

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Duško M. Dunderović

ZNAČAJ EKSPRESIJE MARKERA
NEOANGIOGENEZE U
PATOHIŠTOLOŠKOJ DIJAGNOZI
NODULARNIH LEZIJA ŠTITASTE ŽLEZDE
POREKLA FOLIKULARNIH ČELIJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2015. godina

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Duško M. Dunderović

ZNAČAJ EKSPRESIJE MARKERA
NEOANGIOGENEZE U
PATOHIŠTOLOŠKOJ DIJAGNOZI
NODULARNIH LEZIJA ŠTITASTE ŽLEZDE
POREKLA FOLIKULARNIH ĆELIJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2015. godina

Mentor

- Prof. dr Svetislav Tatić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski Fakultet

Članovi komisije:

- Prof. dr Jasmina Marković Lipkovski, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski Fakultet
- Prof. dr Ivan Boričić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski Fakultet
- Prof. dr Slavica Knežević Ušaj, Univerzitet u Novom Sadu,
Medicinski Fakultet

REZIME

Uvod: Nodusi štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija su česti i dele brojne zajedničke morfološke osobine, koje otežavaju histološku diferencijalnu dijagnozu na H/E obojenim preparatima. Rastući broj imunohistohemijskih markera je u procesu testiranja, a neki poput CD56, Hector Battifora mesothelial-1(HBME-1), galectin-3 (Gal-3) i CK19 su obećavajući u diferencijalno dijagnostičkom smislu, ali do sad, pojedinačno, nijedan od njih nije dovoljno konkluzivan. Poznato je da PTC ima sklonost ka intratiroidnom širenju posredstvom limfatika, i dalje, dajući metastaze u regionalne limfne noduse, dok FTC uglavnom metastaziraju hematogeno. Ove razlike nisu u potpunosti razjašnjene, ali mogu imati veze sa angiogenezom, glavnim faktorom tumorskog razvoja i progresije. Angiogeneza u tumorima štitaste žlezde je posledica povećane ekspresije različitih faktora koji promovišu de novo sintezu krvnih sudova, dok je ekspresija limfangiogenih faktora značajno povećana samo u PTC-u .

Ciljevi: Da se ispita i uporedi ekspresija CD31, D2-40, CK19, CD56, Galectin-3, HBME-1, u benignim i malignim lezijama štitaste žlezde, porekla folikularnih ćelija, koje se prezentuju klinički kao nodusi. Da se odredi značaj pojedinačne i kombinovane ekspresije markera neoangiogeneze (CD31, D2-40) i drugih markera (CK19, CD56, Galectin-3, HBME-1) za procenu malignog potencijala lezija štitaste žlezde.

Metodologija: Istraživanje je dizajnirano kao studija preseka. Kompletno ispitivanje sprovedeno je na uzorku od 201 slučaja, hirurški tretiranih zbog nodusa štitaste žlezde, u Centru za endokrinu u periodu od 2010- 2013. godine. Konstruisan je tkivni mikroniz, po selekciji reprezentativnih kalupa. Molekularni markeri su ispitivani metodom imunohistohemije. Dobijeni podaci analizirani su odgovarajućim statističkim metodama.

Rezultati: Ekspresija CK19, HBME-1, Galectin-3 je bila prisutna u 75%, 71.3%, 88.5% malignih tumora. Gubitak ekspresije CD56 je uočen u 58.2% malignih tumora. Razlika u opštoj mikrovaskularnoj gustini između benignih i malignih lezija je statistički značajna, nasuprot limfovaskularnoj gustini gde nije pokazana značajna razlika između benignih i malignih lezija.

Zaključak: Galektin 3 je najsenzitivniji marker za malignitet, dok je odsustvo ekspresije CD56 veoma specifično za malignitet. Očekivana koekspresija za kombinacije markera u dijagnostici folikularnih lezija smanjuje senzitivnost i povećava specifičnost za malignitet. Određivanje mikrovaskularne gustine u dijagnostičkom algoritmu predstavlja bitnu alatku za diskriminaciju benignih od malignih lezija porekla folikularnih ćelija.

ABSTRACT

Introduction: Follicular cell derived nodules of thyroid gland are common and share many morphological features, which makes histological differential diagnosis difficult on HE stained slides. Increasing number of immunohistochemical markers are being tested, and some are promising like CD56, Hectortin 1 (HBME-1), Galectin 3 (Gal-3) and Cytokeratin 19 (CK19) considering differential diagnosis, nevertheless, none of them is individually conclusive. It has been known that papillary thyroid carcinoma has propensity to metastasize through lymphatics into regional lymph nodes, while follicular thyroid carcinoma gives hematogenous metastases. These differences are not completely explained, but it might have been related to angiogenesis, due to overexpression of different angiogenesis-promoting factors, while expression of lymphangiogenic factors is significantly increased only in papillary thyroid carcinomas.

Aims: To investigate and to compare expression of CD31, D2-40, CK19, CD56, Galectin-3, HBME-1 in benign and malignant follicular cell's derived thyroid nodules. To determine the significance of single and combined expression of angiogenesis (CD31, D2-40) and other markers (CK19, CD56, Galectin-3, HBME-1) in the evaluation of malignant potential in thyroid gland lesions.

Methodology: This retrospective study was conducted on 201 cases of thyroid lesions, surgically treated for nodules of thyroid gland, in Center for endocrine surgery, from 2010-2013 year. Tissue microarray has been constructed. Immunohistochemistry was used for evaluation of molecular markers expression. Obtained data were analyzed with proper statistical methods.

Results: Expression of CK19, HBME-1, Galectin-3 was present in 75%, 71.3%, 88.5% malignant tumors (respectively). CD56 expression was lost in 58.2% of malignant lesions. Statistically significant difference was found between general microvascular density in benign and malignant thyroid lesions. There is no significant difference in lymphovascular density between benign and malignant thyroid lesions.

Conclusions: Galectin 3 is most sensitive marker for malignancy, while absence of expression of CD56 is very specific for malignancy. Expected co-expression for combinations of markers in diagnostics of follicular lesions decrease sensitivity and

increase specificity for malignancy. General microvascular density determination represent important tool for discrimination between benign and malignant thyroid lesions.

SADRŽAJ:

1. UVOD	10
1.1. <u>Epidemiologija nodusa štitaste žlezde</u>	10
1.2. <u>Nodularne lezije štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija</u>	11
1.2.1. <u>Tumori</u>	12
1.2.1.1. <u>Folikularni adenoma</u>	12
1.2.1.2. <u>Papilarni karcinom štitaste žlezde</u>	16
1.2.1.3. <u>Folikularni karcinom</u>	23
1.2.1.4. <u>Tumori Hirtleovih ćelija</u>	26
1.2.1.5. <u>Genetika tumora štitaste žlezde</u>	28
1.2.1.5.1. <u>Prognostički i terapijski značaj genetskih markera</u>	30
1.2.1.6. <u>Tumorima nalik lezije</u>	31
1.3. <u>Molekularne metode dijagnostike nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija</u>	31
1.3.1. <u>Citokeratin 19</u>	31
1.3.2. <u>Galectin 3</u>	32
1.3.3. <u>HBME-1</u>	33
1.3.4. <u>CD56</u>	33
1.4. <u>Angiogeneza u tumorima štitaste žlezde</u>	34
1.5. <u>Tkivni mikroniz</u>	37
2. <u>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</u>	40
3. <u>MATERIJALI I METODE</u>	41
3.1. <u>Materijal</u>	41
3.2. <u>Metode rada</u>	41
3.2.1. <u>Konstrukcija tkivnog mikroniza</u>	42
3.2.2. <u>Imunohistohemijska metoda</u>	43
3.2.2.1. <u>Imunohistohemijska analiza ekspresije citokeratina 19</u>	45
3.2.2.2. <u>Imunohistohemijska analiza ekspresije HBME-1</u>	45
3.2.2.3. <u>Imunohistohemijska analiza ekspresije Galectin-3</u>	45
3.2.2.4. <u>Imunohistohemijska analiza ekspresije CD56</u>	45
3.2.2.5. <u>Imunohistohemijska analiza ekspresije CD31</u>	46
3.2.2.6. <u>Imunohistohemijska analiza ekspresije D2-40</u>	47

3.3. <u>Statistička analiza</u>	<u>48</u>
4. <u>REZULTATI</u>	<u>49</u>
4.1. <u>Demografske karakteristike ispitanika</u>	<u>49</u>
4.2. <u>Kliničko patološke karakteristike ispitivanog uzorka</u>	<u>51</u>
4.3. <u>Ekspresija citokeratina 19 (CK19)</u>	<u>53</u>
4.3.1. <u>Dijagnostička upotrebljivost CK19 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne</u>	<u>58</u>
4.4. <u>Ekspresija HBME-1</u>	<u>59</u>
4.4.1. <u>Dijagnostička upotrebljivost HBME-1 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne</u>	<u>63</u>
4.5. <u>Ekspresija Galectin-3</u>	<u>64</u>
4.5.1. <u>Dijagnostička upotrebljivost Galectin-3 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne</u>	<u>68</u>
4.6. <u>Ekspresija CD56</u>	<u>69</u>
4.6.1. <u>Dijagnostička upotrebljivost CD56 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne</u>	<u>72</u>
4.7. <u>Dijagnostička valjanost kombinacija različitih markera</u>	<u>73</u>
4.8. <u>Opšta mikrovaskularna gustina (CD31)</u>	<u>77</u>
4.9. <u>Limfovaskularna gustina – LVD (D2-40)</u>	<u>91</u>
5. <u>DISKUSIJA</u>	<u>101</u>
6. <u>ZAKLJUČCI</u>	<u>127</u>
7. <u>REFERENCE</u>	<u>132</u>
8. <u>BIOGRAFIJA</u>	<u>158</u>

Značaj ekspresije markera neoangiogeneze u patohistološkoj dijagnozi nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija

1. UVOD

1.1. Epidemiologija nodusa štitaste žlezde

Nodusi štitaste žlezde su čest klinički nalaz, sa procenjenom prevalencom na osnovu palpacije, koja varira od 3%-7% (1). Upotrebom ultrazvučne dijagnostike, prevalenca klinički nepalpabilnih nodusa štitaste žlezde varira od 20% do 76% unutar opšte populacije, što je slično prevalenci dobijenoj uvidom u autopsijske izveštaje (2).

Povrh toga, kod 20-48% pacijenata sa jednim palpabilnim nodusom štitaste žlezde, prilikom dijagnostike ultrazvukom, je nađeno da imaju dodatne noduse (2).

Nodusi su česti kod starijih osoba, u žena, kod osoba sa deficijencijom joda, i kod onih koji imaju istoriju izlaganja zračenju. Procenjena godišnja stopa incidencije od 0,1% u Sjedinjenim Američkim Državama sugerše da se 300000 novih nodusa detektuje u ovoj državi svake godine (3).

I benigna i maligna oboljenja mogu dovesti do pojave nodusa unutar štitaste žlezde. Iz tih razloga, klinički značaj novootkrivenih nodusa štitaste žlezde je prvenstveno u isključivanju malignih lezija štitaste žlezde. Mada je većina nodusa benigno, 4-5% nodusa su maligni (4).

U odnosu na osobitosti nodusa štitaste žlezde na ultrazvuku, najveći rizik za malignitet pokazuju nodusi čija je visina veća od širine, zatim odsustvo „halo“ znaka, prisustvo mikrokalcifikacija i iregularnih ivica. U odnosu na kliničke osobitosti, najveći rizik nose nodusi kod osoba sa familijarnom istorijom karcinoma štitaste žlezde (5).

Incidentalomi štitaste žlezde se definišu kao neočekivani asimptomatski tumori štitaste žlezde, otkriveni postupcima preduzetim u cilju ispitivanja drugih struktura vrata (6).

Poredeći sa drugim malignim tumorima, karcinomi štitaste žlezde su prilično česti, i predstavljaju 3,8% od svih novih slučajeva kancera u SAD-u. Karcinomi štitaste žlezde su češći kod žena nego kod muškaraca, i česti su kod onih sa familijarnom

istorijom bolesti štitaste žlezde. Broj novih slučajeva karcinoma štitaste žlezde za ispitivani petogodišnji period (2007-2011), na 100000 muškaraca i žena, po godini je bio 12,9. Stopa smrtnosti se povećava sa godinama života. Za isti period (2007-2011) stopa smrtnosti od karcinoma štitaste žlezde je iznosila 0,5 na 100000 muškaraca i žena, po godini. Koristeći statističke modele za analizu, stope za nove slučajeve karcinoma štitaste žlezde su rasle u proseku 5,5% svake godine u proteklih deset godina. Stope smrtnosti su rasle u proseku 0,8% svake godine, za period 2002-2011 godine. Procenat pacijenata sa petogodišnjim preživljavanjem za period ispitivanja od 2004-2010 godije je bio 97,8% (7).

U Srbiji, incidenca karcinoma štitaste žlezde za period 1999–2008 godije bila je tri puta veća kod žena nego kod muškaraca (4.7:1.5). U navedenom periodu uočen je primetan porast incidence karcinoma štitaste žlezde za oba pola (8).

1.2. Nodularne lezije štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija

Patološke lezije štitaste žlezde se manifestuju raznovrsnom morfologijom. Uprkos velikom broju lezija, iz praktičnih razloga, delimo ih u dve glavne grupe: one koje pokazuju difuzni obrazac rasta i one koje dovode do pojave nodusa. Difuzne lezije štitaste žlezde su najčešće udružene sa stanjima koja pogađaju celu žlezdu, poput hiperplazije i tireoiditisa. U grupu lezija koje se klinički prezentuju nodusom spadaju benigne i maligne neoplazme i različite hiperplazije (9).

