedovoljnog broja ispitanika.

Tabela 16. Grupisanje uzoraka prema dijagnozi, ekspresiji kaveolina-1 i *BRAF* V600E mutaciji.

Šifra grupe	Dijagnoza	Kaveolin-1	<i>BRAF</i> V600E	Broj slučajeva
101	benigna	negativan	<i>wild type</i>	30
111	benigna	pozitivan	<i>wild type</i>	15
201	maligna	negativan	<i>wild type</i>	19
202	maligna	negativan	mutant	1
211	maligna	pozitivan	<i>wild type</i>	20
212	maligna	pozitivan	mutant	10

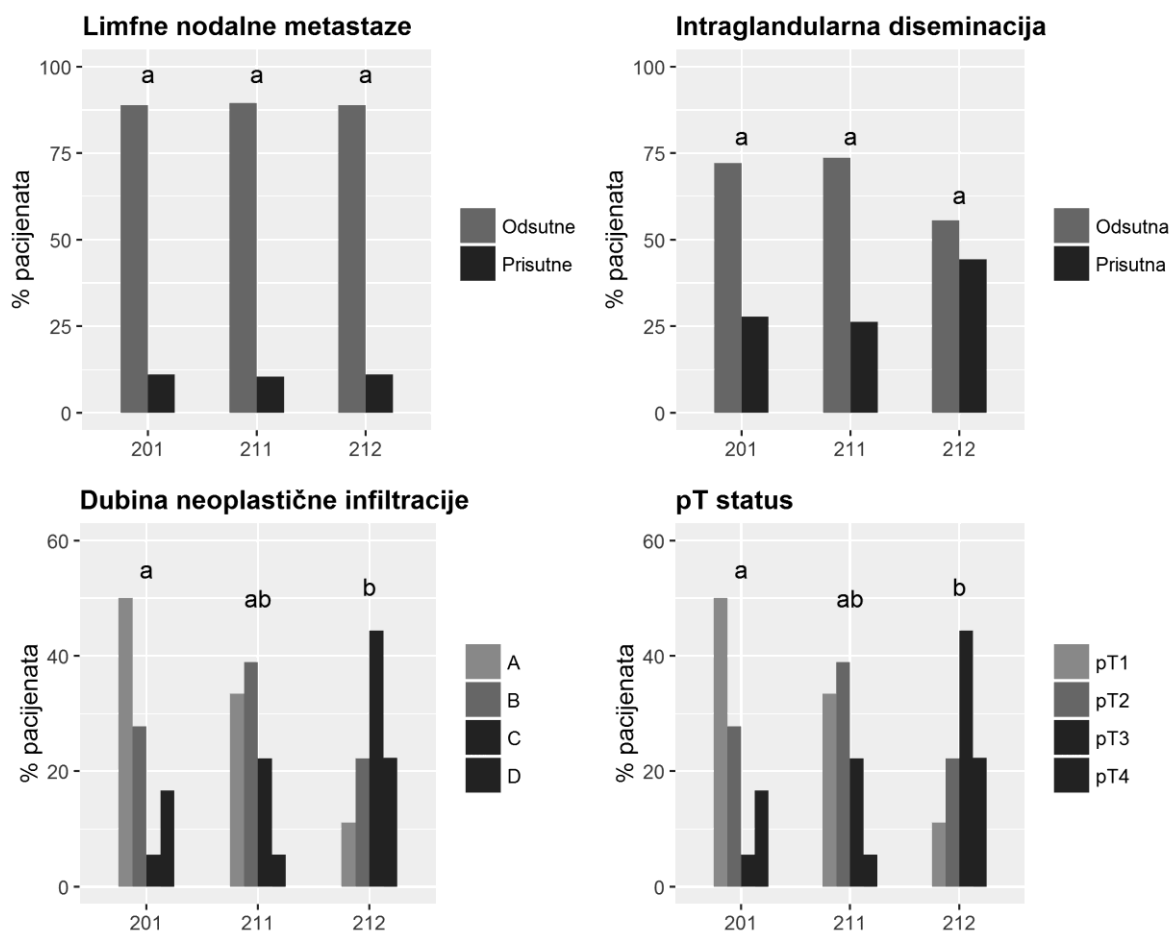
Dijagnoza: 1 – benigna, 2 – maligna; kaveolin-1: 0 – negativno imunocitohemijsko bojenje, 1 – pozitivno bojenje; *BRAF*: 1 – *wild type*, 2 – V600E mutacija.

Grupe su se odlikovale sledećim karakteristikama: 101 - benigna dijagnoza, negativan kaveolin-1 i odsustvo *BRAF* V600E mutacije; 111 – benigna dijagnoza, pozitivan kaveolin-1 i odsustvo *BRAF* V600E; 201 – maligna dijagnoza, negativan kaveolin-1 i odsustvo *BRAF* mutacije; 202 – maligna dijagnoza, negativan kaveolin-1 i prisustvo *BRAF* mutacije; 211 – maligna dijagnoza, pozitivan kaveolin-1 i prisustvo *BRAF* mutacije i 212 – maligna dijagnoza, pozitivan kaveolin-1 i prisustvo *BRAF* mutacije. Grupa 202 je izostavljena iz dalje analize, zbog samo jednog uzorka. Konačno su u analizu ušli uzorci iz pet grupa - 101, 111, 201, 211 i 212.

Kod uzoraka iz grupa sa malignitetom (201, 211, 212) je urađena analiza poređenja agresivnosti karcinoma, definisana kliničko-patološkim parametrima, dok je u svakoj od pet grupa određena mRNK ekspresija EGFR i lokalizacija EGFR-a i kaveolina-1 u tkivu karcinoma štitne žlezde.

4.3.1. Poređenje agresivnosti tiroidnih karcinoma

Za svaku od grupa su prikupljeni sledeći kliničko-patološki podaci: limfne nodalne metastaze, intraglandularna diseminacija, dubina neoplastične infiltracije i pT status karcinoma i urađena je statistička analiza njihovog međusobnog poređenja (**Grafik 10**).

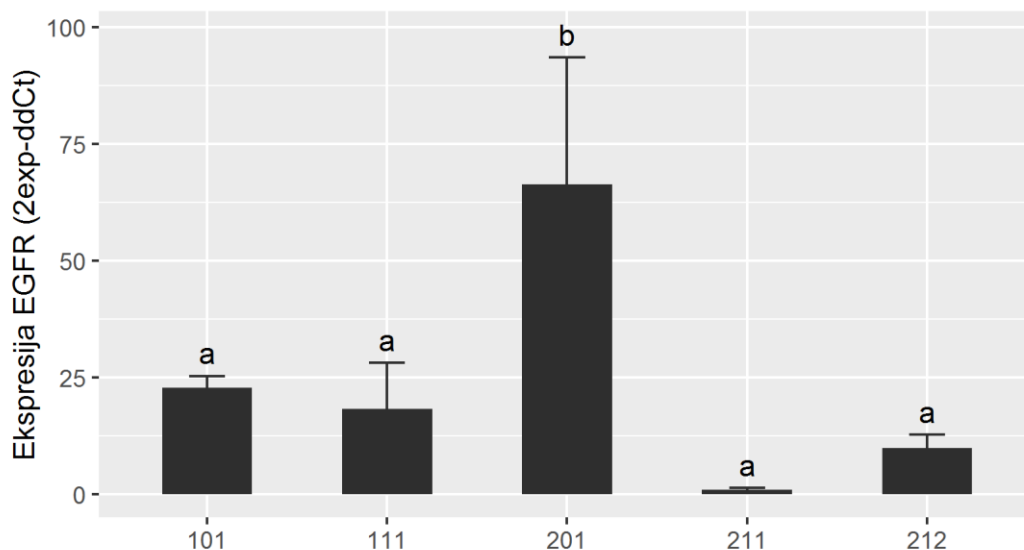


Grafik 10. Analiza kliničko-patoloških parametara u malignim FNAB uzorcima, podeljenim prema ekspresiji kaveolina-1 i *BRAF* V600E mutacionom statusu. Rezultati prikazuju procentualni udeo pacijenata u svakoj grupi. Grupe koje ne dele isto slovo pokazuju statistički značajnu razliku u raspodeli. Razlike u raspodeli su testirane Fisher exact testom (limfne nodalne metastaze i intraglandularna diseminacija) ili *Mann Whitney U* testom (Dubina neoplastične infiltracije i pT status).

Ova analiza je pokazala da nema statistički značajne razlike između grupa u pogledu prisustva limfnih nodalnih metastaza i intraglandularne diseminacije. Međutim, grupe 201 i 212 se statistički značajno razlikuju u pogledu pT statusa i dubine neoplastične infiltracije (*Mann-Whitney U test*, $p < 0,05$), odnosno agresivniji oblici karcinoma se javljaju kod uzoraka pozitivnih i na kaveolin-1 i na *BRAF* V600E u poređenju sa karcinomima negativnim na ove markere.

4.3.2. Ekspresija EGF receptora

Nivoi ekspresije EGFR su mereni *real-time* PCR-om u sedam odabranih uzoraka iz svake od pet gore navedenih grupa. Relativna količina EGFR je izračunata ddCt metodom, i rezultati su predstavljeni na **Grafiku 11**.