Termin „ folikularni“ se često koristi dvojako, označavajući parenhimske ćelije štitaste žlezde, koje produkuju hormone (T3, T4) i pokazuju ekspresiju tiroglobulina, ili pak obrazac rasta unutar tiroidnih lezija , to jest formiranje folikula (folikularni obrazac). Lezije koje pokazuju folikularni obrazac se dalje subklasifikuju u odnosu na veličinu folikula (mikro-, makrofolikularne), i prisustvo kapsule (totalno/parcijalno inkapsulirane i neinkapsulirane) (10). Uopšteno, većina folikularnih lezija štitaste žlezde može biti klasifikovana na benignu i malignu kategoriju.

1.2.1. Tumori

Većina klinički očiglednih neoplazmi štitaste žlezde su primarne i epitelnog porekla. Tradicionalno se dele na adenoma i karcinome. U drugu grupu, zajedno sa mnogo češćim lezijama komponovanim od folikularnih ćelija, spada i medularni karcinom. Sa histogenetskog/diferencijacijskog stanovišta poželjna je podela neoplazmi štitaste žlezde u tri glavne kategorije, i njihova dalja subdivizija u benigne i maligne kategorije:

1. Tumori koji ispoljavaju folikularnu ćelijsku diferencijaciju
2. Tumori koji ispoljavaju C-ćelijsku diferencijaciju
3. Tumori koji ispoljavaju i folikularnu i C-ćelijsku diferencijaciju

Lezije iz prve grupe sačinjavaju više od 95% svih slučajeva, dok ostatak slučajeva najvećim delom spada u tumore iz druge grupe (11). U dalja razmatranja ćemo uvrstiti samo lezije iz prve grupe.

1.2.1.1. Folikularni adenom

Folikularni adenom se definiše kao benigni inkapsulirani tumor koji ima folikularnu ćelijsku diferencijaciju, uz odsustvo kapsularne i vaskularne invazije, kao i odsustvo jedarnih osobitosti karakterističnih za papilarni karcinom. To je najčešća neoplazma štitaste žlezde. Većina pacijenata su eutireoidne odrasle osobe koje inicijalno imaju izraslinu (izbočinu) štitaste žlezde, i koja se na snimku prezentuje kao „hladan“, ponekad „topao“, i samo retko kao „vruć“ nodus. Mnogi pacijenti sa tiroidnim adenomom imaju povišene cirkulišuće nivoe tireoglobulina (12), ali je samo kod nekolicine pacijenata sa tumorom prisutan hipertireoidizam (takozvani *toksični* ili *Plummer-ovi adenomi*) (13). Treba zapamtiti da su vrući nodusi, obično, ali ne uvek benigni (14).

Klonalno poreklo adenoma je potvrđeno ranim studijama na miševima (15) i ljudima uključujući analizu X hromozoma (16).

Adenomi su gotovo uvek solitarne lezije. Oni su karakteristično oivičeni tankom kapsulom koja je makroskopski i mikroskopski kompletna. Arhitekturalne i citološke osobine su drugačije od onih u okolnom tkivu štitaste žlezde, koje uglavnom pokazuje znake kompresije. Adenomi mogu prikazivati različite obrasce, pojedinačno ili u kombinaciji: normofolikularni (obični), makrofolikularni (koloidni), mikrofolikularni (fetalni) i trabekularni/solidni (embrionalni). Morfološke razlike između različitih obrazaca mogu biti veoma izražene. Ovo nema jasan klinički značaj, ali dovodi u razmatranje različite diferencijalne dijagnoze. Tako, kao opšte pravilo, što su veći folikuli, manja je verovatnoća da je lezija adenom ili karcinom (nasuprot hiperplastičnom nodusu ili folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma). S druge strane, predominacija solidnih/trabekularnih/poput gnezda zona treba da pobudi sumnju na alternativne mogućnosti slabo diferencijalnog ili medularnog karcinoma (koji su, međutim, obično, ali ne uvek, jasno invazivni) (17).

Mitoze su retke ili odsutne u folikularnom adenoma. One nisu obavezno i pokazatelji maligniteta, ali kad su prisutne u značajnom broju, neophodno je uzorkovanje i ispitivanje uzorka sa posebnom pažnjom. Sekundarne degenerativne promene poput hemoragije, edema, fibroze, kalcifikacija, osealne metaplazije i cistične degeneracije su česte, posebno među većim tumorima. Ponekad, krvni sudovi kapsule adenoma (kao i na periferiji hiperplastičnih nodusa) pokazuju izrazito fokalno zadebljanje njihovih zidova, što se naziva mišićnim jastucima (18) Adenomi mogu prikazivati papilarne ili pseudopapilarne formacije, kao i mikrokalifikacije, koje mogu dovesti do zabune sa papilarnim karcinomom. Ove papile su obično orjentisane prema centru lezije, sa edematoznom fibrovaskularnom stromom i malim folikulima unutar iste, uz izostanak jedarne morfologije karakteristične za papilarni karcinom (19). Za takve adenoma predlaže se naziv : folikularni adenom sa papilarnom arhitekturom (20).

Enzimohistohemijski i imunohistohemijski profil adenoma je isti kao u normalnim folikulima (21). Postoji reaktivnost za niskomolekularne keratine i tiroglobulin u citoplazmi, za TTF-1 u jedru, i za laminin i druge komponente bazalne membrane oko folikula (22)

Opisano je nekoliko varijanti folikularnog adenoma.

Termin atipični adenom je predložen za adenome sa naglašenom ćelijskom proliferacijom i manje pravilnim citoarhitekturnim obrascima, uz izostanak dokaza o postojanju kapsularne ili vaskularne invazije (23).

Adenom sa bizarnim jedrima se odlikuje ogromnim hiperhromatičnim jedrima, obično u grupama, bez pratećih osobitosti maligniteta. Ovaj fenomen je analog onom koji se viđa u paraštitastoj žlezdi i drugim endokrinim organima.

Drugi retki tipovi folikularnog adenoma su oni sa svetloćelijskom promenom, adenoma sa adipoznom metaplazijom stome (takozvani – *adenolipomi*) (24), adenoma sa hrskavičnom metaplazijom (takozvani –*adenohondromi*) (25), vretenasto ćelijski adenomi (26), i adenomi sa masivnim deponovanjem citoplazmatskog crnog pigmenta posle terapije minociklinom (*crni adenomi*) (27).

Diferencijalna dijagnoza folikularnih adenoma uključuje hiperplastični nodus, minimalno invazivni folikularni karcinom i folikularnu varijantu papilarnog karcinoma. Neki folikularni adenomi mogu biti pomešani sa vaskularnim tumorima zbog njihove izražene vaskularizovanosti.

Standardna terapija za folikularne adenoma je odstranjivanje lobektomijom.

Neki oblici folikularnog adenoma su identifikovani kao posebni patološki entiteti. U ove spadaju hijalinizujućí trabekularni adenom/neoplazma i atipični adenom (23).

Hijalinizujućí trabekularni adenom i srodne lezije

Hijalinizujućí trabekularni adenom (HTA) je naroćit tip folikularne ćelijske neoplazme koja prikazuje naglašen trabekularni aranžman i podjednako naglašen hijalin izgled. Ovo drugo je prisutno i u citoplazmi tumorskih ćelija (kao rezultat akumulacije intermedijarnih filamenata) i u ekstraćelijskom prostoru (kao rezultat deponovanja hijalinizovanih kolagenih vlakana i materijala bazalne membrane). Trabekule mogu biti prave ili zakrivljene, formirajućí ćudne organoidne formacije. Taj obrazac rasta mođe simulirati izgled kao kod paraganglioma i medularnog

karcinoma, dok prisustvo jedarnih uvrata i psamoznih telašaca može sugerisati na papilarni karcinom. Jedna druga posebna morfološka osobina (ali ne i specifična) HTA su takozvana citoplazmatska žuta tela. To su citoplazmatska inkluziona telašca žute boje, paranuklearne lokalizacije i mogu se detektovati na tkivnim isečcima i na citološkim razmazima (28).

Imunohistohemijski, HTA su pozitivni na tiroglobulin i TTF-1. Polovina slučajeva pokazuje pozitivnost na Galectin-3 (29), i fokalnu, neredovnu pozitivnost na neuroendokrine markere (30). Oni takođe pokazuju neobičnu, ali još neobjašnjenu citoplazmatsku i membransku imunopozitivnost na neka od antitela za MIB-1 (31). Imunobojenja za kolagen tip IV pokazuju deponovanje teškog stepena ovog materijala oko tumorskih ćelija i iznenađujuće unutar nuklearnih pseudoinkluzija (32).

Značajna polemika je pokrenuta po pitanju da li je HTA poseban entitet ili je obrazac rasta koji može biti prisutan u raznim lezijama štitaste žlezde. Brojni autori su pri poslednjem stanovištu. Tako, danas je prihvaćeno da se "HTA obrazac" može sresti unutar nodularne hiperplazije (33), i u neoplazmama sa kapsularnom i/ili vaskularnom invazijom, i koje se zbog toga označavaju kao *hijalinizujućí trabekularni karcinom* (34). Čak spornija i intrigantnija je očigledna patogenetska veza između HTA i papilarnog karcinoma (35, 36).

Na osnovu ovih kombinovanih dokaza, predloženo je da je HTA samo jedna morfološka varijanta papilarnog karcinoma (hijalinizujuća trabekularna varijanta) (37). Ovo bi moglo biti ispravno, ali sa praktičnog stanovišta ostaje činjenica da solitarne inkapsulirane lezije štitaste žlezde koje ispunjavaju sve kriterijume navedene u originalnom članku (38) će se ponašati benigno u skoro svakom slučaju (39, 40).

U bilo kom slučaju, dok se ne razjasni ova komplikovana situacija, možda se može savetovati zamena termina *hijalinizujućí trabekularni adenom*, sa manje obavezujućim *hijalinizujućí trabekularni tumor* (40).

1.2.1.2. Papilarni karcinom štitaste žlezde

Papilarni karcinom štitaste žlezde (PTC) je najčešći maligna neoplazma štitaste žlezde. Tumor je češći kod žena nego kod muškaraca. Može da se javi u bilo kom životnom dobu, sa prosečnom starošću u trenutku postavljanja dijagnoze od oko 40 godina. Predstavlja 90% malignih neoplazmi štitaste žlezde kod dece. U 5-10% slučajeva postoji istorija izlaganja vrata zračenju, a kao rezultat toga je da i ne-neoplastična štitasta žlezda može pokazivati jedarne aberacije (41).

Skoro svi pacijenti imaju klinički očiglednu bolest u vratu pri prvom pregledu. U jednoj velikoj seriji, bolest je bila lokalizovana u štitastoj žlezdi u 67% slučajeva, u limfnim nodusima i štitastoj žlezdi u 13%, a samo u limfnim nodusima u 20% (42).

Veličina primarnog tumora varira od mikroskopskih do ogromnih. Veliki udeo karcinoma štitaste žlezde koji su manji od 1cm pripada papilarnom tipu. Makroskopski, većina tumora su solidni, čvrsti, beličaste boje, i jasno invazivni. Manje od 10% je oivičeno kompletnom kapsulom. Naglašene cistične promene se vide u oko 10% slučajeva (42).

Mikroskopski, tipičan papilarni karcinom sadrži brojne prave papile (43). Papile su obično kompleksne, granajuće, i nasumično orijentisane, sa centralnim fibrovaskularnim jezgrom, obložene sa jednim ili više redova kuboidalnih ćelija. Stroma papilla može biti edematozna ili hijalina, i može da sadrži limfocite, penušave makrofage, hemosiderin i izuzetno –adipocite. Ove papile su skoro uvek udružene sa formiranjem folikula, u različitom omjeru. Folikuli teže da budu nepravilni, često tubularni i račvajući. Tumore sa kombinacijom papilarnih i folikularnih struktura treba klasifikovati kao papilarne, a ne kao mešovite.

Najbitnija osobina papilarnih karcinoma su da tumorske epitelne ćelije imaju karakteristične jedarne osobitosti (koje ćemo u daljem tekstu nazivati PTC - tipom jedara):

1. Jedra poput mlečnog stakla (optički prazna jedra), su obično velika i preklapaju se. Nukleolus je obično slabo uočljiv i potisnut periferno ka jedarnoj membrani, koja izgleda zadebljano (44).

2. Jedarne pseudoinkluzije predstavljaju invaginacije citoplazme i oštro su oivičene, okrugle, acidofilne vacuole (45). Pokazano je da imunohistohemijski reaguju sa β kateninom i kolagenom tipa IV (46).

3. Jedarni žlebovi se javljaju u ovalnim ili vretenastim jedrima, i obično se protežu duž uzdužne ose jedra, i predstavljaju morfološki izraz uvrata preuveličane jedarne membrane (47).

Mitoze su veoma retke ili odsutne u papilarnom karcinomu. Preko polovine slučajeva pokazuje izraženu fibrozu, obično u obliku oštro ocrtanih traka koje koje presecaju tumor. Izgled fibroze varira od sklerohijalinog do visoko celularnog veziva. Elastično tkivo je obično u izobilju u tumorskoj stromi (48,49).

Psamozna telašca se viđaju u oko polovine slučajeva. Mogu biti locirana u stromi papila, fibroznoj stromi i između tumorskih ćelija. Ove bazofilne strukture pokazuju koncentrične laminacije i izgleda da nastaju nekrozom pojedinačnih tumorskih ćelija, koje pak predstavljaju nidus (zametak) za njihovo formiranje, na veoma sličan način kao što u školjci nastaje biser. Ako su prisutni u naizgled normalnoj štitastoj žlezdi ili limfnim nodusima vrata, velike su šanse da je prisutan papilarni karcinom u neposrednoj blizini (50). Psamozna telašca treba razlikovati od drugih vidova kalcifikacija i od intraluminalnih fokusa zgušnjavanja sekreta što se često viđa u tumorima Hirtleovih ćelija (43).

Zone sa solidnim/trabekularnim obrascem rasta su prisutne u 20% slučajeva, kao i fokusi skvamozne metaplazije u sličnom procentu slučajeva. Često su oba obrasca prisutna, i verovatno, i povezana. Prisustvo takvih fokusa nije samo po sebi indicacija da je tumor slabo diferentovan (43).

Povremeno, uočava se prisustvo komponente komponovane od citološki benignih vretenastih ćelija, što predstavlja zanemarljivu metaplastičnu promenu (prepoznatljivu zbog njihovog mešanja sa tipičnim epitelnim ćelijama i njihove imunoreaktivnosti na tiroglobulin i TTF-1), i ne treba je pomešati sa nezenhimalnim neoplazmama ili sa anaplastičnom transformacijom papilarnog karcinoma (51).

U papilarnim karcinomima se mogu videti i : limfocitna infiltracija strome, prisustvo brojnih S-100 pozitivnih dendritičnih ćelija i histiocita (52), kao i raštrkane multinuklearne džinovske ćelije, koje su često prisutne u lumenu neoplastičnih folikula (53).

Multipli mikroskopski fokusi tumora se nađu u oko 20%-75% slučajeva . Sporno je i dalje da li ovo predstavlja multicentričnost ili intratiroidnu limfatičku permeaciju. Invazija krvnih sudova je nađena u samo 5% slučajeva (54).

Imunohistohemijske osobine (upotrebljivost u praksi):

Imunohistohemijski, ćelije papilarnog karcinoma su pozitivne na pan-keratin, CK7, (CK20 negativne), keratin 19, visokomolekularni keratin (34βE12), tiroglobulin, i TTF-1. Takođe postoji pozitivnost na TTF-2, PAX8, S-100, EMA, HBME-1, CD15, Galectin-3, i druge (55- 59).

Praktično pitanje je, koliko je koristan ovaj brojno impresivan niz antitela u diferencijalnoj dijagnozi papilarnog karcinoma. U situaciji kada postoji metastaza papilarne neoplazme u limfnom nodusu ili sa ekstratiroidnom lokalizacijom, a neophodno je utvrditi da li je tumor tiroidne prirode ili ne, ključne su uloge tiroglobulina i TTF-1, pošto su od markera koji postoje, ovi sa najvećom specifičnošću. Druga značajno složenija situacija je upotreba imunobojenja u diferencijalnoj dijagnozi PTC u odnosu na benigne i maligne lezije štitaste žlezde. Tačno je da je imunohistohemijski profil PTC drugačiji od normalnih folikula, folikularnih neoplazmi, i od benignih papila Graves-ovog oboljenja i nodularne hiperplazije. Papile zadnje pomenutih benignih lezija su negativne na HBME-1, galectin-3, 34βE12, i keratin 19, dok mogu pokazivati pozitivnost na p27^{Kip1} (60). Profil ćelija PTC je veoma sličan onom koji prikazuju folikularne ćelije u Hashimoto tireoiditisu (61). Od svih gore navedenih antitela, najveću diskriminatornu vrednost ima HBME-1 (sam, ili u kombinaciji sa CK19) (62).

Varijante PTC

Papilarni mikrokarcinom se definiše kao PTC čiji je dijametar manji ili jednak 1cm. Većina slučajeva ima zvezdastu konfiguraciju i odgovara lezijama koje su se ranije označavale terminom *okultni sklerozirajući karcinom* (63), dok drugi pokazuju delimičnu ili skoro potpunu inkapsulaciju, sa ili bez tumora van kapsule (64). Mikroskopske osobitosti i do sad ispitivani mutacioni profil gubitka heterozigotnosti , nisu drugačiji od njihovih većih parnjaka (65) Papilarni mikrokarcinomi su ekstremno čest incidentalan nalaz (25% ili više u zavisnosti od

temeljnosti pretrage) u štitastim žlezdama koje su odstranjene iz drugih razloga i u populaciono-zasnovanim autopsijskim studijama (66). Papilarni mikrokarcinom može biti udružen sa cervikalnim nodalnim metastazama, i izuzetno retko sa udaljenim, te je prognoza uopšteno gledano odlična (67). Definicija papilarnog mikrokarcinoma je rezervisana isključivo za odrasle osobe (68), jer je klinički značaj kod dece nejasan. S druge strane, kad se pojavi kod odraslih u tipičnoj formi, predloženo je da se izbegava termin *carcinoma*, te da se zameni terminom *papilarni mikrotumor* (69).

Inkapsulirana varijanta se definiše kao papilarni karcinom koji je u potpunosti obavijen kapsulom. Ipak, može da da nodalne metastaze, ali incidenca udaljenih metastaza i smrti zbog tumora je skoro pa nula. Citoarhitekturne (i delimično jedarne) osobitosti su iste kao i kod konvencionalnog invazivnog tipa (70). Ovu leziju treba razlikovati od hiperplastičnih nodusa sa centralnom cističnom degeneracijim i papilarnim i pseudopapilarnim stalcima u zidu.

Folikularna varijanta papilarnog karcinoma (FVPTC) je u potpunosti, ili skoro u potpunosti komponovana od folikula. Dijagnoza je najvećim delom bazirana na prisustvu jedara PTC tipa. Dijagnoza je podržana u slučajevima kada su prisutni: invazivni obrazac rasta, fibrozna trabekulacija (naročito na periferiji tumora), psamozna telašca, izraženo eozinofilan koloid sa nabranom ivicom i prisustvo abortivnih papila. Ponašanje ovih tumora kada su invazivni je analogno ponašanju konvencionalnog papilarnog karcinoma (71), naročito po pitanju visoke incidence nodalnih metastaza. Folikularna varijanta papilarnog karcinoma može se posmatrati kao rezultat balansa dva suprotna biološka svojstva tumorskih ćelija: diferencijacije, u formi sekretorne aktivnosti (time čineći koloidom ispunjene folikule) i proliferacije. Kada postoji dominacija jedne od dve sile nad drugom, dve podvarijante izranjaju:

1. **Solidna varijanta**, je česta kod dece, i razvija se kada predomina proliferacija nad sekrecijom. Ova varijanta se odlikuje solidnim ćelijskim gnezdima sa prilično okruglim oblikom, na koja možemo gledati kao na ispunjene folikule. Jedarne osobitosti kod ove varijante su PTC tipa, i to je osnovna razlika u

odnosu na insularni karcinom i druge forme slabo diferentovanih karcinoma (72).

2. **Makrofolikularna varijanta** je suprotnost solidnoj varijanti, u smislu da je sekretorna aktivnoszt takva da rezultira velikim dilatiranim folikulima , tako da tumor podseća ne toliko na folikularne neoplazme, koliko na hiperplastični nodus (73).

U odnosu na granice tumora , uzimajući kao standard da je lezija predstavljena kao jedna invazivna masa, FVPTC možemo podeliti i na:

1. **Difuznu (multinodularnu) varijantu**. Ovo je veoma neuobičajena forma, u kojoj su veći deo lobusa ili ponekad oba lobusa štitaste žlezde difuzno zahvaćeni tumorskim rastom, što je teško prepoznati zbog široke rasprostranjenosti tumora (74).
2. **Inkapsulira folikularna varijanta** može biti definisana kao neoplazma koja je okružena kapsulom i ima citoarhitekturne osobitosti papilarnog karcinoma , naročito kada su jedra u pitanju. Kao i u slučaju folikularnih neoplazmi, mogu postojati dokazi za kapsularnu i/ili vaskularnu invaziju. Da bi se postavila dijagnoza ove varijante, jedarne promene PTC-tipa bi trebale da su široko rasprostranjene i dobro razvijene, uz prisustvo nekih drugih osobitosti (poput fibrohijalinih traka, izduženih i račvujućih folikula, abortivnih folikula, i gustog eozinofilnog koloida) koje podržavaju dijagnozu (75).

Razlozi za poteškoće koje nastaju u dijagnostici ove lezije uključuju multifokalnu distribuciju jedara karakterističnih za PTC, pre nego difuznu, kao i odsustvo invazivnih osobina, poput kapsularne/vaskularne invazije u većini slučajeva FVPTC (76). Stvari se dodatno komplikuju činjenicom da su brojne studije pokazale postojanje značajne razlike između patologa u postavljanju dijagnoze FVPTC, pa čak i između eksperata za oblast tiroidne patologije (77). Na osnovu ovih zapažanja, i sa svrhom da se izbegne reakcije koje termin *karcinom* ima na hirurga i pacijenta , od strane grupe

autora („*Chernobyl Pathology Group*“) je predložena sledeća terminologija (68):

- Za lezije koje imaju očigledne jedarne promene:
 - i. *Papilarni tiroidni karcinom* , *folikularna varijanta*, bez obzira na status kapsule
- Za lezije sa upitnim jedarnim promenama:
 - i. *Dobro diferentovan karcinom, NOS* , ako postoji jasna kapsularna invazija
 - ii. *Dobro diferentovan tumor neizvesnog malignog potencijala (WDT-UMP)*, ako je kapsularna invazija upitna ili odsutna

Difuzna sklerozirajuća varijanta se odlikuje difuznom zahvaćenošću jednog ili oba režnja štitaste žlezde, gustom sklerozom, brojnim psamoznim telima, obimnim solidnim fokusima, skvamoznom metaplazijom, i permeacijom velikog broja limfnih sudova (78). Nodalne metastaze su skoro uvek prisutne, plućne metastaze su česte, i stopa preživljavanja bez bolesti je niža nego kod klasičnog PTC-a (79) .

Oksifilna (onkocitna) varijanta. Kod ove varijante, jedra imaju odlike jedara PTC-a, ali je citoplazma obilna i ima granularni oksifilni izgled (80). Obrazac rasta može biti papilarni ili folikularni, i tumor može biti inkapsuliran ili invazivan. Dalja varijacija na temu je da tumor ima papilarnu arhitektoniku, tipične jedarne osobine, onkocitnu citoplazmu i izražen limfocitni infiltrat u stromi papila , što rezultuje izgledom nalik na Warthinov tumor pljuvačnih žlezda. „*Warthin-like*“ papilarni karcinom štitaste žlezde ima generalno odličnu prognozu (81).

„**Tall cell**“ **varijanta** se odlikuje papilama obloženim jednim redom visokih („*tall*“) ćelija (čija je visina minimalno tri puta veća od širine) koje imaju obilnu acidofilnu (onkocitoidnu) citoplazmu (82). Ove osobine treba da budu prisutne u bar polovini tumora, da bi se tumor mogao svrstati u ovu kategoriju. Obrazac rasta teži da bude izrazito papularan. Nuklearne pseudoinkluzije su naročito upadljive. Može postojati obiman limfocitni infiltrat u stromi (83). Ovaj tip tumora se češće javlja kod starijih pacijenata u odnosu na klasični tip PTC-a. Ekstratiroidno širenje je često, i klinički tok je agresivniji (84).

Kolumnarna ćelijska varijanta papilarnog karcinoma . U tumoru postoji izražena stratifikacija, i citoplazma je pre svetla (ponekad sa subnuklearnom vakuolizacijom, što podseća na rani sekretorni endometrijum) nego acidofilna. Mitotske figure se uočavaju, i MIB-1 je relativno visok. Jedra nemaju optički prazan izgled, uvrate i pseudoinkluzije, te se stoga postavlja pitanje da li je to zaista varijanta papilarnog karcinoma, bez obzira na postojanje naglašene papilarne arhitektonike. Prognoza tumora korelira sa tumorskim stadijumom, dok su inkapsulirani kolumnarni ćelijski karcinomi skopčani sa povoljnom prognozom (85, 86, 87).

Kribriiformno-morularna varijanta papilarnog karcinoma. Ova varijanta se odlikuje prisustvom kribriiformnog obrasca rasta i morularnim formacijama. Može se videti jedarno rasvetljavanje, koje na ultrastrukturnom nivou nastaje zbog akumulacije mikrofilamenata. Poznato je da su ovi tumori udruženi sa familijarnom adenomatoznom polipozom (FAP) (88). Sporenja postoje po pitanju da li je to varijanta PTC ili posebna kategorija karcinoma štitaste žlezde (89).

Papilarni karcinom sa obilnom stromom koja je nalik na nodularni fascitis. U ovoj varijanti, stromalna reakcija tumora je istaknuta i može da učini nejasnom neoplastičnu epitelnu komponentu (90).

Širenje i metastaze

Ekstratiroidno širenje u meka tkiva vrata se nalazi u oko četvrtine pacijenta, sa povremenim širenjem u paraštitaste žlezde. Zahvaćenost vratnih limfnih nodusa je veoma često (naročito u mlađih pacijenata), i može predstavljati prvu manifestaciju bolesti. Nodalne metastaze su sklone cističnoj degeneraciji.

Hematogene metastaze su ređe u odnosu na druge karcinome štitaste žlezde, ali se javljaju. Mada su pluća najčešće zahvaćena, metastaze su zabeležene u kostima, mekim tkivima, centralnom nervnom sistemu, pankreasu, dojci i u mnogim drugim organima (42,91, 92, 93).

Prognoza

Prosečno preživljavanje pacijenata sa papilarnim karcinomom je izvrsno, bez značajne razlike u odnosu na opštu populaciju (94).

Faktori koji imaju uticaj na prognozu su: godine života (95), pol, veličina tumora, ekstratiroidno širenje, status kapsule i margina, multicentričnost, prisustvo udaljenih metastaza, mikroskopska varijanta tumora, prisustvo slabo diferentovanih skvamoznih ili anaplastičnih fokusa (42).