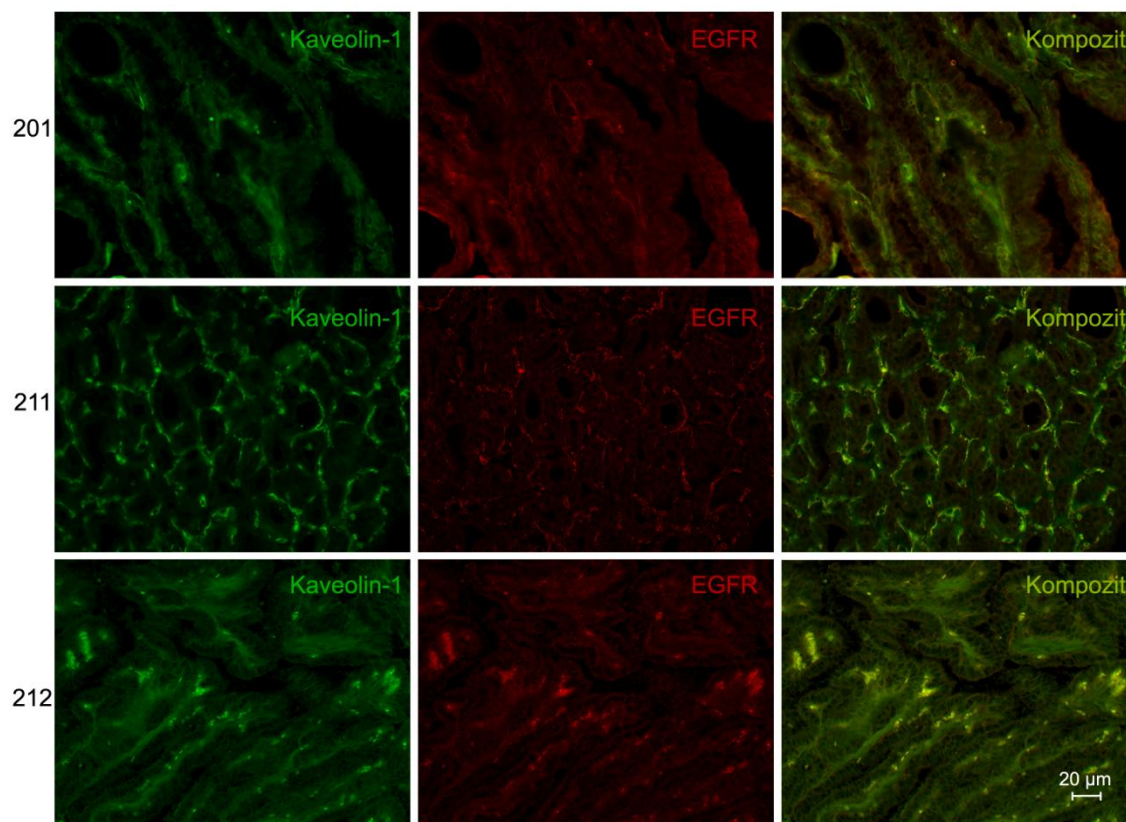


Grafik 11. Ekspresija EGFR u uzorcima grupisanim prema dijagnozi, ekspresiji kaveolina-1 i *BRAF* V600E statusu izračunata ddCt metodom. Rezultat predstavlja srednju vrednost ekspresije \pm SEM za svaku grupu. Grupe koje ne dele isto slovo pokazuju statistički značajnu razliku u ekspresiji ($p < 0,05$; *Mann Whitney U test*).

Nivoi EGFR su se razlikovali prema grupama, najveća ekspresija je detektovana u grupi 201 (maligni tumori sa negativnim kaveolinom-1 i *wild-type* *BRAF* genotipom). Ova grupa je imala statistički značajno veću ekspresiju u odnosu na sve druge grupe (ANOVA test, *Duncan's* post-hoc test, $p < 0,05$). U pogledu agresivnosti kancera, najveća ekspresija

EGFR je detektovana kod manje agresivnih karcinoma – lezija sa niskim pT statusom i manjim stepenom neoplastične infiltracije.

Kada je testirana povezanost ekspresije EGFR i kaveolina-1, dobijena je značajna negativna korelacija između ovih parametara (*Spearman* test, $\rho=-0,572$, $p<0,05$). U cilju potvrde inverzne ekspresije ova dva proteina, na odabranim uzorcima papilarnog karcinoma iz grupa 201, 211 i 212 je urađeno dvostruko fluorescentno imunobojenje prikazano na **Slici 24**.



Slika 24. Određivanje ekspresije i lokalizacije kaveolina-1 i EGFR u papilarnim tiroidnim karcinomima metodom indirektno imunofluorescence sa fluorescein-konjugovanim streptavidinom (kaveolin-1) i *Texas red*-konjugovanim streptavidinom (EGFR). Uvećanje 10x.

Kod ispitanika iz grupe 201 uočeno je bojenje kaveolina-1 u stromi, dok je maligni epitel bio negativan na kaveolin-1, a EGFR jako pozitivan na membrani tirocita. Kod grupe 211, kaveolin-1 je pokazao intenzivno bojenje u stromi, dok je EGFR u malignim epitelnim

ćelijama pokazao umerenu imunopozitivnost. Kod grupe 212, intenzivno bojenje kaveolina-1 je uočeno u fibrovaskularnoj stromi, dok je epitel bio umereno pozitivan na kaveolin-1 i na EGFR. Uopšteno govoreći, najveća imunopozitivnost EGFR je uočena u grupi 201, dok je u grupi 212 kaveolin-1 imao najveću imunoekspresiju.

4.3.4. Određivanje ukupnog dijagnostičkog potencijala biomarkera

Dijagnostički potencijal kombinacije molekularnih markera je izračunat i u **Tabeli 17** prikazani su osetljivost, specifičnost, PPV, NPV i dijagnostička tačnost za različite kombinacije markera.

Tabela 17. Dijagnostička tačnost citologije, EGFR i kombinacije odabranih markera određenih u FNAB uzorcima.

	OS	SP	PPV	NPV	DT
Citologija	32,5	79,1	56,9	57,9	57,7
Kaveolin-1	57,1	66,0	64,0	59,3	61,5
BRAF V600E	18,2	98,6	93,3	51,9	56,2
EGFR	52,6	53,8	62,5	43,8	53,1
Kaveolin-1+BRAF+EGFR	78,9	38,5	65,2	55,6	62,5
Citologija+Kaveolin-1+BRAF+EGFR	94,4	0,0	58,6	0,0	56,7

Boldovane vrednosti označavaju najveću vrednost izračunatog parametra između poređenih markera/kombinacije markera. OS – osetljivost, SP – specifičnost, PPV – pozitivna prediktivna vrednost, NPV – negativna prediktivna vrednost, DT – dijagnostička tačnost

Dijagnostička tačnost panela od tri molekularna markera (kaveolin-1, *BRAF* V600E i EGFR) pokazala je veću dijagnostičku tačnost od same citologije (62,5%). Takođe, za ovu kombinaciju markera je uočena povećana osetljivost (78,9% u poređenju sa 32,5% kod citologije), što znači da se negativan test dobijen ovim panelom može smatrati negativnim sa sigurnošću od skoro 80%.

5. Diskusija

FNAB ima važnu ulogu u evaluaciji pacijenata sa tiroidnom nodusima, ali ona nije bez nedostataka. Približno 10-20% FNAB uzoraka ne bude adekvatno za analizu zbog nedovoljnog broja ćelija za postavljanje dijagnoze, a jedna trećina pacijenata posle FNA biopsije ima tzv. neodređenu dijagnozu, pošto se ne može utvrditi o kakvoj vrsti lezije je reč. Najveći problem u tiroidnoj dijagnostici predstavljaju maligne folikularne i onkocitne lezije, koje se na osnovu citomorfologije ne mogu razlikovati od benignih folikularnih odnosno onkocitnih lezija. Za dijagnozu FTC i HTC je neophodno odrediti invaziju kapsule, što se ne vidi na FNAB razmazu, dok PTC fv često ne pokazuje dovoljno ubedljive jedarne atipije koje će ga svrstati u kategoriju malignih. Problemima u FNAB dijagnostici doprinosi i subjektivnost u ocenjivanju citoloških preparata.

U postoperativnoj dijagnostici najveću nedoumicu predstavlja razlikovanje folikularnog adenoma od folikularnog karcinoma i folikularne varijante papilarnog karcinoma. Budući da je jedini dijagnostički kriterijum za razlikovanje folikularnih karcinoma od folikularnih adenoma invazija kapsule, potrebno je pronaći presek tkiva na kome se invazija može potvrditi.

U ovom radu su ocenjene dijagnostičke i prognostičke performanse proteinskih i genetičkih markera koji bi sami ili u kombinaciji mogli da pomognu dijagnostici karcinoma tiroidee. Kaveolin-1 je dobar proteinski marker tiroidnog (posebno papilarnog) karcinoma, koji može da ukaže i na agresivnije tumore. Poznata genetička alteracija u tiroidnom karcinomu *BRAF* V600E mutacija i genska ekspresija EGFR, molekula uključenog u progresiju kancera, su evaluirani kao genetički markeri.

5.1. Dijagnostički i prognostički potencijal kaveolina-1 u pre i postoperativnim uzorcima štitne žlezde

Rezultati ovog rada ukazuju da se viša ekspresija kaveolina-1 na nivou proteina javlja kod malignih nego kod benignih tumora. U pogledu histotipova, najveći porast nivoa kaveolina-1 je zabeležen kod papilarnog karcinoma, posebno kod klasične varijante koja je imala značajno višu ekspresiju nego folikularna varijanta, dok je mnogo niža ekspresija zabeležena kod folikularnog karcinoma. Značajno su se razlikovale i ekspresija u

folikularnom adenomu i folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma, dva morfološki slična tumora, sa različitim biološkim karakterom.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija. *Shankar* i saradnici su 2012. godine pokazali značajno veću učestalost pozitivnog kaveolina-1 kod diferenciranog tiroidnog karcinoma nego kod benignih tumora [123]. *Ito* i saradnici su u studiji koja je ispitivala imunohistohemijsku ekspresiju kaveolina-1 uočili jak intenzitet bojenja u skoro svim uzorcima papilarnog tiroidnog karcinoma, posebno kod klasične varijante [119]. U istoj studiji uzorci folikularnog karcinoma i adenoma su bili negativni na kaveolin-1. Ova grupa je 2005. godine uporedila ekspresiju u folikularnim karcinomima i folikularnoj varijanti PTC, gde je PTC fv pokazao značajno višu ekspresiju kaveolina-1 nego FTC, što se slaže sa našim rezultatima. Razlike u bojenju kaveolina-1 u FTC i PTC fv u našoj studiji nisu bile statistički značajne, ali je PTC fv bio pozitivan u više od 60% slučajeva, nasuprot FTC koji je pokazao pozitivnost u oko 40% slučajeva.

U ovoj disertaciji je određena ekspresija kaveolina-1 u peritumorskom tkivu koje se prema histomorfološkim karakteristikama može smatrati normalnim tkivom štitne žlezde. Pokazano je da se kaveolin-1 eksprimira u peritumorskim ćelijama više nego u folikularnim karcinomima, a značajno više nego u folikularnim adenomima. Ovaj rezultat potvrđuje rad *Aldred-a* i saradnika koji su pokazali da je ekspresija kaveolina-1 niža kod folikularnog karcinoma u poređenju sa normalnim tkivom [118, 121]. Međutim, ova grupa je pokazala da je ekspresija kaveolina-1 nepromenjena kod papilarnog i anaplastičnog karcinoma u poređenju sa normalnim tkivom. U našoj i u studiji *Ito-a*, papilarni tiroidni karcinomi ekspimiraju kaveolin-1 u većoj meri nego normalno tkivo, što odstupa od rezultata *Aldred-a* i saradnika. Ovo neslaganje se može objasniti različitim vrstama uzoraka normalnog tkiva (u našoj studiji je to bilo peritumorsko tkivo, dok u studiji *Aldred-a* i saradnika nije precizirano).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju da u pogledu ekspresije određene na nivou mRNK, ekspresija kaveolina-1 opada u sledećem nizu PTC kl, PTC fv, FTA, struma, FTC. *Aldred* i saradnici su odredili ekspresiju kaveolina-1 na nivou mRNK i uočili su značajno smanjenu ekspresiju u FTC u poređenju sa normalnim tkivom, ali gotovo istu ekspresiju u PTC nego u normalnom, kontrolnom tkivu [118]. U našoj studiji nije poređen

nivo kaveolina-1 u PTC sa normalnim tkivom, ali su nivoi kaveolina-1 u FTC takođe bili niži u poređenju sa PTC.