1.2.1.3.Folikularni karcinom

Po definiciji, folikularna epitelna neoplazma koja pokazuje kapsularnu ili vaskularnu invaziju u odsustvu nuklearnih promena tipičnih za papilarni karcinom se dijagnostikuje kao folikularni karcinom štitaste žlezde (FTC) (96). To je relativno redak tumor, češći kod žena i javlja se u proseku dekadu kasnije u odnosu na papilarni karcinom (97).

Mikroskopski izgled folikularnog karcinoma je izuzetno promenljiv, i varira od dobro formiranih folikula, do pretežno solidnog obrasca rasta. Slabo formirani folikuli, kribriiformne zone, ili trabekularne formacije, mogu biti prisutni, ponekad i kombinovano. Izuzetno, tumor može biti u potpunosti komponovan od vretenastih ćelija ili pokazivati naglašene glomeruloidne formacije (98,99).

Svetloćelijska promena citoplazme tumorskih ćelija može biti prisutna fokalno ili difuzno. Mitotska aktivnost i jedarna tipija su obično prisutni, ali mogu da u potpunosti izostanu. Psamozna tela su odsutna, a skvamozna metaplazija je ekstremno retka. Tumore koji imaju pretežno solidni/trabekularni/ili u gnezdim obrazac rasta neophodno je pažljivo pregledati tražeći mitoze i polja nekroze, a u svrhu isključivanja dijagnoze slabo diferentovanog karcinoma.

Imunohistohemijski, folikularni karcinomi eksprimiraju tiroglobulin, TTF-1, niskomolekularni keratin, EMA, i komponente bazalne membrane, kao što su laminin i kolagen tip IV (100). Ne postoji značajna razlika u ekspresiji ovih i drugih markera između folikularnog karcinoma i adenoma. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza, MCM2 i humane telomerazne reverzne transkriptaze (hTERT) je

češće prisutna u folikularnim karcinomima u odnosu na folikularne adenome ili hiperplastične noduse (101, 102).

Podela folikularnih karcinoma- podtipovi

U odnosu na stepen invazivnosti folikularni karcinom se deli na minimalno i široko invazivni podtip.

Minimalno invazivni folikularni karcinom je makroskopski inkapsuliran tumor, često solidan i mesnat na preseku. Obrazac rasta obično podseća na onaj u adenomu, fetalnog ili embrionalnog tipa. Dijagnoza maligniteta se u potpunosti zasniva na demonstraciji vaskularne i/ili kapsularne invazije (103, 104). Obično ovi tumori imaju deblju kapsulu u odnosu na adenome. Patološka dijagnoza minimalno invazivnog folikularnog karcinoma se postavlja kada postoji kapsularna invazija. Eksperti koji veruju da je kapsularna invazija kriterijum za malignitet se međusobno dele u odnosu na definiciju kapsularne invazije, tj. da li je prisutan prodor tumora u zid kapsule, ili kroz celu debljinu kapsule (105). Pošto tumor napravi prodor kroz tanak segment kapsule, ima sklonost da se poput klobuka pečurke širi dalje. Ponekad zbog tangencijalnog preseka, se stiče utisak da postoji nodus sa druge strane intaktne kapsule. Neophodno je na dubljim presecima potvrditi kontinuitet nodusa sa tumorskim tkivom, i prodor kroz kapsulu. Kriterijum vaskularne invazije se odnosi samo i striktno na krvne sudove tumorske kapsule ili u neposrednom okolnom tkivu štitaste žlezde, van tumora. Vaskularna invazija se definiše kao prisustvo tumorskih ćelija izmešanih sa fibrinom i eritrocitima unutar krvnog suda, pričvršćenih za zid krvnog suda, a endotelne ćelije moraju oblagati najmanje tri strane tumorskog tromba (106). Krvni sudovi treba da budu venskog tipa, relativno velike veličine. Za identifikovanje ovih struktura predložena je upotreba CD31.

Iz prethodnih zapažanja proističe da je temeljno uzorkovanje inkapsuliranih folikularnih lezija od najviše važnosti. Grupa („*Chernobyl group*“) tirodnih patologa predlaže usvajanje sledeće terminologije (68).

- Za tumore koji pokazuju definitivnu kapsularnu invaziju, i odsustvo jedra PTC-tipa: folikularni karcinom
- Za tumore sa upitnom (suspektnom) kapsularnom invazijom : Folikularni tumor sa neizvesnim malignim potencijalom (FT-UMP), ako su jedra PTC-tipa odsutna, i dobro diferentovan tumor neizvesnog malignog potencijala (WDT-UMP) , ako su jedra PTC-tipa prisutna

Široko invazivni folikularni karcinom pokazuje široko rasprostranjenu infiltraciju krvnih sudova i/ili okolnog tkiva štitaste žlezde. Često, inkapsuliranost izostaje u potpunosti. Mnogi od ovih tumora su slabi diferentovani karcinomi na citoarhitekturnom nivou.

Izgleda da je klinički značajnija podela folikularnih karcinoma koja uzima u obzir sledeća razmatranja:

- Postoje dve glavne kategorije sa značajno različitim prognostičkim značenjem: inkapsulirani tumori, gde treba tragati za invazijom; široko invazivni tumori, gde treba tražiti prisustvo kapsule
- U prvoj grupi, postoje značajne prognostičke razlike između tumora koji pokazuju samo invaziju kapsule, u odnosu na tumore sa vaskularnom invazijom, sa ili bez kapsularne invazije
- U grupi sa vaskularnom invazijom , postoji prognostička razlika u zavisnosti od broja zahvaćenih krvnih sudova.

Shodno navedenom predložena je nova klasifikacija *folikularnih karcinoma*(107):

Folikularni karcinom

1. Inkapsulirani
 - 1.1. Sa kapsularnom (bez vaskularne) invazije
 - 1.2. Sa ograničenom (<4) vaskularnom invazijom (sa ili bez kapsularne invazije)
 - 1.3. Sa ekstenzivnom (=4) vaskularnom invazijom (sa ili bez kapsularne invazije)
2. Široko invazivni

Nasuprot papilarnim karcinomima, folikularni karcinomi, bez obzira na podtip, su gotovo uvek solitarni i izuzetno okultni. Metastaze su obično hematogene (108).

Najčešća mesta metastaziranja su pluća i kosti, ali se mogu videti i na mnogim drugim mestima uključujući kožu i bubrege (109). Ove metastaze imaju jak afinitet za radiojodid, i interesantno, mogu imati bolje diferentovan izgled u odnosu na primarni tumor. Većina, ipak, ima slabo diferentovan izgled, barem na arhitekturnom nivou (108). Metastaze su česte kod široko invazivnog tipa, zatim javljaju se u manje od 5% minimalno invazivnih tumora sa vaskularnom invazijom, i razviju se u manje od 1% tumora koji su dijagnostifikovani kao karcinomi, samo na osnovu minimalne kapsularne invazije (110).

1.2.1.4. Tumori Hirtleovih ćelija

Hirtleove ćelije (Hürthle cell)

Sinonimi za ove ćelije su: oksifilne, onkocitne i eozinofilne ćelije. To su ćelije koje vode poreklo od folikularnih ćelija, i imaju citoplazmu koja se opisuje kao "otečena". Ovo povećanje zapremine citoplazme ("oticanje") je najvećim delom posledica prisustva brojnih mitohondrija u ćelijskoj citoplazmi. Hirtleove ćelije se citološki opisuju kao velike ćelije, sa obilnom, eozinofilnom, granuliranom citoplazmom i velikim hiperhromatičnim jedrom sa istaknutim jedarcetom (111). Nisu sve onkocitne ćelije u štitastoj žlezdi prave Hirtleove ćelije. Onkocitne folikularne ćelije sadrže eozinofilnu (obično negranuliranu) citoplazmu, i tek su nešto veće od normalnih folikularnih epitelnih ćelija. Ove ćelije se obično javljaju u nodoznim strumama, i dominantnim adenomatoznim ili hiperplastičnim nodusima (112). Veliki broj mitohondrija koji se vidi u Hirtleovim ćelijama verovatno nastaje sekundarno u odnosu na postojanje defekata u mitohondrijalnoj DNK, što rezultuje u mitohondrijalnoj disfunkciji. Proces akumulacije mitohondrija u citosolu folikularnih ćelija se ne dešava brzo. Veruje se da nastaje postepeno, tokom vremena, što objašnjava zašto se Hirtleove ćelije retko viđaju u neneoplastičnim i

neoplastičnim lezijama kod dece (113). Imunohistohemijski , Hirtleove ćelije pokazuju reaktivnost na tiroglobulin (u manjem stepenu nego folikularne ćelije), za mnoge mitohondrijalne antigene, i keratin . Što se tiče keratina, CK 14 izranja kao selektivni marker za ove ćelije (114).

Neoplazme Hirtleovih ćelija: opšti koncepti

Po definiciji neoplazme Hirtleovih ćelija su sačinjene od 75% ili više, Hirtleovih ćelija. Raznovrsni tumori štitaste žlezde imaju onkocitnu citologiju. Ovde spadaju benigne (adenoma Hirtleovih ćelija, tumor zrnastih ćelija) i maligne (karcinom Hirtleovih ćelija) neoplazme, zatim varijante PTC-a (“tall cell”, onkocitna, i Warthin-ovom tumoru nalik varijanta), i onkocitna varijanta medularnog karcinoma. Studije, u koje su bili uključeni i multipli nodusi Hirtleovih ćelija koji se vide na terenu strume ili hroničnog limfocitnog tireoiditisa, pokazale su da je više od 80% neoplazmi Hirtleovih ćelija benigno (115). Druge studije, koje su isključile ove neinkapsulirane noduse Hirtleovih ćelija, su pokazale da je stopa maligniteta veća kod neoplazmi Hirtleovih ćelija u odnosu na folikularne neoplazme (2-3%, nasuprot 30-45%) (116).

Makroskopski, neoplazme Hirtleovih ćelija su obično pojedinačne i pokazuju barem parcijalnu inkapsuliranost. One su upečatljivo mahagoni braon boje zbog prisustva obilnog sadržaja mitohondrijalnog citohroma. Slično onkocitnim neoplazmama u drugim organima, centralni ožiljak može biti prisutan. Makroskopski vidljiva područja nekroze i krvavljenja mogu biti prisutna u lezijama podvrgnutim preoperativnoj aspiracionoj biopsiji tankom iglom. Prisustvo infarkta se ne može izjednačiti sa malignitetom (117).

Mikroskopski, različiti obrasci rasta mogu biti prisutni: makrofolikularni, folikularni, trabekularni, solidni, i pseudopapilarni (118). Mnogi tumori pokazuju kombinacije različitih obrazaca rasta. Neoplazme Hirtleovih ćelija (benigne i maligne) imaju sklonost da pokazuju područja sa pseudopapilarnom promenom, za koju se smatra da nastaje kao artefakt tokom fiksacije i obrade tkiva. U tumorima Hirtleovih ćelija se mogu sresti distrofijske kalcifikacije nalik na psamozma telašca, ali je važno istaći da se one nalaze unutar koloida i da često nemaju lameliranost

(19). Jedan od najtežih aspekata pregleda neoplazmi Hirtleovih ćelija je određivanje prirode lezije, tj. da li je lezija benigna ili maligna. Veličina tumora, jedarna atipija, multijedarnost, ćelijski pleomorfizam, mitoze ili histološki obrazac rasta, nisu determinante maligniteta (118). Glavni kriterijumi za malignitet uključuju prisustvo kapsularne/vaskularne invazije. Poput folikularnih karcinoma, karcinomi Hirtleovih ćelija se mogu klasifikovati kao minimalno invazivni, angioinvazivni (invazija krvnih sudova kapsule, ili van tumorske kapsule) i široko invazivne. Ghossein i saradnici su u studiji na 50 pacijenata sa karcinomom Hirtleovi ćelija identifikovali najvažniji faktor rizika za rekurentnu bolest. Taj faktor je prisustvo vaskularne invazije, tačnije, 4 ili više zona sa vaskularnom invazijom je udruženo sa značajno višim rizikom za rekurenciju kod inkapsuliranih karcinoma Hirtleovih ćelija. Široko invazivni tumori imaju ekstenzivnu transkapsularnu i vaskularnu invaziju(119).

Termin *atipični adenom Hirtleovih ćelija* se koristi za opisivanje lezija koje imaju atipične osobitosti, a ne zadovoljavaju u potpunosti kriterijume za malignitet. Ove osobitosti su naglašena citološka atipija, mitotska aktivnost, spontani infarkti, nekroza, krvavljenje i/ili zarobljavanje tumorskih ćelija unutar kapsule tumora kod kojih nije rađena FNAB preoperativno(116) . Iako se smatra da su karcinomi Hirtleovih ćelija slični folikularnim karcinomima, oni imaju tendencu da se klinički drugačije ponašaju u odnosu na ove druge. Metastaziraju u regionalne limfne noduse i hematogeno, najčešće u pluća, jetru, i kosti (116). Petogodišnje stope preživljavanja variraju od 50-60%. Kasna rekurencija i metastaze nisu retki (120).

1.2.1.5. Genetika tumora štitaste žlezde

Karcinom štitaste žlezde napreduje kroz seriju genetskih i epigenetskih promena, uključujući aktivirajuće i inaktivirajuće somatske mutacije, promene u obrascu ekspresije gena, aberantnu gensku metilaciju i poremećaje regulacije microRNA (miRNA). Najveći broj mutacija su somatske, bilo da su u pitanju tačkaste mutacije ili hromozomske alteracije. U 70% papilarnih karcinoma nalaze se genetske alteracije BRAF, RAS i RET/PTC, dok se genetske alteracije RAS i PAX8/PPAR γ sreću kod 70% folikularnih karcinoma. Ove genetske alteracije su međusobno isključive(121).

BRAF je najproučavanija mutacija i najčešća genetska promena u karcinomima štitaste žlezde.

BRAF tačkasta mutacija. BRAF je serine treonin kinaza koja se translocira na ćelijsku membranu, pošto se veže za, i aktivira od strane RAS-a. BRAF u karcinomima štitaste žlezde biva aktiviran tačkastom mutacijom, najčešće zamena timina za adenin u nukletidu na poziciji 1799, što rezultuje zamenom valina za glutamat na poziciji 600 (V600E) (122). Ova specifična mutacija predstavlja 99% svih BRAF mutacija nađenih u tiroidnom karcinomu. To je najčešća genetska mutacija u papilarnom karcinomu štitaste žlezde i registruje se u 40-45% ovih tumora (123). BRAF je nađen u klasičnom i visokoćelijskom papilarnom karcinomu, kao i kod trećine slabo diferentovanih i anaplastičnih karcinoma. Dediferentovani karcinomi mogu imati zone sa diferencijacijom, i obe zone mogu sadržavati mutirani BRAF. Ovo ukazuje na progresiju iz diferentovane ka dediferentovanoj neoplazmi (124) .

RET/PTC rearanžman. RET/PTC je hromozomski rearanžman otkriven u papilarnom karcinomu štitaste žlezde. Deo RET gena je spojen sa aktivno transkribujućim genom , što rezultuje u nastanku himernog gena koji povećava ekspresiju i ligand nezavisnu dimerizaciju skraćenog RET proteina, i koji onda stimuliše MAPK kaskadu. Dva najčešća rearanžmana su RET/PTC1 i RET/PTC3, i oba predstavljaju paracentrične intrahromozomske inverzije. RET/PTC1 je najčešći tip (60-70%) rearanžmana, dok RET/PTC3 ima udeo u 20-30% pozitivnih slučajeva. Klonalni RET/PTC rearanžmani se javljaju u oko 15% PTC-a i specifični su za PTC (125). Javljaju se uglavnom kod mlađih pacijenata. Papilarni karcinomi koji su nastali kod pacijenata posle izlaganja zračenju tokom Černobiljske nezgode pokazuju povećanu incidencu RET/PTC rearanžmana (126). BRAF i RAS tačkaste mutacije su retke u tumorima izazvanim radijacijom.

RAS tačkaste mutacije . Humani geni, HRAS, NRAS i KRAS, kodiraju visoko srodne G proteine koji su locirani na unutrašnjoj površini ćelijske membrane. Ovi proteini su karika u lancu prenosa signala od membranskih receptorskih tirozin kinaza na MAPK i PI3K signalne puteve. Tačkaste mutacije koje se najčešće javljaju u tumorima štitaste žlezde su u kodonu 61 NRAS-a i HRAS-a. RAS mutacije nisu specifične za malignitet i nalaze se u 10-20% PTC-a, 40-50% FTC-a, 20-40% slabo direrentovanih i anaplastičnih karcinoma, kao i u trećini

folikularnih adenoma (127). RAS pozitivni folikularni adenomi bi mogli predstavljati prekursore RAS pozitivnih folikularnih karcinoma i RAS pozitivne folikularne varijante PTC-a.

PAX8/PPAR γ rearanžmani. PAX8/PPAR γ himerni fuzioni rearanžman se nalazi kod trećine konvencionalnih FTC-a. To nije karakteristično za FTC, s obzirom da se u malom procentu može sresti kod folikularnih adenoma i u folikularnoj varijanti PTC-a. PAX8/PPAR γ rearanžman i RAS tačkaste mutacije se retko javljaju udruženo u istom tumoru, što ukazuje da oni predstavljaju slične puteve (128).

1.2.1.6. Prognostički i terapijski značaj genetskih markera

BRAF pozitivni papilarni karcinomi štitaste žlezde imaju veću stopu metastaziranja u noduse centralnog kompartmana vrata. Tufano i saradnici saopštavaju da od 197 slučajeva kod kojih je bilo neophodno uraditi reoperativnu disekciju centralnog kompartmana 75% je bilo BRAF pozitivno, i sa kraćim vremenom rekurencije u odnosu na BRAF negativne rekurentne tumore,

Ova informacija, uzimajući u obzir i druge kliničke faktore, može pomoći u donošenju odluke za profilaktičku disekciju centralnog kompartmana vrata (129).

BRAF mutacija je udružena sa ekstratiroidnim širenjem tumora, metastazana u limfne noduse, uznapredovalijim stadijumom na prezentaciji, tumorskom rekurencijom, tumor povezanim mortalitetom, i reoperacijama. BRAF pozitivni papilarni mikrokarcinomi imaju agresivnije tumorske odlike (130).

Karcinomi sa BRAF mutacijom, naročito kad se povrate ili dediferenciraju, mogu imati slabiji odgovor na lečenje radioaktivnim jodom, zbog smanjene sposobnosti da preuzimaju jod, verovatno zbog promena u funkciji natrijum jod simportera. BRAF - mutirani rekurentni PTC su 131I negativni u 94% slučajeva (131). S druge strane, samo 20-30% BRAF pozitivnih tumora ima agresivan klinički tok, te stoga, njihov značaj za prognozu tumora ostaje da bude u potpunosti definisan (132).

RET/PTC rearanžmani su ređe udruženi sa agresivnom patogeneom, i za razliku od BRAF tačkastih mutacija, nisu udruženi sa gubitkom natrijum/jod simportera(133).

Inkapsulirana folikularna varijanta PTC je udružena sa RAS mutacijama. Infiltrativna

folikularna varijanta je udružena sa BRAF mutacijom i agresivnijim biološkim ponašanjem (metastaze u limfne noduse, invazivni obrazac). Moguće implikacije su da RAS pozitivna inkapsulirana varijanta PTC može biti lečena konzervativnije, poput minimalno invazivnog folikularnog karcinoma (134).

1.2.1.7. Tumorima nalik lezije

Hiperplastični nodusi. Istorijski gledano, multipli nodusi u strumozno izmenjenoj štitastoj žlezdi se klasifikuju kao hiperplastični nodusi. Obično nastaju u sklopu nodozne strume, mogu pokazivati kompletnu ili parcijalnu inkapsulaciju, i obično sadrže mešavinu makro-, i mikrofolikula. Ipak, postoje i takvi koji se sastoje samo mikro-, ili makrofolikula. Ovi nodusi često pokazuju različite oblike degenerativnih promena kao što su hemoragija, fibroza ili formiranje cisti (19).

Ponekad, hiperplastični nodusi u multinodoznoj štitastoj žlezdi mogu biti veliki i inkapsulirani, i pokazivati drugačiji obrazac rasta od okolnog tkiva štitaste žlezde. U takvim slučajevima teško je razlikovati hiperplastični nodus od pravog adenoma. Neki patolozi preferiraju da klasifikuju takve lezije kao *adenomatoidne noduse ili adenomatoidnu strumu* (10).

Pokazano je da čak do 70% hiperplastičnih nodusa koji se javljaju na području nodozne strume su klonalne proliferacije (135).

Multipli inkapsulirani nodusi se obično označavaju terminom „*adenomatoidna hiperplazija*“ (75).

1.3. Molekularne metode dijagnostike nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija

1.3.1. Citokeratin 19

Citokeratin 19 (CK19) je najmanji član familije citokeratina, heterogene grupe intermedijarnih filamenata, čije fiziološke uloge i dalje ostaju nejasne. CK19 je eksprimiran u brojnim tkivima. Normalno je prisutan u prostim ili žlezdanim epitelima, bazalnom ćelijskom odeljku slojevitih epitela, i u folikulima dlake (136). Povišeni nivoi ekspresije CK19 su uočeni u nekim patološkim stanjima, poput tumora epitelnog porekla. Ova ekspresija zavisi od tipa epitela, stepena tumorske

diferencijacije, i može se menjati tokom karcinogeneze (137). Naročito važna primena ovog proteina je njegova upotreba kao markera u tumorskoj patologiji štitaste žlezde. Rezultati nekoliko studija ukazuju da imunohistohemijsko bojenje na CK19 može pomoći u diferencijaciji folikularne varijante PTC od folikularnih benignim i malignih tumora(138, 139).

Zdravi tireociti ne produkuju ovaj protein, dok je ushodna regulacija povezana sa neoplastičnom transformacijom. Postoje čvrsti dokazi u literaturi koji ukazuju na slabu ekspresiju CK19 u benignim stanjima, ali promenjivu ekspresiju u malignom tkivu štitaste žlezde (140). Jaka i difuzna imunohistohemijska pozitivnost CK19 je najčešće povezana sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde. Ipak, objavljeni rezultati se razlikuju, i upotrebljivost CK19 u dijagnozi tiroidnih lezija je predmet sporenja (139,141).

1.3.2. Galectin 3

Galektini su velika familija proteina koja prepoznaje i vezuje galaktozide na ćelijskim glikoproteinima i glikolipidima (142). Gal-3 je strukturalno jedinstven (31-kDa) član familije galektina. Mada drugi članovi postoje kao oligomeri, Gal-3 je jedini član koji pokazuje pentamernu strukturu i zbog toga je sposoban da pravi ukrštene veze sa glikoproteinima ćelijske površine, formirajući novu mrežu koja je uključena u ćelijsku signalizaciju i receptorsku endocitozu. Gal-3 je identifikovan u jedru, citoplazmi i ekstracelularnom prostoru. Ima ulogu u regulaciji apoptoze, ćelijskog motiliteta, i rasta T ćelija, i upleten je u progresiju karcinoma štitaste žlezde (143, 144). Transfekcija Gal-3 deficijentnih ćelijskih linija humanog karcinoma dojke sa divljim tipom Gal-3, rezultuje u fosforilaciji i translokaciji Gal-3 iz jedra u citoplazmu, što dovodi do rezistencije na apoptozu, kada se one podvrgnu hemoterapeuticima koji indukuju apoptozu. Dalje, u jednom eksperimentu u kojem se procenjivala lokalizacija i funkcija Gal-3, transfekcija Gal-3 deficijentnih ćelijskih linija prostate sa citoplazmatski lociranim Gal-3 je dovela do povećanja za vezivanje-nezavisnog ćelijskog rasta, povećane invazivnosti na Matrigel-u, i pojačanog tumorskog rasta, dok transfekcija sa jedarno lokalizovanim Gal-3 nije uspela da demonstrira ove efekte (145, 146). U kliničkom okruženju, ove studije ukazuju da je citoplazmatska ekspresija Gal-3 u tumorima štitaste žlezde bitnija u odnosu na jedarnu ekspresiju (147). Godine 1995., Xu i saradnici su ispitivali ekspresiju galectin-1 i galectin-3 u

maloj seriji tumora štitaste žlezde, i pronašli su ekspresiju ovih lektina u papilarnom i folikularnom karcinomu, ali ne u adenomima, nodularnoj strumi, ili normalnom tkivu štitaste žlezde. Na osnovama ovih ispitivanja, oni su zaključili da galektini mogu biti korisni u razlikovanju benignih od malignih tumora štitaste žlezde(144). Takođe, treba napomenuti, da u skorijoj studiji, upoređujući ekspresiju galektina 3 u seriji slučajeva papilarnog karcinoma i papilarne hiperplazije, uočeno je značajno preklapanje učestalosti ovog markera (148) . Galektin-3 je prisutan u oko 60% slabo diferentovanih karcinoma i u skoro 90% nediferentovanih karcinoma štitaste žlezde (149).

1.3.3. HBME-1

Monoklonalno antitelo HBME-1 reaguje sa nepoznatim antigenom u mikrovilima mezotelnih ćelija, epitelu traheje, i adenokarcinomima pankreasa, pluća, i dojke. Ovo antitelo je procenjavano u smislu delotvornosti razlikovanja benignih i malignih lezija štitaste žlezde, i u aspiratima (direktni razmazi, i ćelijski blokovi), i u tkivnim isečcima (150). Miettinen i Karkkainen su pokazali pozitivnost za HBME-1 u 100% papilarnih (145/145) i folikularnih karcinoma (27/27), a benigne lezije su bile ili negativne, ili su pokazivale fokalnu pozitivnost u oko 30% slučajeva (151). U nešto kasnijoj seriji, Mase i saradnici su prikazali pozitivnost u približno 13% adenomatoznih struma, 37% adenoma, 84% folikularnih karcinoma, 97% papilarnih karcinoma (152). Sack i saradnici su zaključili da je pozitivan rezultat za HBME-1 u FNA podržavajući dokaz da je lezija karcinom, ali da negativni rezultat ne isključuje dijagnozu maligniteta (150). Uopšteno, onkocitne neoplazme , kako papilarnog, tako i folikularnog tipa, su ređe pozitivne na HBME-1 u odnosu na njihove neonkocitne analoge. Skoro 90% slabo diferentovanih i približno 20% anaplastičnih karcinoma su pozitivni na HBME-1 (153).

1.3.4. CD56

CD56 (NCAM) je multivalentni adhezivni molekul koji omogućava ostvarivanje homotipičnih i heterotipičnih ćelijsko ćelijskih adhezija, posredstvom homofilnih vezujućih mehanizama, i uobičajeno se eksprimira u NK ćelijama, aktiviranim T limfocitima, velikim granuliranim limfocitima, specifičnim endokrinim organima, i

moždanom tkivu. U štitastoj žlezdi, ekspresija CD56 je identifikovana ne samo u neizmenjenoj žlezdi, već takođe i u adenomatoznoj hiperplaziji, Graves-ovom oboljenju, limfocitnom tireoiditisu, Hashimoto titeoiditisu i folikularnom adenomu. U PTC, nađena je značajno redukovana ekspresija CD56 , i incidenca ove smanjene ekspresije varira od 83,4% do 100% (154). Ove varijacije u incidenci mogu biti prouzrokovane razlikom u definisanju donje granice pozitivnih tumorskih ćelija.