Analiza ukupne proteinske ekspresije kaveolina-1 na imunoblotu u različitim podvrstama papilarnog karcinoma je pokazala da se njegova ekspresija razlikuje prema histotipovima PTC. Imunoblotom je najveća ekspresija kaveolina-1 određena u solidnoj i trabekularnoj varijanti PTC. Imunohistohemijsko bojenje kaveolina-1 u istim uzorcima je pokazalo da visoka ekspresija potiče od visoke stromalne ekspresije kaveolina-1, a ne od ekspresije kaveolina-1 u tirocitima. Povišeni stromalni kaveolin-1 je detektovan kod retkih PTC (solidni, difuzno-sklerozni, trabekularni) u poređenju sa PTC kl, dok je u epitelnim ćelijama rezultat bio obrnut. Ekspresija kaveolina-1 u epitelu retkih PTC (solidne, trabekularne i skirozne strukture) je određivana u studiji *Ito*-a i saradnika gde je takođe ustanovljeno da retki PTC imaju nižu ekspresiju kaveolina-1 u poređenju sa klasičnim PTC [119]. Studija iz 2012. godine, koju su izveli *Kim* i saradnici, je određivala nivoe kaveolina-1 u epitelu i u stromi karcinoma štitne žlezde [122]. U njihovom radu, povišena ekspresija kaveolina-1 je detektovana u stromi difuzno-skleroznih PTC u odnosu na klasične PTC, što se poklapa sa rezultatima našeg istraživanja.

ROC analiza je pokazala da bi se proteinska ekspresija kaveolina-1 mogla upotrebiti kao dijagnostički marker u postoperativnoj dijagnostici za razlikovanje histotipova slične morfologije. Visoka specifičnost koju pokazuje kaveolin-1 u razdvajanju papilarnog karcinoma folikularne histološke varijante i folikularnog adenoma (85%) ukazuje na to da pozitivan rezultat može sa visokom sigurnošću da ukaže na malignu dijagnozu. ROC analiza je pokazala da kaveolin-1 dobro razdvaja i maligne tumore od nemalignih. Analiza ekspresije ovog proteina u FNAB uzorcima je pokazala da se kaveolin-1 značajno drugačije eksprimira u benignim i malignim tumorima. U kliničkom smislu ovakav marker bi smanjio nedoumice koje se javljaju u postoperativnoj dijagnostici prilikom razlikovanja histomorfološki sličnih lezija. *Aldred* i saradnici su 2003. i ponovo 2005. godine [118, 121] ukazali da bi, s obzirom na različitu ekspresiju kaveolina-1 u FTC i PTC, on mogao da bude pomoćni marker u određivanju histotipova tiroidnog karcinoma u postoperativnoj

dijagnostici, ali njegove dijagnostičke performanse nisu evaluirane. Studija izvedena u ovoj tezi je jedina ispitala potencijalnu primenu kaveolina-1 u preoperativnoj dijagnostici tumora štitne žlezde.

Ekspresija kaveolina-1 u epitelu i stromi je u ovoj disertaciji značajno korelirala sa kliničko-patološkim parametrima i ove veze su bile različitog smera u različitim odeljcima. Naime, epitelni kaveolin-1 pozitivno korelira sa prisustvom limfnih nodalnih metastaza, dok je stromalni kaveolin-1 pokazao negativnu korelaciju sa drugim parametrima agresivnosti karcinoma, to jest sa dubinom neoplastične infiltracije i *BRAF* mutacionim statusom. Ovaj rezultat govori o mogućoj prognostičkoj upotrebi ekspresije kaveolina-1 u epitelu, kao i u stromi karcinoma štitne žlezde, za razdvajanje agresivnijih oblika papilarnog karcinoma koji zahtevaju radikalniju terapiju. Međutim, rezultati prethodne studije o ekspresiji kaveolina-1 u stromi tiroidnih karcinoma *Kim-a* i saradnika se razlikuju u tome što nivoi kaveolina-1 u oba tkivna odeljka ne koreliraju sa kliničko-patološkim faktorima, za razliku od rezultata ove disertacije [122]. Ovo neslaganje može biti uzrokovano heterogenošću vrsta tumora koje su upotrebljene u našoj studiji, ali i malim brojem uzoraka.

Studije na drugim vrstama karcinoma govore o mogućoj upotrebi ekspresije kaveolina-1 u prognostici. Kod karcinoma dojke, gubitak kaveolina-1 iz strome može da se upotrebi kao prognostički marker lošijeg ishoda, jer korelira negativno sa lošijom prognozom ovog karcinoma [126, 216, 217]. Uz to, kliničke studije su pokazale da je kod pacijenata sa pozitivnim kaveolinom-1 u stromi, petogodšnje preživljavanje bez povratka bolesti iznosilo 75,5% u poređenju sa 10% pacijenata sa stromom negativnom na kaveolin-1 koji su preživeli više od 5 godina [218]. Ovi rezultati govore u prilog teoriji da niska ekspresija stromalnog kaveolina-1 utiče pozitivno na rast tumora. Pokazano je da je gubitak kaveolina-1 iz CAF (od engl. *cancer associated fibroblasts*) povezan sa kraćim vremenom preživljavanja, pošto njegov gubitak iz strome indukuje invazivni potencijal ćelijskih linija karcinoma dojke [219]. Još jedna teorija govori o povezanosti gubitka kaveolina-1 iz strome sa širenjem karcinoma. Naime, *Pavrides* i kolege su kod ćelija kancera dojke 2009. godine prvi put predložili tzv. reverzni Varburgov efekat, nazvan po tome što se Varburgov

efekat, tj. aerobna glikoliza ne odvija u epitelnim ćelijama tumora, već u fibroblastima tumorske stome [220]. Naime, epitelne kancerske ćelije upućuju stromalne fibroblaste da pređu na aerobnu glikolizu (mio-fibroblastni fenotip) i da omoguće dotok energetski-bogatih nutrijenata (ketona, laktata i dr.) koji će se preko monokarboksilatnih transportera preneti iz fibroblasta u tumorske ćelije. Kancerske ćelije zadržavaju produkciju ATP u mitohondrijama, a potpomažu ga gorivom iz strome, što im daje veći proliferativni kapacitet. Gubitkom kaveolina-1 se povećava ekspresija glikolitičkih enzima i markera mio-fibroblasta u uslovima normoksije. Kako je u našoj studiji stromalni kaveolin-1 bio negativno povezan sa dubinom neoplastične infiltracije, koja je parametar agresivnosti karcinoma, može se pretpostaviti da njegov gubitak iz strome ukazuje na agresivnije ponašanje kancera.

5.2. *BRAF* V600E u karcinomu štitne žlezde

U ovoj disertaciji, rezultati ispitivanja frekvencije *BRAF* mutacije u benignim i malignim uzorcima dobijenim FNA biopsijom su pokazali da se ona javlja skoro isključivo kod malignih tumora, jer je samo jedan slučaj benignog tumora bio pozitivan na *BRAF* V600E. Frekvencija mutacija kod malignih uzoraka je iznosila 18,1%. U studijama koje su analizirale *BRAF* mutacije u FNAB uzorcima je detektovana frekvencija mutacija od 15-39% [177, 221, 222].

Kao dijagnostički marker, *BRAF* je na preoperativnim uzorcima analiziranim u ovom doktoratu pokazao visoku specifičnost (98,6%), budući da je ova mutacija detektovana skoro isključivo u malignim uzorcima, od čega su 85,7% bili papilarni karcinomi. Međutim, usled toga što je frekvencija *BRAF* mutacije u malignim uzorcima niska, i osetljivost *BRAF* V600E kao markera je niska. Ovakav rezultat je dobijen i u studiji iz 2011. godine gde je 22,6% FNAB uzoraka bilo pozitivno na *BRAF*, od čega su 84,2% pozitivnih bili papilarni karcinomi [177]. *BRAF* mutacija je ovde pokazala 100% specifičnost i PPV za PTC u neodređenim nodusima. S obzirom da je detekcija ove mutacije tehnički lako izvodljiva i ekonomski isplativa, njena upotreba u preoperativnoj dijagnostici bi imala značaj u detektovanju pacijenata sa PTC. Imajući u vidu da se kod citološkog pregleda FNAB uzoraka javlja velika varijabilnost u tumačenju [223], *BRAF*

mutacija, kao stabilan marker, bi u preoperativnoj dijagnostici mogla poslužiti u odabiru vrste operacije. U slučaju pozitivnog testa, pacijent bi se mogao odmah poslati na totalnu tiroidektomiju bez dijagnostičke lobektomije [180]. Nedostatak ovog markera ipak leži u niskoj osetljivosti, s obzirom da oko trećina tiroidnih karcinoma nemaju nijednu poznatu mutaciju. Iako molekulsko testiranje na *BRAF* V600E i panel od 7 najčešćih mutacija u tiroidnom kanceru nije redovna praksa u preoperativnoj dijagnostici, Američka tiroidna asocijacija ga preporučuje u slučaju neodređenih Bethesda kategorija [10].

Prevalenca *BRAF* mutacije u ispitivanim slučajevima PTC je iznosila približno 35%. Kada se uzorci PTC razvrstaju prema histotipu, kod PTC klasične varijante je detektovano 85% *BRAF* mutanata, dok je kod folikularne varijante V600E mutacija detektovana u 16% uzoraka.

Na osnovu velikog broja studija koje su se od 2003. godine bavile ispitivanjem učestalosti ove mutacije, zaključeno je da je *BRAF* mutacija specifična za papilarni tiroidni karcinom i za anaplastični karcinom poreklom od PTC, i da se javlja u rasponu od 40-68% u PTC i 10-20% u ATC [162]. Razlike u frekvenciji mutacija mogu poticati od razlike u metodama koje su korišćene za detekciju mutacije [224]. Kod FTC, MTC i benignih tumora ova mutacija nije pronađena [173, 225]. *BRAF* mutacija se javlja samo kod nekoliko podvrsta papilarnih karcinoma, odnosno kod visokoćelijskog PTC, klasičnog PTC i *Warthin-like* PTC, dakle podtipova koji imaju pretežno papilarnu strukturu rasta [226-228]. U manjoj meri se javlja i kod folikularne varijante PTC [229]. U klasičnoj varijanti PTC, *BRAF* mutacija je detektovana sa prevalencom u rasponu od 50-80% [230] što odgovara i prevalenci *BRAF* V600E kod PTC kl dobijenoj u ovoj disertaciji (81%). Moguća neslaganja literature u vezi sa frekvencijom *BRAF* V600E u različitim PTC podvrstama može poticati od činjenice da su osim klasične i folikularne, sve druge varijante PTC retke, te se ne može izvesti studija sa dovoljno reprezentativnim brojem uzoraka.