U nekoliko studija, senzitivnost i specifičnost CD56 nisu bile 100%, te se sugerije da je bolje koristiti kombinaciju markera za kliničku evaluaciju pacijenata (155). Promene u ekspresiji CD56 mogu uticati na migratornu sposobnost tumorskih ćelija (156). Lošija prognoza kod pacijenata sa karcinomima debelog creva i pankreasa, kao i sa astrocitomima je u vezi sa gubitkom ekspresije CD56 (157). Pokazano je da CD56 stimuliše β 1-integrinom posredovane ćelijsko matriksne adhezije, aktivirajući receptore za fibroblastni faktor rasta. Zbog toga, niska ekspresija CD56 može povećati verovatnoću pojave metastaza posredstvom stimulacije limfangiogeneze (158). Modifikacije ekspresije CD56 u PTC mogu dovesti do nishodne regulacije vaskularnog endotelnog faktora rasta D (VEGF-D) i VEGF-C, faktora koji stimulišu limfangiogenezu (159). Homeobox B9 (HoxB9; transkripcioni factor) reguliše transkripciju CD56 u PTC. Utišavanje HoxB9 jedarne ekspresije je povezano sa tumorskim stadijumom i ekstratiroidnim širenjem, dok gubitak ekspresije CD56 nije u korelaciji sa kliničko-patološkim osobinama. Svi ovi nalazi su dokazi koji objašnjavaju zašto PTC karakteristično metastazira u regionalne limfne noduse , dok se FTC obično širi hematogeno (160).

1.4. Angiogeneza u tumorima štitaste žlezde

Angiogeneza je rast krvnih sudova iz već postojećih sudova. Javlja se tokom celog života , u zdravlju i bolesti, počinjući u materici i nastavljajući se do u starost. Nijedno metabolički aktivno tkivo u telu nije udaljeno više od nekoliko stotina mikrometara od krvnih kapilara, koji su nastali procesom angiogeneze. Kapilari su neophodni u svim tkivima za difuzionu razmenu hranjivih materija i metabolita. Promene u metaboličkoj aktivnosti dovode do srazmernih promena u angiogenezi i zbog toga, i proporcionalnih promena u gustini kapilara. Kiseonik igra ključnu ulogu u ovoj regulaciji. Hemodinamski činioci su kritični za preživljavanje vaskularne mreže i za strukturalne adaptacije zidova krvnih sudova. Spoznaja da kontrola angiogeneze može

imati terapeutsku vrednost je proizvela veliko interesovanje tokom proteklih 40 godina. Stimulacija angiogeneze može biti terapeutska u ishemijskoj bolesti srca, perifernoj arterijskoj bolesti i u zarastanju rana. Smanjenje ili inhibicija angiogeneze može biti terapeutska u malignim tumorima, očnim stanjima, reumatoidnom artritisu i drugim oboljenjima. Kapilari rastu i regrediraju u normalnim tkivima shodno funkcionalnim zahtevima (161). Vaskularna arhitektura u tumorima je drugačija u odnosu na normalna tkiva, i određena je mikroheterogenošću ćelijskih interakcija sa ekstraćelijskim matriksom. Najveća vaskularna gustina se obično pronalazi na periferiji unutar invazivnog fronta. Tumorski krvni sudovi ne prikazuju raspoznatljive osobnosti arteriola, kapilara i venula, nepravilnog su oblika, veličine i obrasca račvanja. Formiraju arterio-venske šantove. Njihov nasumičan obrazac račvanja i veći nepravilni lumeni doprinose neujednačenoj perfuziji tumorskih ćelija. Štaviše, oni imaju nejednake dijemetre, haotične obrasce protoka, i povećanu permeabilnost za makromolekule (162, 163) Gustina tumorskih sudova je veoma heterogena. Najviše vrednosti su nađene na invazivnoj tumorskoj ivici, gde je gustina četiri do deset puta veća nego u unutrašnjosti tumora. Aranžman krvnih sudova u centru je više iregularan nego na njegovim ivicama (164). Tumorski krvni sudovi prikazuju čitav spektar podtipova sudova, koji variraju od kapilarnih, preko "majčinskih" krvnih sudova (veliki, porozni, tankog zida, fenestrirani sinusoidi sa oskudnim pericitima), do glomeruloidnih sudova (slabo organizovane vaskularne strukture koje podsećaju na glomerule, i sastoje se od endotelnih ćelija i pericita sa minimalnim vaskularnim lumenima i udvostručenom bazalnom membranom.) i vaskularnih malformacija (majčinski krvni sudovi koji imaju asimetričan glatko mišićni omotač i/ili omotač od fibroznog vezivnog tkiva) (165). Molekularni mehanizmi koji dovode do izmenjene vaskularne arhitekture nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da je poremećena ravnoteža pro- i antiangiogenih faktora ključni činilac. Štaviše, mehanički stres, koji je prouzrokovan od strane proliferišućih tumorskih ćelja, takođe komprimuje sudove u tumoru, sa nekim sudovima koji postaju prenaplašeno veliki, i drugim koji su više nezreli i mali (166, 167). Ove strukturalne nepravilnosti dovode do poremećaja protoka krvi, hipoksije, prekomerne propustljivosti, i povišenog intersticijalnog pritiska u mnogim solidnim tumorima, što zauzvrat ima ugrožavanje dostave antikancerskih lekova, kao i kiseonika do tumorskog tkiva.

Poznato je da papilarni karcinomi štitaste žlezde imaju sklonost za intratiroidno širenje posredstvom limfatika, sa daljom propagacijom u regionalne limfne noduse, dok folikularni karcinomi uglavnom metastaziraju hematogeno. Ove posebnosti u metastatskim osobitostima diferentovanih tumora štitaste žlezde nisu u potpunosti razjašnjene, ali mogu biti u vezi sa tumorskom angiogenezom, kao glavnim faktorom u razvoju i progresiji tumora. Skorije studije angiogeneze na tumorima štitaste žlezde su pokazale da ekspresija različitih faktora koji promovišu de novo formiranje krvnih sudova je povećana u svim tumorima štitaste žlezde (hemangiogeneza), dok je ekspresija limfangiogenih faktora rasta značajno povećana samo u papilarnom karcinomu štitaste žlezde (168, 169). Među angiogenim faktorima, najviše proučavani u neoplazmama štitaste žlezde su vaskularno endotelni faktori rasta (VEGF), jedni od najvažnijih regulatora tumorske angiogeneze. Ekspresija VEGF gena i proteina je povećana ne samo u tumorima, već i u Graves-ovom oboljenju, Hashimoto tireoiditisu, i strumi (169,170). Povećanje koncentracije VEGF u PTC i FTC ide paralelno sa povećanjem proliferativne ćelijske aktivnosti evaluirane bojenjem na KI67, ukazujući na povećanju angiogenezu u oba tipa tumora (171). Pokazano je da članovi VEGF familije promovišu i hemangioangiogenezu i limfangiogenezu u štitastoj žlezdi tokom patoloških procesa. Demonstrirano je da su nivoi VEGF-C, koji stimuliše limfangiogenezu, povećani u PTC-u, ali ne i u drugim karcinomima štitaste koji imaju sklonost da metastaziraju limfogeno (168,172). Tumori štitaste žlezde imaju veću vaskularnu gustinu u odnosu na normalnu štitastu žlezdu. Povećanje mikrovaskularne gustine je pokazano u malignim u odnosu na benigne folikularne tumore, dobro diferentovanim tiroidnim karcinomima i PTC-u (173, 174).

CD31, takođe poznat i kao trombocitno endotelni ćelijski adhezioni molekul-1 (PECAM-1), je membranski glikoprotein lociran na spojevima endotelnih ćelija, i na površini trombocita. Igra ulogu u trombozi, zarastanju rana i angiogenezi. CD31, je pan-endotelni marker koji je obično korišćen da bi se procenila mikrovaskularna gustina (MVD), igra ulogu u angiogenezi kroz njegovu uključenost u endotelne ćelijsko-ćelijske i ćelijsko matriksne interakcije, i sprovođenje signala.

Imunomarker specifičan za limfne sudove, D2-40, je korišćen za određivanje limfo-vaskularne gustine (LVD) u nekoliko tipova tumora štitaste žlezde (175, 176).

1.5. Tkivni mikroniz

Tkivni mikroniz (*tissue microarray* –TMA) sadrži i do 1000 tkivnih cilindara (u formalinu fiksirana i u parafin ukalupljena tkiva) koji su dobijeni iz donorskog parafinskog kalupa i prenešeni u jedan recipijenti parafinski kalup. Ovaj recipijentni kalup se kasnije seče i isečci se stavljaju na staklene pločice. U zavisnosti od dužine cilindara, iz jednog TMA može se proizvesti i do 300 pločica. Postoje brojne oblasti primene tkivnog mikroniza:

- Vrednovanje (validacija/provera) podataka dobijenih sa cDNA čipova (177)
- Provera senzitivnosti i specifičnosti novootkrivenih antitela
- Korišćenje TMA sa citološkim uzorcima
- Obezbeđivanje kvaliteta u imunohistohemiji (178)
- Prevođenje podataka sa ćelijskih linija, ksenograftova i animalnih modela na humane maligne tumore (179)
- Kolaborativne studije
- Molekularno profilisanje velikih serija tumora ili obolelih tkiva i korelacija sa kliničkim ishodom
- Evaluacija dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih potencijala novootkrivenih gena i molekula.

Postoje različiti tipovi TMA:

- Multitumorski TMA: Ovi TMA sadrže uzorke nekoliko različitih tipova tumora sa ciljem da se testira specifičnost novog monoklalnog antitela (180)
- Progresivni TMA: Sadrži uzorke jednog tipa tumora u različitim stadijumima, sa ciljem da prouče promene ili sličnosti u genskoj amplifikaciji ili ekspresiji proteina u različitim stadijumima, u tom tipu tumora (180).
- Prognostički TMA: Sadrže uzorke tumora sa udruženim kliničkim podacima dobijenim dugotrajnim praćenjem sa ciljem da se identifikuju i procene promene i prognostički markeri za predikciju kliničkog odgovora na terapijske intervencije poput hemoterapeutskih lekova ili radijacione terapije (181).
- Retki tumor ili bolesti: Sa ciljem da se sačuva što je moguće više tkiva za buduće studije retkih maligniteta ili oboljenja, TMA pruža način da se iskoristi

mali uzorak koji može biti složen zajedno sa tkivnim cilindrima dobijenim iz brojnih institucija, očuvavajući veoma ograničene resurse.

Na tkivnom mikronizu mogu se primeniti različite procedure: imunohistohemija, hromogena in situ hibridizacija, fluorescentna in situ hibridizacija, *multiplex immunoblotting*, *quantum dots*. U nastavku su navedene najčešće korišćene procedure sa osvrtom na specifičnosti i ograničenja:

1. Imunohistohemija:

Isečci dobijeni sa TMA, tokom imunohistohemijske procedure, su veoma podložni gubitku tkiva tokom deparafinizacije i demaskiranja antigena. Oni su podložni i nastanku efekta obojene ivice. Postoje dve kategorije proteina koji su veliki izazov za imunohistohemiju. To su transkripcioni faktori, koji zbog veoma malog broja kopija po ćeliji, ponekad ne mogu da se vizuelno detektuju, i citokini koji zbog difuzije kroz tkivo mogu da naprave nespecifično bojenje (182).

2. Hromogena/fluorescentna in situ hibridizacija (CISH/FISH)

Fiksacijom u formalinu nastaju ukršteni metilenski mostovi koji čuvaju tkivnu strukturu, ali nedostatak ovoga je da se smanjuje dostupnost hibridizacionih ciljeva. Koraci u predtretmanu, kao što je upotreba natrijum tiocijanata i digestija pepsinom da bi se demaskirala ciljna DNK, moraju biti optimizovani za svaki tip tkiva. Pošto multitumorski TMA sadrže mnoga različita tkiva to može zahtevati različite tipove predtretmana, o čemu treba razmišljati prilikom dizajniranja odgovarajućeg TMA za eksperiment (183).

U nekoliko tipova tumora, a za različite markere, sprovedene su studije koje su poredile imunohistohemijske nalaze na uzorcima iz tkivnog mikroniza sa imunohistohemijskim nalazima na isečcima sa odgovarajućih donorskih kalupa. Postavlja se nekoliko pitanja. Koja veličina i koji broj tkivnih cilindara je optimalan? Da li tako mali uzorci mogu odražavati tumorsku heterogenost?