BRAF mutacija je u više studija dovedena u vezu sa lošijom prognozom bolesti [182, 229, 231, 232]. Meta-analiza 27 studija koje su ispitivale povezanost *BRAF* mutacije u tiroidnom karcinomu i parametara lošije prognoze je pokazala da pacijenti sa *BRAF* pozitivnim nalazom imaju 1,5-2,1 puta veći rizik od povratka bolesti kao i od ekstratiroidne invazije, limfnih nodalnih metastaza i većeg TNM statusa [180]. U ovom radu, prisustvo

BRAF mutacije je bilo u pozitivnoj korelaciji sa dubinom neoplastične infiltracije, pT statusom i prisustvom limfnih nodalnih metastaza, dakle parametrima koji ukazuju na agresivnost bolesti.

Testiranje pacijenata na *BRAF* mutaciju bi moglo da pomogne u dizajniranju terapije inhibitorima. Međutim, zbog određenog broja studija koje nisu pokazale postojanje povezanosti *BRAF* V600E sa napredovanjem karcinoma [233-235], ATA ne preporučuje rutinsko ispitivanje ovog markera, već savetuje korišćenje za određivanje rizika bolesti uz tumačenje u kontekstu kliničkih parametara.

5.3. Ekspresija kaveolina-1 u kontekstu *BRAF* mutacionog statusa

U eksperimentima na papilarnim karcinomima, određena je proteinska ekspresija ukupnog kaveolina-1 i upoređeni su rezultati sa *BRAF* mutacijama. Značajno niža ekspresija je detektovana kod *BRAF* pozitivnih pacijenata. Kada je ekspresija kaveolina-1 razložena prema tkivnim odeljcima, stromalni kaveolin-1 je značajno negativno korelirao sa *BRAF* mutacijom.

Sa druge strane, epitelni kaveolin-1 je pokazao suprotan trend u poređenju sa stromalnim; veći nivoi su detektovani kod *BRAF* mutantnih uzoraka. *BRAF* kinaza je deo MAPK signalnog puta koji se pokreće vezivanjem liganda (faktora rasta) za receptore koji često leže u kaveolama, u okviru lipidnih raftova. Kaveolin-1 ima ulogu u regulaciji ovih signalnih puteva preko interakcije sa različitim molekulima ovog puta [236, 237]. U tiroidnom kanceru kaveolin-1 ima ulogu u ćelijskoj adheziji, migraciji i progresiji karcinoma [123], što je pokazano i u drugim vrstama karcinoma, to jest kod karcinoma dojke i debelog creva [238, 239]. Epitelna ekspresija kaveolina-1 ima pozitivan trend rasta sa *BRAF* mutacionim statusom i pozitivno korelira sa limfnim nodalnim metastazama, što bi moglo da ukaže na potencijalnu ulogu kaveolina-1 u progresiji kancera.

Kaveolin-1 igra različite uloge u ćelijskim procesima u zavisnosti od ćelijskog konteksta [240]. Kako je u velikom broju malignih tumora (karcinomi pluća, jajnika, dojke i kolona) pokazana njegova smanjena ekspresija, postoje osnove za njegovu tumor supresorsku funkciju [240]. Lokus na kojem se nalazi gen za kaveolin-1 često podleže deleciji u toku karcinogeneze (npr. kod karcinoma prostate, dojke, kolorektalnog,

bubrežnog karcinoma) [241]. Kod nekih vrsta kancera je primećeno da EGF snižava nivo kaveolina-1, što ima za posledicu pojačanu invaziju tumorskih ćelija [242]. Tumor supresorskoj hipotezi doprinose i osobine kaveolin-1 *knockout* miševa kod kojih postoji predispozicija za razvitak tumora epitelnih ćelija [243].

Sa druge strane, u tumorima prostate i tireoidee, kaveolin-1 je pokazao povećanu ekspresiju i povezanost sa metastazama, agresivnijim tumorima i lošijim ishodom. Kod karcinoma prostate on konstitutivno aktivira Akt, a takođe se može i sekretovati i svoju ulogu iskazati autokrino, ali i parakrino, delujući na ćelije strome [132]. Kaveolin-1 fosforilisan na tirozinu 14 stabilizuje kinazu fokalnih adhezija (engl. *Focal Adhesion Kinase* - FAK) i pomaže *de novo* sintezu fokalnih adhezija na prodirućim ćelijama, stimulišući ćelijsku migraciju [123]. U kaveolama se koncentrišu receptori za VEGF i PDGF, koji su uključeni u proces angiogeneze [244].

Na osnovu ovoga je zaključeno da ekspresija ovog proteina zavisi od tipa tumora i od stadijuma bolesti. U zavisnosti od ćelijskih prilika, različiti molekuli će u datom momentu biti prisutni i aktivni u ćeliji, i moći će, direktnim kontaktom ili posredno, da utiču na ekspresiju i ponašanje kaveolina-1 [115, 116].

U analizi spovedenoj na FNAB uzorcima, ispitana je povezanost parametara agresivnosti tumora sa *BRAF* mutacijama i ekspresijom kaveolina-1. Grupa pacijenata sa pozitivnim *BRAF* statusom i ekspresijom kaveolina-1 su imali značajno veći broj slučajeva sa naprednijim pT statusom i većom dubinom neoplastične infiltracije. Na osnovu ovoga se nameće zaključak da simultana pojava visoke ekspresije kaveolina-1 u tirocitima i *BRAF* V600E mutacije doprinosi agresivnijem karakteru lezije sa većim potencijalom za širenje.

5.4. Ekspresija EGFR u odnosu na *BRAF* V600E mutaciju i ekspresiju kaveolina-1

U preoperativnim uzorcima tiroidnog kancera je određena ekspresija EGFR na nivou mRNK. Ona se nije značajno razlikovala između malignih i benignih uzoraka, ali su pronađene razlike kada su grupe podeljene prema dijagnozi, imunoekspresiji kaveolina-1 i *BRAF* V600E.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da se kod *BRAF* V600E pozitivnih slučajeva javljaju niski nivoi EGFR, dok je kod pacijenata sa *wild type BRAF* EGFR veoma visok, što bi moglo da potvrdi da je u progresiji kancera MAPK put aktivan preko konstitutivne aktivacije BRAF, a ekspresija EGFR je smanjena mehanizmom negativne povratne sprege. Povezanost *BRAF* V600E mutacije i EGFR je ispitivana u kontekstu rezistencije na hemoterapeutike. Naime, MAPK signaling je kod *BRAF* V600E pozitivnih karcinoma konstitutivno aktiviran [164], zbog čega se negativnom povratnom spregom slabi signaling nizvodno od EGFR [245]. Primećeno je da kod metastatskog kolorektalnog karcinoma (mCRC) dolazi do rezistencije na terapiju koja cilja BRAF mutant i ustanovljeno je da je uzrok pojačan signaling od EGFR [246]. Naime, usled inhibiranja *BRAF* V600E signalinga gubi se negativna povratna sprega na EGFR i on se posledično pojačava. Dakle, ciljanom inhibicijom *BRAF* V600E mutanta se aktivira adaptivna rezistencija na hemoterapeutike. Suprotno tome, kod melanoma su nivoi EGFR niski, te je tako izbegnuta mogućnost stečene rezistencije, što govori o važnosti poznavanja ćelijskog konteksta prilikom dizajniranja terapije. Isto tako, jedan od uzroka rezistentnosti na terapiju EGFR inhibitorima može biti i *BRAF* mutacija, što je ustanovljeno kod kolorektalnog i karcinoma pluća [247-250]. Najčešći uzrok rezistentnosti na EGFR terapiju kod mCRC je *KRAS* mutacija [251], stoga kod pacijenata sa mCRC koji nemaju mutacije u *RAS* genima, ispitivanje mutacija u genu za *BRAF* može doprineti predviđanju rezistentnosti na monoklonska anti-EGFR antitela [252].

U papilarnom tiroidnom karcinomu je pokazano da se rezistencija na vemurafenib (*BRAF* inhibitor) poklapa sa prisustvom *KRAS* G12D mutacije i povećanom ekspresijom receptor tirozin kinaza EGFR i HER3 [253]. Ova povratna inhibicija je pokazana kod papilarnog karcinoma, gde je utvrđeno da *BRAF* V600E mutacija posredno utiče na inhibiciju EGFR [254].

Rezultati ove disertacije su pokazali da su u malignim uzorcima sa pozitivnim kaveolinom-1 nivoi EGFR su bili gotovo 5x niži nego u uzorcima sa negativnim kaveolinom-1. Ekspresija kaveolina-1 je pokazala i značajnu negativnu povezanost sa EGFR ekspresijom, te rezultati ovog eksperimenta govore da povišena ekspresija kaveolina-1 u karcinomima štitne žlezde može da utiče na smanjenje ekspresije EGFR.

Kaveolin-1 interreaguje sa EGFR preko kaveolin-vezujućeg motiva na EGFR koji se nalazi u kinaznom domenu i ovom interakcijom održava EGFR u neaktivnom stanju [255]. Isto tako, internalizacija EGFR putem kaveola se smatra da vodi u degradaciju receptora [139], a kaveolin-1 je potreban za pravilan signaling EGFR puta [256]. Kod karcinoma želuca, nivoi kaveolina-1 su smanjeni u odnosu na normalnu želudačnu mukozu i pokazana je povećana ekspresija EGFR na nivou mRNA i posledična pojačana aktivacija STAT3 puta [257]. Kod karcinoma skvamoznih ćelija, izmeštanjem kaveolina-1 iz lipidnih raftova, aktivira se EGFR signalni put [258]. Kaveolin-1 pokazuje i recipročnu povezanost sa ERK1/2 koji je nizvodni molekul EGFR signalnog puta [259].

Neslaganje rezultata ove disertacije sa literaturom se javlja u pogledu povezanosti EGFR molekula sa kliničkim parametrima. U ovom radu, povišena ekspresija EGFR je detektovana u grupi pacijenata sa nižim pT statusom i dubinom neoplastične infiltracije, dakle u slučajevima manje agresivnih karcinoma. Suprotno tome, druge studije su detektovale povišenu ekspresiju EGFR u anaplastičnim karcinomima tiroidee [140, 149], i pokazale povezanost ovog markera sa kliničko-patološkim parametrima [145]. Opisana je i uloga ovog molekula kao potencijalne mete za terapiju u anaplastičnom karcinomu [151]. Ipak u studiji *Sharme* i saradnika visoka ekspresija nije značajno korelirala sa prisustvom limfnih nodalnih metastaza, što je i rezultat koji je potvrđen u ovom doktoratu [142].

Kaveolin-1 je pokazao i različitu ćelijsku lokalizaciju u uzorcima sa visokom i niskom EGFR ekspresijom. Stroma pacijenata sa visokom epitelnom ekspresijom na EGFR je bila intenzivno imunopozitivna na kaveolin-1, dok je epitel bio negativan. Suprotno tome, u uzorcima sa slabom EGFR epitelnom imunoekspresijom, kaveolin-1 je pokazao epitelnu imunopozitivnost. Ovo potvrđuje inverznu ekspresiju navedena dva molekula i na proteinskom nivou, kao i potvrđuje povezanost EGFR sa parametrima boljeg ishoda, odnosno vezu kaveolina-1 sa lošijim kliničko-patološkim parametrima. Isto tako, ponovo je potvrđeno da se pozitivan kaveolin-1 u stromi javlja kod manje agresivnih karcinoma, što govori o mogućoj ulozi stromalnog kaveolina-1 u sprečavanju širenja kancera.