Opšta saglasnost je da tri cilindra dijametara 0,6mm obezbeđuju adekvatno predstavljanje, i pošto se pretpostavlja da će bar jedan cilindar biti izgubljen tokom transfera na staklenu pločicu, ili tokom bojenja, ostaće dva cilindra za skorovanje. Slično, dva cilindra čiji je dijametar 1.0 ili 1.5 mm, se smatraju reprezentativnim. Uzimanje cilindara iz različitih tkivnih kalupa jednog tumora

može donekle pomoći u oslikavanju heterenosti istog. Bitna činjenica koju treba imati na umu je da su ove studije bazirane na pretpostavci da je praksa standardnog uzorkovanja tkiva zlatni standard i reprezentativna je za ceo tumor(184,185, 186, 187).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su :

1. Ispitivanje i poređenje ekspresije CD31, D2-40, CK19, CD56, Galectin-3, HBME-1, u benignim i malignim lezijama štitaste žlezde, porekla folikularnih ćelija, koje se prezentuju klinički kao nodusi.
2. Određivanje značaja pojedinačne i kombinovane ekspresije markera neoangiogeneze (CD31, D2-40) i drugih markera (CK19, CD56, Galectin-3, HBME-1) za procenu malignog potencijala lezija štitaste žlezde.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Istraživanje je dizajnirano kao studija preseka. Istraživanjem je, metodom slučajnog izbora, bilo obuhvaćeno 208 pacijenata. Pacijenti su hirurški tretirani zbog nodusa štitaste žlezde, u Centru za endokrinu hirurgiju (II hirurška klinika) u periodu od 01. januara 2010. godine do 31. decembra 2013. godine. Kriterijum izbora je veličina preseka nodusa čiji je dijametar veći od 5mm. Dijagnoze od interesa su: koloidni i folikularni adenom, hiperplastični nodus, PTC, FTC, adenom i karcinom Hirtleovih ćelija, dobro diferentovani tumor neizvesnog malignog potencijala. U svim ispitivanim slučajevima, dijagnoza je potvrđena od strane dva nezavisna endokrina patologa, a na osnovu evaluacije HE obojenih pločica. Tokom ispitivanja, iz studije je isključeno 7 pacijenata. U šest slučajeva unutar TMA, cilindri nisu odgovarali prethodno određenim zonama od interesa, a u dva slučaja nedostajala su oba cilindra, koja reprezentuju jedan slučaj. Kompletno ispitivanje sprovedeno je na uzorku od 201 slučaja, 44 pacijenta muškog pola i 157 pacijenata ženskog pola.

3.2. Metode rada

Tkivo štitaste žlezde sa tumorom je dostavljeno na patohistološku obradu, pri čemu je materijal makroskopski pregledan i opisan. Veličina tumora je određena makroskopskim pregledom i definisana najvećom vrednosti od tri dimenzije nodusa. Veličina tumora koji je manji ili jednak 1 cm je naknadno i mikroskopski evaluirana.

Uzorci tkiva za histološku analizu su fiksirani u 10% formalinu, ukalupljeni u parafinske blokove i sečeni na rezove debljine 5 μ m. Deparafinisani tkivni isečci su bojeni metodom hematoksilin-eozin (HE) i analizirani.

Rezultati patohistološke analize HE preparata:

- Histološka dijagnoza nodusa
- Selekcija pločice, čiji će se parafinski kalup koristiti kao donorski kalup za izradu tkivnog mikroniza
- Označavanje markerom zona od interesa na pločici

Histološka dijagnoza tumora štitaste žlezde je određena na osnovu predloga patohistološke klasifikacije tumora štitaste žlezde Svetske Zdravstvene Organizacije

(188). Po ovoj klasifikaciji tumori Hirtleovih ćelija predstavljaju podtipove folikularnog adenoma/karcinoma. Prema klasifikaciji navedenoj u udžbeniku autora Rosajja i Akermana, to su zasebni entiteti (189).

Zone od interesa su predstavljene tumorskim tkivom u pojasu širine od 1mm, neposredno ispod tumorske kapsule ili na samom invazivnom frontu.

Selektovane su minimalno dve zone od interesa. Kriterijumi za izbor zone, pored gore već navedenog, su očuvana morfologija, visoka celularnost, odsustvo sekundarnih regresivnih promena (krvarenje, fibroza, kalcifikacije), odsustvo nekroze i prisustvo jasno uočljive mikrovaskulane mreže.

3.2.1. Konstrukcija tkivnog mikroniza

Po učinjenom pregledu svih pripadajućih pločica za pojedinačni slučaj, selektovana je jedna reprezentativna HE obojena pločica. Pošto su izdvojene reprezentativne pločice u narednom aktu su obeležavane markerom zone od interesa na pločici, uz upotrebu mikroskopa (Olympus BX41). Po odabiru i markiranju pločice, a s obzirom da su pločice numerisane na identičan način kao i odgovarajući parafinski kalupi (jedan kalup=jedan broj) iz arhive je odvajan odgovarajući parafinski kalup („kalup donor“). Pošto su upareni odgovarajući donorski kalup i već markirana pločica, zone od interesa su prenete sa pločice na odgovarajući kalup. Instrumentom (šuplja igla prečnika 1.2mm) su uzeta 2 cilindra tkiva iz predhodno obeleženih kalupa donora i preneti u prethodno označena i kodirana mesta unutar kalupa recipijenta. U recipijentni kalup su uvršćene i spoljašnje pozitivne kontrole, unete na isti način.

Recipijentni kalup se, nakon unošenja poslednjeg tkivnog cilindra, stavlja u odgovarajuću metalnu modlu, polaže u laboratorijsku pećnicu na 60 Celsius stepeni, i inkubira 50 minuta. Po vađenju iz pećnice, kalupi se prenose na ledenu podlogu i ostavljaju da leže 15 minuta.

Napravljena su 4 recipijentna parafinska kalupa sa 8 redova i 13 kolona cilindara (104 inkorporirana tkivna cilindra), sa 5 kontrolnih tkiva u 14. koloni.

S obzirom da tokom izrade TMA može doći do osipanja i trošenja tkiva, svi slučajevi od kojih je prisutan minimalno jedan tkivni cilindar, na svim ispitivanim presecima, su uključeni u istraživanje.

3.2.2. Imunohistohemijska metoda

Parafinski kalupi sa tkivnim mikronizom su sečeni na preseke debljine 4µm. Informacije o antitelima i imunohistohemijskom metodu (proizvođač, klon, razblaženje, pretretman, dužina inkubacije primarnog antitela, vizuelizacioni kitovi) su radi preglednosti predstavljene u Tabeli 1.

Tabela 1

Proizvođač	Kataloški broj	Antitelo	Razblaženje	Pretretman	Inkubacija sa prim. At.	Kit za vizualizaciju	Kataloški broj kita	Proizvođač kita
DAKO, DENMARK A/S	M0823	CD31, Endothelial Cell, Clone JC70A	1:25	mikrotalasna pećnica 20', citratni pufer pH6	1h	UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer	TL-125-HL	Thermo Scientific™, USA
NOVOCASTRA, UK	NCL-L-CD56-1B6	CD56 (NCAM) Clone 1B6	1:50	mikrotalasna pećnica 20', citratni pufer pH6	1h	UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer	TL-125-HL	Thermo Scientific™, USA
DAKO, DENMARK A/S	M0888	Cytokeratin 19, Clone RCK108	1:50	enzimska digestija, proteinaza K 10' sobna T	30'	UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer	TL-125-HL	Thermo Scientific™, USA
DAKO, DENMARK A/S	M3619	D2-40, Clone D2-40	1:100	mikrotalasna pećnica 20', citratni pufer pH6	1h	UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer	TL-125-HL	Thermo Scientific™, USA
DAKO, DENMARK A/S	M3505	Mesothelial Cell, Clone HBME-1	1:50	mikrotalasna pećnica 20', citratni pufer pH6	1h	UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer	TL-125-HL	Thermo Scientific™, USA
TECHNE/R&D SYSTEMS, USA	MAB1154	Human Galectin-3, Clone 194804	1:100	mikrotalasna pećnica 20', citratni pufer pH6	12h na 4°C	UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer	TL-125-HL	Thermo Scientific™, USA

Imunohistohemijska analiza je vršena svetlosno mikroskopski, kvalitativnom i semikvantitativnom analizom, uz korišćenje kontrola.

3.2.2.1.Imunohistohemijska analiza ekspresije citokeratina 19.

Pozitivnim bojenjem je smatrana citoplazmatska i/ili membranska ekspresija CK19. Imunoreaktivnost je smatrana pozitivnom kad je najmanje 11% tumorskih ćelija pozitivno na CK19, nezavisno od intenziteta bojenja. Distribucija bojenja je gradirana kao "1", "2", "3" or "4" , kada 11–25%, 26–50%, 51–75% ili 76–100% tumorskih ćelija pokazuje pozitivnu ekspresiju, respektivno (190, 191).

Kao pozitivna spoljašnja pozitivna kontrola koristile su se epitelne ćelije kripti apendiksa, a kao unutrašnja pozitivna kontrola koristile su se maligne epitelne ćelije papilarnog karcinoma štitaste žlezde.

3.2.2.2.Imunohistohemijska analiza ekspresije HBME-1

Pozitivnim bojenjem je smatrana membranska ± citoplazmatska ekspresija HBME-1. Imunoreaktivnost je smatrana pozitivnom kad je najmanje 11% tumorskih ćelija pozitivno na HBME-1, nezavisno od intenziteta bojenja. Distribucija bojenja je gradirana kao "1", "2", "3" or "4" , kada 11–25%, 26–50%, 51–75% ili 76–100% tumorskih ćelija pokazuje pozitivnu ekspresiju, respektivno (191,192,193).

Kao pozitivna spoljašnja pozitivna kontrola koristile su se ćelije mezotela apendiksa.

3.2.2.3.Imunohistohemijska analiza ekspresije Galectin-3

Pozitivnim bojenjem je smatrana citoplazmatska i/ili membranska ekspresija ekspresija Galectin-3. Imunoreaktivnost je smatrana pozitivnom kad je najmanje 11% tumorskih ćelija pozitivno na Galectin-3, nezavisno od intenziteta bojenja. Distribucija bojenja je gradirana kao "1", "2", "3" or "4" , kada 11–25%, 26–50%, 51–75% ili 76–100% tumorskih ćelija pokazuje pozitivnu ekspresiju, respektivno(191, 193).

Kao pozitivna spoljašnja pozitivna kontrola koristile su se epitelne ćelije kripti apendiksa.

3.2.2.4.Imunohistohemijska analiza ekspresije CD56

Pozitivnim bojenjem je smatrana membranska ekspresija CD56.

Za CD56, marker čija je ekspresija redukovana ili odsutna u karcinomima štitaste žlezde, pozitivan rezultat (ili "maligni profil") će biti smatran kada se 0-10% tumorskih ćelija boji pozitivno.

Svi nalazi su podeljeni u dve grupe:
Skor 0- negativna grupa (11-100% pozitivnih tumorskih ćelija)

Skor 1 –pozitivna grupa (0-10% pozitivnih tumorskih ćelija)

Kao pozitivna spoljašnja pozitivna kontrola koristili su se periferni nervi u pravom mišićnom sloju apendiksa, a kao pozitivna unutrašnja kontrola korišćeni su tireociti unutar koloidnog adenoma ili folikularnog adenoma (190, 191)

3.2.2.5.Imunohistohemijska analiza ekspresije CD31

Pozitivnim bojenjem je smatrana membranska i/ili citoplazmatska ekspresija ekspresija CD31.

Bilo koja braon obojena endotelna ćelija ili grupa endotelnih ćelija koja je jasno odvojena od susednih mikrosudova, tumorskih ćelija, ili drugih elemenata vezivnog tkiva, je smatrana pojedinačnim, brojivim mikrosudom. Lumen sudova, iako je često prisutan, nije neophodan za definisanje strukture kao mikrosuda. Takođe, crvena krvna zrnca nisu korišćena za definisanje lumena sudova. Svaki 40 µm dužine mikrosuda je računato kao novi mikrosud (194, 195).

Svaki pojedinačni slučaj je predstavljen sa dva tkivna cilindra. Preseci svakog cilindra TMA su fotografisani pomoću kamere Olympus DP70 na uveličanju 200x, pri konstantnom osvetljenju. Površina fotografisanog preseka iznosi 0,55 mm². Od dva preseka, presek sa većom mikrovaskularnom gustinom je biran za dalju analizu. U slučaju da nije bilo moguće napraviti razliku između dva cilindra u pogledu mikrovaskularne gustine, analizirana su oba preseka i srednja vrednost je uzimana za vrednost mikrovaskularne gustine.

U ImageJ programu (ImageJ 1.48V) formirana je mreža nad slikom promera 10x10µm. U gore navedenom programu, manuelno su izbrojani mikrosudovi korišćenjem opcije Plugins/Analyze/Cell Counter.

U slučajevima kada je presek tkivnog cilindra bio nepotpun, ili kada tumorsko tkivo ne zauzima celokupan presek cilindra, u ImageJ programu je izračunavana površina od interesa. S obzirom da bi u tim okolnostima postojala mogućnost neuravnoteženosti rezultata od slučaja do slučaja, svi prebrojani krvni sudovi na zadatoj površini izraženoj u mm^2 (idealno $0,55 \text{ mm}^2$) su uz pomoć proporcije bili prevođeni na broj krvnih sudova po 1 mm^2 .

Za spoljašnje pozitivne kontrole korišćeni su endotelne ćelije krvnih sudova patološki neizmenjene štitaste žlezde.

3.2.2.6. Imunohistohemijska analiza ekspresije D2-40

Pozitivnim bojenjem je smatrana citoplazmatska i/ili membranska ekspresija ekspresija D2-40.

Bilo koja braon obojena endotelna ćelija ili grupa endotelnih ćelija koja je jasno odvojena od susednih mikrosudova, tumorskih ćelija, ili drugih elemenata vezivnog tkiva, je smatrana pojedinačnim, brojivim mikrosudom. Lumen sudova, iako je često prisutan, nije neophodan za definisanje strukture kao mikrosuda. Svakih $40 \mu\text{m}$ dužine mikrosuda je računato kao novi mikrosud (194, 195, 196).

Svaki pojedinačni slučaj je predstavljen sa dva tkivna cilindra. Preseci svakog cilindra TMA su fotografisani pomoću kamere Olympus DP70 na uveličanju 200x, pri konstantnom osvetljenju. Površina fotografisanog preseka iznosi $0,55 \text{ mm}^2$. Od dva preseka, presek sa većom limfovaskularnom gustinom je biran za dalju analizu. U slučaju da nije moguće napraviti razliku između dva cilindra u pogledu limfovaskularne gustine, analizirana su oba preseka i srednja vrednost je uzimana za vrednost mikrovaskularne gustine.