U ovoj studiji je ispitano i kakva je dijagnostička upotrebljivost kombinacije proteinske ekspresije kaveolina-1, *BRAF* V600E mutacije i genske ekspresije EGFR.

Pokazano je da kombinovanje ova tri markera u određenoj meri poboljšava dijagnostičku tačnost preoperativne dijagnostike u poređenju sa citologijom (62,5%, nasuprot 57,7%). Budući da su testovi za predložene markere tehnički izvodljivi u kliničkim uslovima, ova kombinacija bi mogla unaprediti preoperativnu patocitološku analizu i povećati broj tačno dijagnostikovanih pacijenata. Važnost ove kombinacije markera ogleda se i u njihovom potencijalu za stratifikaciju pacijenata prema riziku od agresivnijeg karcinoma. Pacijenti sa odmaklim pT statusom i višim stepenom neoplastične infiltracije su se odlikovali višom ekspresijom kaveolina-1, prisustvom *BRAF* V600E mutacije, i niskom ekspresijom EGFR, što može imati upotrebnu vrednost u pogledu predviđanja toka bolesti. Sa druge strane, ovi markeri su deo istog, MAPK signalnog puta, te se ne može isključiti mogućnost njihovog međusobnog uticaja. Dublja funkcionalna analiza ovog signalnog puta je potrebna da bi se utvrdilo da li su nivoi EGFR smanjeni kao posledica *BRAF* V600E mutacije, odnosno kao posledica ekspresije kaveolina-1, ili su u pitanju nezavisni prognostički markeri, u kom slučaju bi njihov dijagnostički i prognostički potencijal trebalo proveriti na većem broju uzoraka dobijenih iz više centara.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- Ekspresija kaveolina-1 je povišena u malignim u odnosu na benigne tumore. U pogledu histotipova, najveći porast ekspresije je zabeležen kod papilarnog karcinoma, posebno kod klasične varijante;
- ROC analiza je pokazala da se proteinska ekspresija kaveolina-1 može upotrebiti kao dijagnostički marker u postoperativnoj dijagnostici za razlikovanje histotipova slične morfologije, odnosno papilarnog karcinoma folikularne histološke varijante i folikularnog adenoma;
- U uzorcima podtipova PTC, kaveolin-1 je pokazao različitu ekspresiju u pogledu tkivne lokalizacije, sa najvećom stromalnom ekspresijom detektovanom u solidnoj podvrsti PTC, a najvećom epitelnom ekspresijom detektovanom u klasičnoj varijanti PTC;
- Statistički značajna pozitivna korelacija epitelne ekspresije kaveolina-1 i prisustva limfnih nodalnih metastaza utvrđena je u papilarnom karcinomu. Ovi rezultati sugerišu da se porast ekspresije kaveolina u tirocitima javlja uporedo sa limfatičnim širenjem tumora;
- Ekspresija kaveolina-1 u stromalnim ćelijama negativno korelira sa dubinom neoplastične infiltracije, što implicira trend snižavanja ekspresije stromalnog kaveolina-1 u toku procesa tumorske infiltracije;
- *BRAF* V600E mutacija je detektovana u 35% slučajeva papilarnog tiroidnog karcinoma i pozitivno je korelirala sa parametrima lošije prognoze (limfnim metastazama, pT statusom i dubinom neoplastične infiltracije), što implicira potencijalni doprinos ove mutacije progresiji kancera;
- Stromalni kaveolin-1 je negativno asociran sa *BRAF* V600E mutacijom, što ukazuje na mogućnost tumor supresorske uloge kaveolina-1 u stromalnom odeljku, jer se progresijom kancera gubi njegova ekspresija;
- Ekspresija EGFR na mRNK nivou je značajno viša u malignim uzorcima sa negativnim kaveolinom-1 i *BRAF* *wild type* genotipom, nego u uzorcima sa pozitivnim kaveolinom-1 i mutantnim *BRAF*. Visoki nivoi EGFR su prisutni u grupi

pacijenata sa nižim pT statusom i dubinom neoplastične infiltracije, što ukazuje na izostanak uticaja EGFR na progresiju bolesti;

- Ekspresija EGFR negativno korelira sa ekspresijom kaveolina-1 u tirocitima, što otvara mogućnost da ova dva molekula imaju regulatorni uticaj jedan na drugog;
- Kombinovanje ekspresije kaveolina-1, *BRAF* V600E mutacije i ekspresije EGFR povećava dijagnostičku tačnost i unapređuje preoperativnu patocitološku analizu;
- Navedena tri markera igraju važnu ulogu u stratifikaciji pacijenata prema riziku od progresivnijeg karcinoma, budući da su pacijenti sa odmaklim pT statusom i većim stepenom neoplastične infiltracije imali povišenu ekspresiju kaveolina-1, veću frekvenciju *BRAF* mutacije i snižene nivoe EGF receptora;
- Zaključak o tome da li su kaveolin-1, *BRAF* i EGFR nezavisni prognostički marker, ili su nivoi ekspresije kaveolina-1 smanjeni kao posledica *BRAF* mutacije i aktivacije MAPK puta, što negativnom povratnom spregom može da utiče na smanjenje nivoa EGFR, ne može se izvesti samo na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, i zahteva dublju funkcionalnu analizu ovog signalnog puta.

Sažetak

U ovom radu je pokazan potencijal kaveolina-1, *BRAF* V600E i EGFR kao markera za razlikovanje benignih od malignih lezija štitne žlezde. Predložena kombinacija markera bi bila relativno lako prenosiva u kliničko okruženje – metode za određivanje ovih markera su dostupne, ekonomski isplative i kompatibilne sa citologijom. Marker se određuju na različitim ćelijskim nivoima čime je postignuto maksimalno iskorišćenje materijala, te je za analizu dovoljna uobičajena količina aspiriranog materijala. Sa druge strane, u ovoj studiji je korišćen relativno mali broj uzoraka koji su prikupljeni iz istog centra, te je za evaluaciju ove kombinacije markera potrebno uraditi multicentričnu studiju na većem broju uzoraka. Pored dijagnostičkog potencijala, ova studija je ukazala i na povezanost markera sa parametrima lošije prognoze tiroidnog kancera, kao i na njihove međusobne korelacije. Budući da su ovi molekuli deo istog, MAP kinaznog signalnog puta, rezultati ove disertacije otvaraju mogućnost postojanja njihovog međusobnog uticaja, što posledično može imati efekat na modulisanje MAPK signalizacije preko regulacije ekspresije ovih markera. Konačno, kaveolin-1, *BRAF* V600E mutacija i EGFR zajedno pomažu otkrivanje agresivnijih tumorskih lezija, stoga su značajni za preoperativnu stratifikaciju pacijenata sa tiroidnim kancerom.

7. Literatura

1. Stathatos, N., *Anatomy and Physiology of the Thyroid Gland*, in *Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management*, L. Wartofsky and D. Van Nostrand, Editors. 2006, Humana Press: Totowa, NJ. p. 3-7.
2. Havelka, M.T., S., *Štitasta žlezda. Kliničke, morfološke i patohistološke karakteristike*. . 2003, Beograd: Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet.
3. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. 11th ed. 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. xxxv, 1116 p.
4. Werner, S.C., et al., *Werner and Ingbar's the thyroid : a fundamental and clinical text*. 7th ed. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven. xx, 1124 p.
5. Trbojević, B., *Tiroidna žlezda*. Drugo izdanje ed. 1998, Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet.
6. Molina, P.E., *Endocrine physiology*. 3rd ed. A Lange medical book. 2010, New York: McGraw-Hill Medical. viii, 303 p.
7. Vander, A.J., J.H. Sherman, and D.S. Luciano, *Human physiology : the mechanisms of body function*. 8th ed. 2001, Boston: McGraw-Hill. xviii, 800 p.
8. Ezzat, S., et al., *Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography*. Arch Intern Med, 1994. **154**(16): p. 1838-40.
9. Elaraj, D., R. Nayar, and C. Sturgeon, *Utility of molecular testing in the management of thyroid nodules - a clinical perspective*. Cytopathology, 2015. **26**(5): p. 284-7.
10. Haugen, B.R., et al., *2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer*. Thyroid, 2016. **26**(1): p. 1-133.
11. Mazeh, H. and R.S. Sippel, *Familial nonmedullary thyroid carcinoma*. Thyroid, 2013. **23**(9): p. 1049-56.
12. Sippel, R.S., M. Kunnimalaiyaan, and H. Chen, *Current management of medullary thyroid cancer*. Oncologist, 2008. **13**(5): p. 539-47.
13. Haymart, M.R., *Understanding the relationship between age and thyroid cancer*. Oncologist, 2009. **14**(3): p. 216-21.
14. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
15. Nikiforov, Y., P.W. Biddinger, and L.D.R. Thompson, *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid*. 2nd ed. 2012, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xi, 436 p.
16. Schonfeld, S.J., C. Lee, and A. Berrington de Gonzalez, *Medical exposure to radiation and thyroid cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2011. **23**(4): p. 244-50.
17. Ehlers, M. and M. Schott, *Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer: are they immunologically linked?* Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(12): p. 656-64.
18. Elisei, R., et al., *RET Genetic Screening in Patients with Medullary Thyroid Cancer and Their Relatives: Experience with 807 Individuals at One Center*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(12): p. 4725-4729.
19. Sippel, R.S., N.R. Caron, and O.H. Clark, *An evidence-based approach to familial nonmedullary thyroid cancer: screening, clinical management, and follow-up*. World J Surg, 2007. **31**(5): p. 924-33.
20. Delange, F., *The disorders induced by iodine deficiency*. Thyroid, 1994. **4**(1): p. 107-28.
21. Curado, M.P.E., B.; Shin, H.R.; Storm, H.; Ferlay, J.; Heanue, M.; Boyle, P. , *Cancer Incidence in Five Continents Volume IX*. 2007: IARC Scientific Publication No. 160.
22. Howlader, N.N., A.M.; Krapcho, M.; Garshell, J.; Neyman, N.; Altekruse, S.F.; Kosary, C.L.; Yu, M.; Ruhl, J.; Tatalovich, Z.; Cho, H.; Mariotto, A.; Lewis, D.R.; Chen, H.S.;

- Feuer, E.J.; Cronin, K.A. , *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*. 2013, Bethesda, MD: National Cancer Institute.
23. Copeland, G.L., A.; Firth, R.; Wohler, B.; Wu, X.C.; Schymura, M.; Hofferkamp, J.; Sherman, R.; Kohler, B., *Cancer in North America: 2008-2012. Volume One: Combined Cancer Incidence for the United States, Canada and North America*. 2015, Springfield, IL: North American Association of Central Cancer Registries, Inc.
 24. La Vecchia, C., et al., *Thyroid cancer mortality and incidence: A global overview*. International Journal of Cancer, 2015. **136**(9): p. 2187-2195.
 25. Kilfoy, B.A., et al., *International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002*. Cancer Causes Control, 2009. **20**(5): p. 525-31.
 26. Hussain, F., et al., *Incidence of thyroid cancer in the Kingdom of Saudi Arabia, 2000-2010*. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2013. **6**(2): p. 58-64.
 27. Rahib, L., et al., *Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States*. Cancer Res, 2014. **74**(11): p. 2913-21.
 28. Ito, Y., et al., *Increasing incidence of thyroid cancer: controversies explored*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(3): p. 178-84.
 29. Welch, H.G. and W.C. Black, *Overdiagnosis in cancer*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(9): p. 605-13.
 30. Morris, L.G., et al., *The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care*. Thyroid, 2013. **23**(7): p. 885-91.
 31. Davies, L., et al., *The increasing incidence of small thyroid cancers: where are the cases coming from?* Laryngoscope, 2010. **120**(12): p. 2446-51.
 32. Ito, Y., et al., *An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients*. World J Surg, 2010. **34**(1): p. 28-35.
 33. Pellegriti, G., et al., *Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors*. J Cancer Epidemiol, 2013. **2013**: p. 965212.
 34. Jung, C.K., et al., *The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(2): p. E276-85.
 35. Slijepcevic, N., et al., *Rising incidence of thyroid cancer in Serbia*. Hippokratia, 2016. **20**(1): p. 9-13.
 36. Hedinger, C., E.D. Williams, and L.H. Sobin, *The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition*. Cancer, 1989. **63**(5): p. 908-11.
 37. Nikiforov, Y.E. and M.N. Nikiforova, *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(10): p. 569-80.
 38. Bisi, H., et al., *The prevalence of unsuspected thyroid pathology in 300 sequential autopsies, with special reference to the incidental carcinoma*. Cancer, 1989. **64**(9): p. 1888-93.
 39. McHenry, C.R. and R. Phitayakorn, *Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland*. Oncologist, 2011. **16**(5): p. 585-93.
 40. Lloyd, R.V., *Endocrine pathology : differential diagnosis and molecular advances*. 2nd ed. 2010, New York: Springer. xii, 607 p.
 41. Lloyd, R.V., D. Buehler, and E. Khanafshar, *Papillary thyroid carcinoma variants*. Head Neck Pathol, 2011. **5**(1): p. 51-6.
 42. Muro-Cacho, C.K., N., *Endocrine Surgery of the Head and Neck.*, P.M. Pellitteri, T., Editor. 2002, Singular Publishing Group, Inc: San Diego, CA. p. 21-47.
 43. Albores-Saavedra, J. and J. Wu, *The many faces and mimics of papillary thyroid carcinoma*. Endocr Pathol, 2006. **17**(1): p. 1-18.

44. DeLellis, R.A., *Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. World Health Organization classification of tumours. 2004, Lyon: IARC Press. 320 p.
45. Sobrinho-Simoes, M., et al., *Follicular thyroid carcinoma*. *Mod Pathol*, 2011. **24 Suppl 2**: p. S10-8.
46. Schmidt, R.J. and C.A. Wang, *Encapsulated follicular carcinoma of the thyroid: diagnosis, treatment, and results*. *Surgery*, 1986. **100**(6): p. 1068-77.
47. D'Avanzo, A., et al., *Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis*. *Cancer*, 2004. **100**(6): p. 1123-9.
48. Bhattacharyya, N., *A population-based analysis of survival factors in differentiated and medullary thyroid carcinoma*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. **128**(1): p. 115-23.
49. Diklić, A., *Savremeno hirurško lečenje diferentovanih malignih tumora štitaste žlezde – šta smo postigli u toku poslednje dve decenije*. *Medicinski glasnik*, 2011: p. 32-44.
50. Ganly, I., et al., *Genomic dissection of Hurthle cell carcinoma reveals a unique class of thyroid malignancy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(5): p. E962-72.
51. Chindris, A.M., et al., *Clinical and molecular features of Hurthle cell carcinoma of the thyroid*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(1): p. 55-62.
52. Tuttle, R.M., et al., *Thyroid carcinoma, version 2.2014*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2014. **12**(12): p. 1671-80; quiz 1680.
53. McLeod, M.K. and N.W. Thompson, *Hurthle cell neoplasms of the thyroid*. *Otolaryngol Clin North Am*, 1990. **23**(3): p. 441-52.
54. Nagar, S., et al., *Hurthle cell carcinoma: an update on survival over the last 35 years*. *Surgery*, 2013. **154**(6): p. 1263-71; discussion 1271.
55. Akaishi, J., et al., *Prognostic factors and treatment outcomes of 100 cases of anaplastic thyroid carcinoma*. *Thyroid*, 2011. **21**(11): p. 1183-9.
56. Carcangiu, M.L., et al., *Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases*. *Am J Clin Pathol*, 1985. **83**(2): p. 135-58.
57. Katoh, H., et al., *Classification and General Considerations of Thyroid Cancer*. *Annals of Clinical Pathology*, 2015. **3**(1): p. 1045.
58. Hedayati, M., et al., *Diversity of mutations in the RET proto-oncogene and its oncogenic mechanism in medullary thyroid cancer*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2016. **53**(4): p. 217-27.
59. Stankovic, V., et al., *[Medullary carcinoma of the thyroid gland: effect of postoperative transcutaneous radiotherapy on local control and results of treatment]*. *Acta Chir Jugosl*, 2003. **50**(3): p. 125-30.
60. Ponder, B.A., et al., *Family screening in medullary thyroid carcinoma presenting without a family history*. *Q J Med*, 1988. **67**(252): p. 299-308.
61. Hyer, S.L., et al., *Medullary thyroid cancer: multivariate analysis of prognostic factors influencing survival*. *Eur J Surg Oncol*, 2000. **26**(7): p. 686-90.
62. Xing, M., B.R. Haugen, and M. Schlumberger, *Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer*. *Lancet*, 2013. **381**(9871): p. 1058-69.
63. Cibas, E.S., S.Z. Ali, and N.C.I.T.F.S.o.t.S. Conference, *The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology*. *Am J Clin Pathol*, 2009. **132**(5): p. 658-65.
64. Yassa, L., et al., *Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation*. *Cancer*, 2007. **111**(6): p. 508-16.
65. Baloch, Z.W., et al., *Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology*. *Diagn Cytopathol*, 2002. **26**(1): p. 41-4.
66. Logani, S., et al., *Thyroid nodules with FNA cytology suspicious for follicular variant of papillary thyroid carcinoma: follow-up and management*. *Diagn Cytopathol*, 2000. **23**(6): p. 380-5.

67. Yang, J., et al., *Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations*. *Cancer*, 2007. **111**(5): p. 306-15.
68. Ralhan, R., et al., *Immunohistochemical Subcellular Localization of Protein Biomarkers Distinguishes Benign from Malignant Thyroid Nodules: Potential for Fine-Needle Aspiration Biopsy Clinical Application*. *Thyroid*, 2015. **25**(11): p. 1224-34.
69. Eszlinger, M., et al., *Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(9): p. 3286-94.
70. LiVolsi, V.A. and Z.W. Baloch, *Follicular-patterned tumors of the thyroid: the battle of benign vs. malignant vs. so-called uncertain*. *Endocr Pathol*, 2011. **22**(4): p. 184-9.
71. Jameson, J.L., *Minimizing unnecessary surgery for thyroid nodules*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(8): p. 765-7.
72. Bomeli, S.R., S.O. LeBeau, and R.L. Ferris, *Evaluation of a thyroid nodule*. *Otolaryngol Clin North Am*, 2010. **43**(2): p. 229-38, vii.
73. Clark, P.M., *An evaluation of serum thyroglobulin assays for the detection of recurrent differentiated thyroid carcinoma*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(11): p. 738-9.
74. Baloch, Z., et al., *Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease*. *Thyroid*, 2003. **13**(1): p. 3-126.
75. Jonklaas, J., et al., *Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy*. *Thyroid*, 2006. **16**(12): p. 1229-42.
76. Boelaert, K., et al., *Serum thyrotropin concentration as a novel predictor of malignancy in thyroid nodules investigated by fine-needle aspiration*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(11): p. 4295-301.
77. McLeod, D.S., et al., *Thyrotropin and thyroid cancer diagnosis: a systematic review and dose-response meta-analysis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(8): p. 2682-92.
78. de Matos, P.S., et al., *Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy*. *Histopathology*, 2005. **47**(4): p. 391-401.
79. de Micco, C., et al., *Utility of malignancy markers in fine-needle aspiration cytology of thyroid nodules: comparison of Hector Battifora mesothelial antigen-1, thyroid peroxidase and dipeptidyl aminopeptidase IV*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(4): p. 818-23.
80. Sack, M.J., et al., *HBME-1 immunostaining in thyroid fine-needle aspirations: a useful marker in the diagnosis of carcinoma*. *Mod Pathol*, 1997. **10**(7): p. 668-74.
81. Barondes, S.H., et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. *Cell*, 1994. **76**(4): p. 597-8.
82. Ahmad, N., et al., *Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(12): p. 10841-7.
83. Asa, S.L., *The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid*. *Endocr Pathol*, 2005. **16**(4): p. 295-309.
84. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. *Cell*, 1982. **31**(1): p. 11-24.
85. Malhotra, R., et al., *Correlation of Cyfra 21-1 levels in saliva and serum with CK19 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma*. *Tumor Biology*, 2016. **37**(7): p. 9263-9271.
86. Erkiř, S., A. Aydın, and N. Emrah Koçer, *Diagnostic utility of cytokeratin 19 expression in multinodular goiter with papillary areas and papillary carcinoma of thyroid*. *Endocrine Pathology*, 2002. **13**(3): p. 207-211.
87. Grogan, R.H., E.J. Mitmaker, and O.H. Clark, *The evolution of biomarkers in thyroid cancer-from mass screening to a personalized biosignature*. *Cancers (Basel)*, 2010. **2**(2): p. 885-912.

88. Prasad, M.L., et al., *Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors*. *Mod Pathol*, 2005. **18**(1): p. 48-57.
89. Gandolfi, G., et al., *Time to re-consider the meaning of BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(5): p. 1001-11.
90. Karga, H., et al., *Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991. **73**(4): p. 832-6.
91. Riesco-Eizaguirre, G. and P. Santisteban, *New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy*. *Endocr Relat Cancer*, 2007. **14**(4): p. 957-77.
92. Kroll, T.G., et al., *PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]*. *Science*, 2000. **289**(5483): p. 1357-60.
93. Nikiforova, M.N., et al., *PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses*. *Am J Surg Pathol*, 2002. **26**(8): p. 1016-23.
94. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma*. *Cell*, 2014. **159**(3): p. 676-90.
95. Kunstman, J.W., et al., *Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(8): p. 2318-29.
96. Hofstra, R.M., et al., *A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma*. *Nature*, 1994. **367**(6461): p. 375-6.
97. Nikiforov, Y.E., et al., *Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(6): p. 2092-8.
98. Nikiforov, Y.E., et al., *Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(11): p. 3390-7.
99. Nikiforov, Y.E., et al., *Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay*. *Cancer*, 2014. **120**(23): p. 3627-34.
100. Nikiforov, Y.E., et al., *Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology*. *Thyroid*, 2015. **25**(11): p. 1217-23.
101. Kebebew, E., et al., *Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms*. *Cancer*, 2006. **106**(12): p. 2592-7.
102. Prasad, N.B., et al., *Three-gene molecular diagnostic model for thyroid cancer*. *Thyroid*, 2012. **22**(3): p. 275-84.
103. Chudova, D., et al., *Molecular classification of thyroid nodules using high-dimensionality genomic data*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(12): p. 5296-304.
104. Alexander, E.K., et al., *Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(8): p. 705-15.
105. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
106. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
107. Pallante, P., et al., *MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(2): p. 497-508.
108. Nikiforova, M.N., et al., *MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(5): p. 1600-8.

109. Yu, S., et al., *Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(6): p. 2084-92.
110. Labourier, E., et al., *Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(7): p. 2743-50.
111. Nishino, M., *Molecular cytopathology for thyroid nodules: A review of methodology and test performance*. Cancer Cytopathol, 2016. **124**(1): p. 14-27.
112. Paskas, S., et al., *Malignant risk stratification of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology based on molecular testing*. Cancer Cytopathol, 2015. **123**(8): p. 471-9.
113. Razani, B., S.E. Woodman, and M.P. Lisanti, *Caveolae: from cell biology to animal physiology*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(3): p. 431-67.
114. Staubach, S. and F.G. Hanisch, *Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer*. Expert Rev Proteomics, 2011. **8**(2): p. 263-77.
115. Burgermeister, E., et al., *Caveats of caveolin-1 in cancer progression*. Cancer Lett, 2008. **268**(2): p. 187-201.
116. Goetz, J.G., et al., *Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(4): p. 715-35.
117. Bastiani, M. and R.G. Parton, *Caveolae at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 22): p. 3831-6.
118. Aldred, M.A., et al., *Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes*. J Clin Oncol, 2004. **22**(17): p. 3531-9.
119. Ito, Y., et al., *Caveolin-1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma of the thyroid*. Br J Cancer, 2002. **86**(6): p. 912-6.
120. Ito, Y., et al., *Caveolin-1 and 14-3-3 sigma expression in follicular variant of thyroid papillary carcinoma*. Pathol Res Pract, 2005. **201**(8-9): p. 545-9.
121. Aldred, M.A., et al., *Caveolin-1 and caveolin-2, together with three bone morphogenetic protein-related genes, may encode novel tumor suppressors down-regulated in sporadic follicular thyroid carcinogenesis*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2864-71.
122. Kim, D., H. Kim, and J.S. Koo, *Expression of caveolin-1, caveolin-2 and caveolin-3 in thyroid cancer and stroma*. Pathobiology, 2012. **79**(1): p. 1-10.
123. Shankar, J., et al., *Coordinated expression of galectin-3 and caveolin-1 in thyroid cancer*. J Pathol, 2012. **228**(1): p. 56-66.
124. Bruce Alberts, J.L., Alexander Johnson, Martin Rafi, Keith Roberts, and Peter Walter., *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. ed. 2008, New York: Garland science.
125. Collins, B.M., et al., *Structure-based reassessment of the caveolin signaling model: do caveolae regulate signaling through caveolin-protein interactions?* Dev Cell, 2012. **23**(1): p. 11-20.
126. Witkiewicz, A.K., et al., *Molecular profiling of a lethal tumor microenvironment, as defined by stromal caveolin-1 status in breast cancers*. Cell Cycle, 2011. **10**(11): p. 1794-809.
127. Patani, N., et al., *The role of caveolin-1 in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **131**(1): p. 1-15.
128. Witkiewicz, A.K., et al., *Towards a new "stromal-based" classification system for human breast cancer prognosis and therapy*. Cell Cycle, 2009. **8**(11): p. 1654-8.
129. Li, T., et al., *Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status*. Am J Pathol, 2006. **168**(6): p. 1998-2013.
130. Bartz, R., et al., *Caveolin-1 secreting LNCaP cells induce tumor growth of caveolin-1 negative LNCaP cells in vivo*. Int J Cancer, 2008. **122**(3): p. 520-5.

131. Yang, G., et al., *Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker*. *Cancer Res*, 1999. **59**(22): p. 5719-23.
132. Thompson , T.C., et al., *Local and Distant Effects of Caveolin-1 on Prostate Cancer Progression, in Caveolins in Cancer Pathogenesis, Prevention and Therapy*, I. Mercier, J.F. Jasmin, and M.P. Lisanti, Editors. 2012, Springer Science+Business Media, LLC. p. 1 - 13.
133. Ullrich, A., et al., *Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells*. *Nature*, 1984. **309**(5967): p. 418-425.
134. Roskoski, R., Jr., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. *Pharmacol Res*, 2014. **79**: p. 34-74.
135. Pines, G., W.J. Kostler, and Y. Yarden, *Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(12): p. 2699-706.
136. Lurje, G. and H.J. Lenz, *EGFR signaling and drug discovery*. *Oncology*, 2009. **77**(6): p. 400-10.
137. Seshacharyulu, P., et al., *Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy*. *Expert Opin Ther Targets*, 2012. **16**(1): p. 15-31.
138. Sigismund, S., et al., *Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation*. *Dev Cell*, 2008. **15**(2): p. 209-19.
139. Khan, E.M., et al., *Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 14486-93.
140. Schiff, B.A., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(24): p. 8594-602.
141. Lee, D.H., et al., *Epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma*. *J Clin Pathol*, 2007. **60**(8): p. 881-4.
142. Sharma, G.K., et al., *Overexpression of EphB4, EphrinB2, and epidermal growth factor receptor in papillary thyroid carcinoma: A pilot study*. *Head Neck*, 2015. **37**(7): p. 964-9.
143. Chen, D., et al., *Expression of the estrogen receptor alpha, progesterone receptor and epidermal growth factor receptor in papillary thyroid carcinoma tissues*. *Oncol Lett*, 2015. **10**(1): p. 317-320.
144. Landriscina, M., et al., *Epidermal growth factor receptor 1 expression is upregulated in undifferentiated thyroid carcinomas in humans*. *Thyroid*, 2011. **21**(11): p. 1227-34.
145. Fisher, K.E., et al., *Epidermal growth factor receptor overexpression is a marker for adverse pathologic features in papillary thyroid carcinoma*. *J Surg Res*, 2013. **185**(1): p. 217-24.
146. Masago, K., et al., *Epidermal growth factor receptor gene mutations in papillary thyroid carcinoma*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(11): p. 2744-9.
147. Mitsiades, C.S., et al., *Epidermal Growth Factor Receptor as a Therapeutic Target in Human Thyroid Carcinoma: Mutational and Functional Analysis*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006. **91**(9): p. 3662-3666.
148. Ricarte-Filho, J.C., et al., *Absence of common activating mutations of the epidermal growth factor receptor gene in thyroid cancers from American and Japanese patients*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(9): p. 2215-7; author reply 2217-8.
149. Nobuhara, Y., et al., *Efficacy of epidermal growth factor receptor-targeted molecular therapy in anaplastic thyroid cancer cell lines*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(6): p. 1110-6.

150. Lim, Y.C. and Y.Y. Cha, *Epigallocatechin-3-gallate induces growth inhibition and apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells through suppression of EGFR/ERK pathway and cyclin B1/CDK1 complex*. J Surg Oncol, 2011. **104**(7): p. 776-80.
151. Zhang, L., et al., *Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces potent suppression of tumor growth and metastasis in anaplastic thyroid cancer*. Oncotarget, 2015.
152. Maurizi, M., et al., *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 1996. **74**(8): p. 1253-7.
153. Mellon, K., et al., *Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer*. J Urol, 1995. **153**(3 Pt 2): p. 919-25.
154. Inada, S., et al., *Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor)*. Surg Today, 1999. **29**(6): p. 493-503.
155. Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, *EGFR and cancer prognosis*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S9-15.
156. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
157. Travis, W.D., E. Brambilla, and G.J. Riely, *New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 992-1001.
158. Shigematsu, H. and A.F. Gazdar, *Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 257-62.
159. Fountzilias, G., et al., *Gemcitabine combined with gefitinib in patients with inoperable or metastatic pancreatic cancer: a phase II Study of the Hellenic Cooperative Oncology Group with biomarker evaluation*. Cancer Invest, 2008. **26**(8): p. 784-93.
160. Sithanandam, G., et al., *B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man*. Oncogene, 1992. **7**(4): p. 795-9.
161. Wan, P.T., et al., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. Cell, 2004. **116**(6): p. 855-67.
162. Ziai, J. and P. Hui, *BRAF mutation testing in clinical practice*. Expert Rev Mol Diagn, 2012. **12**(2): p. 127-38.
163. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
164. Caronia, L.M., J.E. Phay, and M.H. Shah, *Role of BRAF in thyroid oncogenesis*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(24): p. 7511-7.
165. Tiacci, E., et al., *BRAF mutations in hairy-cell leukemia*. N Engl J Med, 2011. **364**(24): p. 2305-15.
166. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 19-20.
167. Bouzourene, H., et al., *Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation*. Fam Cancer, 2010. **9**(2): p. 167-72.
168. Domingo, E., et al., *BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing*. J Med Genet, 2004. **41**(9): p. 664-8.
169. Xing, M., *BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications*. Endocr Rev, 2007. **28**(7): p. 742-62.
170. Chung, K.W., et al., *Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **65**(5): p. 660-6.

171. Sapio, M.R., et al., *Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings*. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **66**(5): p. 678-83.
172. Zatelli, M.C., et al., *BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsies*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(3): p. 467-73.
173. Nikiforova, M.N., et al., *BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(11): p. 5399-404.
174. Begum, S., et al., *BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment*. Mod Pathol, 2004. **17**(11): p. 1359-63.
175. Costa, A.M., et al., *BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **68**(4): p. 618-34.
176. Hyeon, J., et al., *The prediction of malignant risk in the category "atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance" of the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology using subcategorization and BRAF mutation results*. Cancer Cytopathol, 2014. **122**(5): p. 368-76.
177. Adeniran, A.J., et al., *BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration specimens enhances the predictability of malignancy in thyroid follicular lesions of undetermined significance*. Acta Cytol, 2011. **55**(6): p. 570-5.
178. Danilovic, D.L., et al., *Pre-operative role of BRAF in the guidance of the surgical approach and prognosis of differentiated thyroid carcinoma*. Eur J Endocrinol, 2014. **170**(4): p. 619-25.
179. Kleiman, D.A., et al., *Preoperative BRAF(V600E) mutation screening is unlikely to alter initial surgical treatment of patients with indeterminate thyroid nodules: a prospective case series of 960 patients*. Cancer, 2013. **119**(8): p. 1495-502.
180. Kim, T.H., et al., *The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis*. Cancer, 2012. **118**(7): p. 1764-73.
181. Xing, M., et al., *Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(1): p. 42-50.
182. Xing, M., et al., *Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer*. JAMA, 2013. **309**(14): p. 1493-501.
183. Romei, C., R. Ciampi, and R. Elisei, *A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(4): p. 192-202.
184. Santoro, M., et al., *Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma*. Oncogene, 1994. **9**(2): p. 509-16.
185. Elisei, R., et al., *RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(7): p. 3211-6.
186. Nikiforov, Y.E., et al., *Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children*. Cancer Res, 1997. **57**(9): p. 1690-4.
187. Nikiforov, Y.E., *Molecular analysis of thyroid tumors*. Mod Pathol, 2011. **24 Suppl 2**: p. S34-43.
188. Ishizaka, Y., et al., *Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method*. Oncogene, 1991. **6**(9): p. 1667-72.

189. Guerra, A., et al., *Prevalence of RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid nodules and its clinical application*. *Endocr J*, 2011. **58**(1): p. 31-8.
190. Rhoden, K.J., et al., *RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(6): p. 2414-23.
191. Zhu, Z., et al., *Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(9): p. 3603-10.
192. Thomas, G.A., et al., *High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(11): p. 4232-8.
193. Romei, C., et al., *BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. **15**(2): p. 511-20.
194. Jhiang, S.M. and E.L. Mazzaferri, *The ret/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma*. *J Lab Clin Med*, 1994. **123**(3): p. 331-7.
195. Pedersen, M.W., et al., *The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy*. *Ann Oncol*, 2001. **12**(6): p. 745-60.
196. Gan, H.K., A.N. Cvrljevic, and T.G. Johns, *The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered*. *FEBS J*, 2013. **280**(21): p. 5350-70.
197. Huang, H.S., et al., *The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(5): p. 2927-35.
198. Shinojima, N., et al., *Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme*. *Cancer Res*, 2003. **63**(20): p. 6962-70.
199. Mellinghoff, I.K., et al., *Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(19): p. 2012-24.
200. Heimberger, A.B., et al., *Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(4): p. 1462-6.
201. Jungbluth, A.A., et al., *A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(2): p. 639-44.
202. Jeuken, J., et al., *Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(4): p. 661-71.
203. Nikiforova, M.N., et al., *Targeted next-generation sequencing panel (GliSeq) provides comprehensive genetic profiling of central nervous system tumors*. *Neuro Oncol*, 2016. **18**(3): p. 379-87.
204. Ge, H., X. Gong, and C.K. Tang, *Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis*. *Int J Cancer*, 2002. **98**(3): p. 357-61.
205. Moscatello, D.K., et al., *Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors*. *Cancer Res*, 1995. **55**(23): p. 5536-9.
206. Wikstrand, C.J., et al., *Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas*. *Cancer Res*, 1995. **55**(14): p. 3140-8.

207. Nieto, Y., et al., *Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and the presence of truncated EGFRvIII in locoregionally advanced breast cancer.* J Clin Oncol, 2007. **25**(28): p. 4405-13.
208. Tidow, N., et al., *Distinct amplification of an untranslated regulatory sequence in the egfr gene contributes to early steps in breast cancer development.* Cancer Res, 2003. **63**(6): p. 1172-8.
209. Garcia de Palazzo, I.E., et al., *Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas.* Cancer Res, 1993. **53**(14): p. 3217-20.
210. Okamoto, I., et al., *Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer.* Cancer Sci, 2003. **94**(1): p. 50-6.
211. Tang, C.K., et al., *Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer.* Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 3081-7.
212. Omidfar, K., et al., *Expression of EGFRvIII in thyroid carcinoma: immunohistochemical study by camel antibodies.* Immunol Invest, 2009. **38**(2): p. 165-80.
213. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.* Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
214. Basolo, F., et al., *Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(9): p. 4197-205.
215. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
216. Sloan, E.K., et al., *Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer.* Am J Pathol, 2009. **174**(6): p. 2035-43.
217. Koo, J.S., et al., *The impact of caveolin protein expression in tumor stroma on prognosis of breast cancer.* Tumour Biol, 2011. **32**(4): p. 787-99.
218. Witkiewicz, A.K., et al., *Loss of stromal caveolin-1 expression predicts poor clinical outcome in triple negative and basal-like breast cancers.* Cancer Biol Ther, 2010. **10**(2): p. 135-43.
219. Simpkins, S.A., et al., *Clinical and functional significance of loss of caveolin-1 expression in breast cancer-associated fibroblasts.* J Pathol, 2012. **227**(4): p. 490-8.
220. Pavlides, S., et al., *The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma.* Cell Cycle, 2009. **8**(23): p. 3984-4001.
221. Rowe, L.R., B.G. Bentz, and J.S. Bentz, *Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules.* Cytojournal, 2006. **3**: p. 10.
222. Nam, S.Y., et al., *BRAF V600E mutation analysis of thyroid nodules needle aspirates in relation to their ultrasonographic classification: a potential guide for selection of samples for molecular analysis.* Thyroid, 2010. **20**(3): p. 273-9.
223. Baloch, Z.W. and V.A. LiVolsi, *Fine-needle aspiration of thyroid nodules: past, present, and future.* Endocr Pract, 2004. **10**(3): p. 234-41.
224. Kim, S.Y., et al., *What to do with thyroid nodules showing benign cytology and BRAF(V600E) mutation? A study based on clinical and radiologic features using a highly sensitive analytic method.* Surgery, 2015. **157**(2): p. 354-61.
225. Kimura, E.T., et al., *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**(7): p. 1454-7.
226. Trovisco, V., et al., *BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma.* J Pathol, 2004. **202**(2): p. 247-51.

227. Frattini, M., et al., *Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer*. *Oncogene*, 2004. **23**(44): p. 7436-40.
228. Salvatore, G., et al., *Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(10): p. 5175-80.
229. Xing, M., *BRAF mutation in thyroid cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2005. **12**(2): p. 245-62.
230. Lee, J.H., E.S. Lee, and Y.S. Kim, *Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis*. *Cancer*, 2007. **110**(1): p. 38-46.
231. Kebebew, E., et al., *The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer*. *Ann Surg*, 2007. **246**(3): p. 466-70; discussion 470-1.
232. Xing, M., et al., *BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(18): p. 2977-82.
233. Fugazzola, L., et al., *BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004. **61**(2): p. 239-43.
234. Fugazzola, L., et al., *Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(2): p. 455-64.
235. Kim, T.Y., et al., *The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005. **63**(5): p. 588-93.
236. Mineo, C., et al., *Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(20): p. 11930-5.
237. Galbiati, F., et al., *Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade*. *EMBO J*, 1998. **17**(22): p. 6633-48.
238. Goetz, J.G., et al., *Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(6): p. 1261-75.
239. Joshi, B., et al., *Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion*. *Cancer Res*, 2008. **68**(20): p. 8210-20.
240. Quest, A.F., J.L. Gutierrez-Pajares, and V.A. Torres, *Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(4): p. 1130-50.
241. Williams, T.M. and M.P. Lisanti, *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **288**(3): p. C494-506.
242. Lu, Z., et al., *Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion*. *Cancer Cell*, 2003. **4**(6): p. 499-515.
243. Drab, M., et al., *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. *Science*, 2001. **293**(5539): p. 2449-52.
244. Sowa, G., *Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights*. *Front Physiol*, 2012. **2**: p. 120.
245. Corcoran, R.B., et al., *EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(3): p. 227-35.
246. Prahallad, A., et al., *Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR*. *Nature*, 2012. **483**(7387): p. 100-3.
247. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(35): p. 5705-12.

248. De Roock, W., et al., *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(8): p. 753-62.
249. Ohashi, K., et al., *Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(31): p. E2127-33.
250. Yarden, Y. and G. Pines, *The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(8): p. 553-63.
251. Lievre, A., et al., *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 3992-5.
252. Therkildsen, C., et al., *The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis*. *Acta Oncol*, 2014. **53**(7): p. 852-64.
253. Danysh, B.P., et al., *Long-term vemurafenib treatment drives inhibitor resistance through a spontaneous KRAS G12D mutation in a BRAF V600E papillary thyroid carcinoma model*. *Oncotarget*, 2016. **7**(21): p. 30907-23.
254. Milewska, M., et al., *Mitogen-Inducible Gene-6 Mediates Feedback Inhibition from Mutated BRAF towards the Epidermal Growth Factor Receptor and Thereby Limits Malignant Transformation*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0129859.
255. Couet, J., M. Sargiacomo, and M.P. Lisanti, *Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(48): p. 30429-38.
256. Park, J.H. and H.J. Han, *Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt and ERK*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(4): p. C935-44.
257. Kannan, A., et al., *Caveolin-1 promotes gastric cancer progression by up-regulating epithelial to mesenchymal transition by crosstalk of signalling mechanisms under hypoxic condition*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(1): p. 204-15.
258. Overmiller, A.M., et al., *c-Src/Cav1-dependent activation of the EGFR by Dsg2*. *Oncotarget*, 2016.
259. Gu, D., et al., *Caveolin-1 inhibits the growth of human laryngeal squamous cell carcinoma and down regulates EGFR-MAPKs signaling pathway*. *Laryngoscope*, 2007. **117**(10): p. 1782-9.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Јелена Јанковић _____

Број индекса _____ 16/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Анализа протеинских и генетичких биомаркера у преоперативној и постоперативној
диференцијалној дијагностици тумора штитасте жлезде**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____ 31.10.2016. _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Јелена Јанковић _____

Број индекса _____ 16/2011 _____

Студијски програм _____ Доктор биохемијских наука _____

Наслов рада Анализа протеинских и генетичких биомаркера у преоперативној и постоперативној диференцијалној дијагностици тумора штитасте жлезде

Ментор др. Марија Гавровић-Јанкуловић, др. Светлана Паскаш _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 31.10.2016 _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа протеинских и генетичких биомаркера у преоперативној и постоперативној диференцијалној дијагностици тумора штитасте жлезде

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____ 31.10.2016. _____

1. **Ауторство.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Biografija

Jelena Janković je rođena 19. maja 1985. godine u Novom Sadu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Nakon toga je upisala studije biohemije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, koje je odbranom diplomskog rada 2009. godine završila sa prosekom 8,51. Po završetku, osnovnih, upisala je master studije biohemije na istom fakultetu, i odbranom master rada 2010. godine stekla zvanje diplomiranog biohemičara-mastera. Sledeće godine, 2011. upisala se na doktorske studije biohemije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Od januara 2011. godine je zaposlena na Institutu za primenu nuklearne energije - INEP, na projektu „Molekularna karakterizacija tumora štitaste žlezde: biološki i klinički aspekti“ pod rukovodstvom dr Dubravke Cvejić. U februaru 2013. je izabrana za istraživača saradnika.

Od 2011. godine je član Biohemijskog društva Srbije.

Jelena je koautor na pet radova štampanih u međunarodnim časopisima, tri saopštenja na međunarodnim skupovima i jednog na domaćem skupu.