U ImageJ programu (ImageJ 1.48V) formirana je mreža nad slikom promera $10 \times 10 \mu\text{m}$. U gore navedenom programu, manuelno su izbrojani mikrosudovi korišćenjem opcije Plugins/Analyze/Cell Counter.

U slučajevima kada je presek tkivnog cilindra bio nepotpun, ili kada tumorsko tkivo ne zauzima celokupan presek cilindra, u ImageJ programu je izračunavana površina od interesa. S obzirom da bi u tim okolnostima postojala mogućnost neuravnoteženosti rezultata od slučaja do slučaja, svi prebrojani krvni sudovi na zadatoj površini izraženoj u mm^2 (idealno $0,55 \text{ mm}^2$) su uz pomoć proporcije bili prevođeni na broj krvnih sudova po 1mm^2 .

Za spoljašnje pozitivne kontrole korišćeni su endotelne ćelije limfnih sudova mukoze/submukoze i subseroze apendiksa.

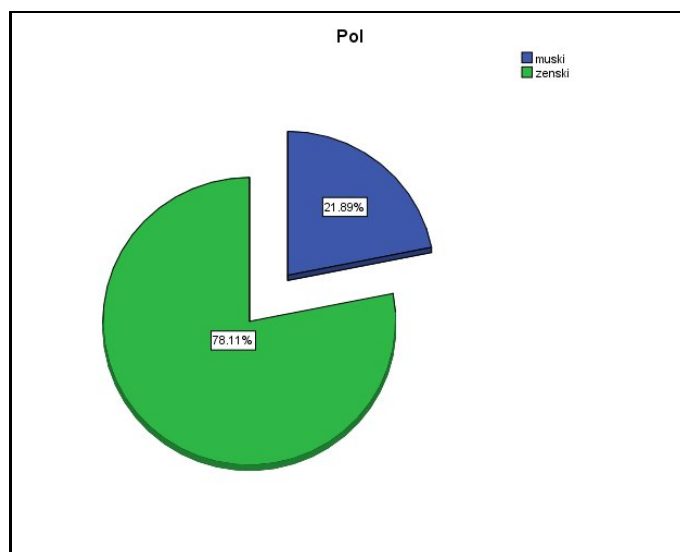
3.3. Statistička analiza

U studiji su korišćene deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih su korišćeni apsolutni i relativni brojevi (n,%), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (standardna devijacija). Od analitičkih statističkih metoda su korišćeni testovi razlike i testovi za ispitivanje valjanosti dijagnostičkog metoda. Od testova za ispitivanje značajnosti razlike, korišćeni su parametarski testovi (t test i ANOVA) i neparametarski testovi (Hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test). Od dijagnostičkih testova je korišćena senzitivnost , specifičnost , pozitivna prediktivna vrednost (PPV), negativna prediktivna vrednost (NPV). Takođe, radi upoređivanja ispitivanih markera ROC kriva je konstruisana. Rezultati će biti prikazani tabelarno i grafički. Svi podaci biće obrađeni u SPSS 20.0 (IBM korporacija) softverskom paketu. U svim primenjenim analitičkim metodama nivo statističke značajnosti bio bi definisan verovatnoćom nulte hipoteze od 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike ispitanika

Istraživanjem je, metodom slučajnog izbora, bilo obuhvaćeno 208 pacijenata. Kompletno ispitivanje sprovedeno je na uzorku od 201 slučaja, 44 pacijenta muškog pola i 157 pacijenata ženskog pola (Grafikon 1).

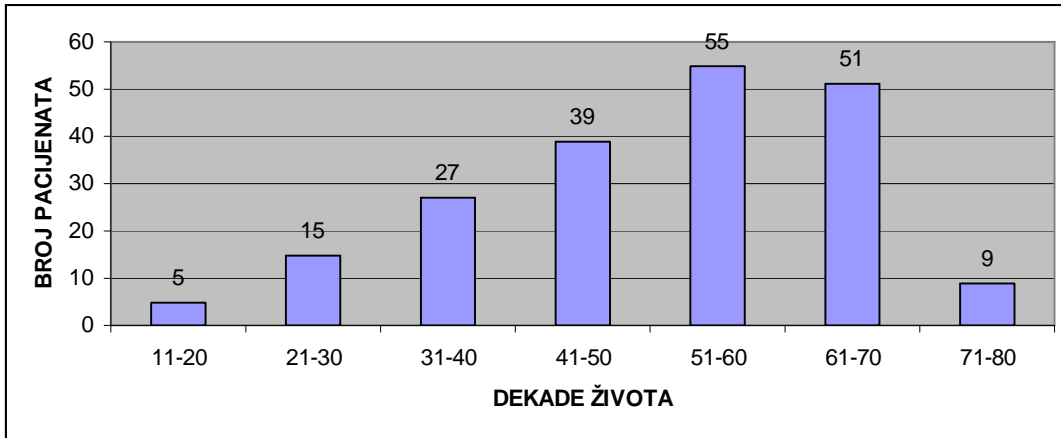


Grafikon 1 Polna distribucija

Najmlađi pacijent u vreme postavljanja dijagnoze je imao 14 godina, a najstariji 78 godina. Prosečna starost pacijenata u uzorku je $50,94 \pm 14,080$ godine, sa medijanom od 53 godine (Tabela 2). Najveći broj pacijenata nalazi se u šestoj dekadi života (27,36%) (Grafikon 2).

Tabela 2 Starosna distribucija

Ukupan Broj	Prosečna starost	Standardna devijacija	Medijana	Minimum	Maksimum
201	50.94	14.080	53.00	14	78

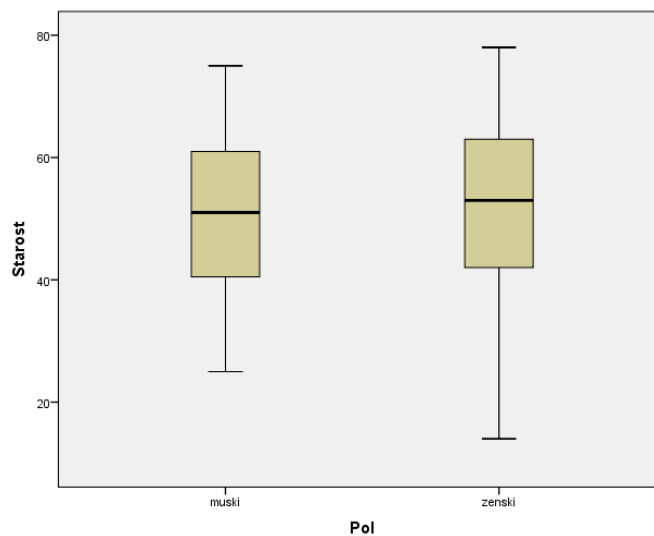


Grafikon 2 Starosna distribucija izražena u apsolutnim brojevima

Poredeći pacijente prema polu, a u odnosu na starost (Tabela 3, Grafikon 3), dolazimo do zaključka da nema razlike u starosnoj distribuciji u odnosu na pol ($p=0,950$)

Tabela 3 Starosna distribucija u odnosu na pol

Pol	Srednja vrednost	N	SD	Min	Max
Muški	50.82	44	12.354	25	75
Ženski	50.97	157	14.563	14	78
Ukupno	50.94	201	14.080	14	78



Grafikon 3 Starosna distribucija u odnosu na pol

Poređenjem kategorija “benigno” i “maligno” u odnosu na pripadnost polu (Tabela 4) možemo da zaključimo da ne postoji statistički značajna razlika, to jest da je raspodela benignih i malignih lezija kod muškaraca i žena slična (Pearson Chi-Square; $p=0.134$)

Tabela 4 Distribucija benignih i malignih tumora u odnosu na pol

		Pol / Tip tumora			
		Tip tumora		Ukupno	
Pol			Benigni		Maligni
		Muško	N	13	31
%	29.5%		70.5%	100.0%	
Ženski	N	66	91	157	
	%	42.0%	58.0%	100.0%	
Ukupno		N	79	122	201
		%	39.3%	60.7%	100.0%

Analizom skupa i poredeći da li se starost pacijenata razlikuje u benignoj i malignoj grupi lezija došli smo do sledećih rezultata (Tabela 5). Prosečna starost pacijenata u benignoj grupi lezija ($53,34 \pm 13,42$) je nešto viša nego u grupi sa malignim lezijama ($49,38 \pm 14,33$), a uočena razlika je na granici statističke značajnosti ($p=0,051$).

Tabela 5 Odnos grupa benigno/maligno u odnosu na starost pacijenata

Tip tumora	N	Srednja vrednost	SD	Medijana	Min	Max
Benigni	79	53.34	13.422	56.00	22	78
Maligni	122	49.38	14.329	51.00	14	75
Ukupno	201	50.94	14.080	53.00	14	78

4.2. Kliničko patološke karakteristike ispitivanog uzorka

U uzorku od 201 pacijenta, benigni nalaz je bio prisutan kod 79 (39,3%) pacijenata, a maligni nalaz kod 122 (60,7%) pacijenata.

Najčešća benigna dijagnoza nodusa je koloidni adenom (14,9% svih dijagnoza), a najčešća maligna dijagnoza je papilarni karcinom (43,3% svih dijagnoza) (Tabela 6).

Tabela 6 Distribucija pacijenata u odnosu na patohistološki nalaz

PH nalaz	N	%	Kumulativni %
Adenoma colloidis	30	14.9	14.9
Adenoma folliculare	27	13.4	28.4
Adenoma Hurthle cell	10	5.0	33.3
Adenoma hyperplasticum	12	6.0	39.3
Carcinoma folliculare	15	7.5	46.8
Carcinoma Hurthle cell	20	10.0	56.7
Carcinoma papillare	87	43.3	100.0
Ukupno	201	100.0	

U grupi papilarnih karcinoma najčešći histološki podtip u ispitivanom uzorku je folikularna varijanta PTC-a (47,62%) a najređi podtip je oksifilna varijanta PTC (3,57%) (Tabela 7)..

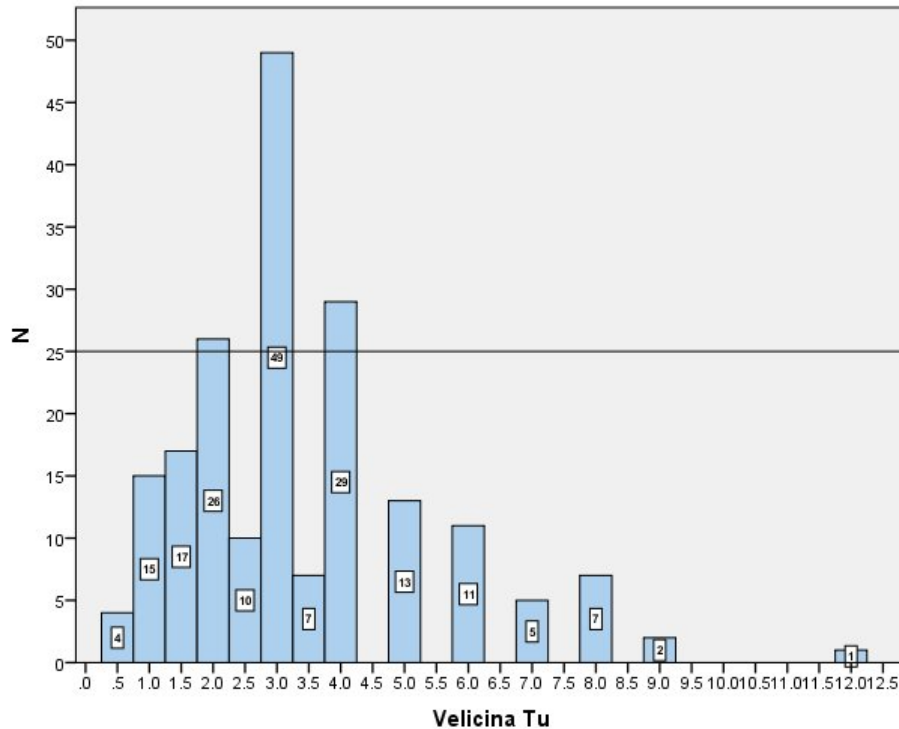
Tabela 7 Podtipovi papilarnog karcinoma štitaste žlezde i njihova distribucija

Varijante PTC	F	%	Kumulativni %
Folikularna	40	47.6	47.6
Klasicna	27	32.1	79.8
Mesovita	9	10.7	90.5
Oksifilna	3	3.6	94.0
Solidna	5	6.0	100.0
Ukupno	84	100.0	

Najveći broj nodularnih lezija u ispitivanom uzorku je veličine oko 3 cm (prosečna vrednost $3,36 \pm 1,92$ cm) sa medijanom od 3 cm (Tabela 8, Grafikon 4). Najmanji nodus u ispitivanom uzorku je veličine 0.5cm, a najveći 12 cm. Upoređujući podatke o veličini tumora dobijene makroskopskim pregledom preparata sa kliničkim podacima o veličini dominantnog nodusa, zbog čega je i izvršena hirurška intervencija, nalazimo da ne postoji značajna razlika. Upoređujući benigne i maligne lezije u odnosu na veličinu tumora (Tabela 9), zaključujemo da u ispitivanom skupu ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na ove dve grupe ($p=0,719$)

Tabela 8 Veličine tumora i klinički dominantnih nodusa

	Prosečna vrednost	Standardna devijacija	Medijana	Min	Max
Veličina tumora	3.357	1.9223	3.000	.5	12.0
Dominantni čvor	3.525	2.0230	3.000	.5	14.0



Grafikon 4 Distribucija pacijenata u odnosu na veličinu tumor

Tabela 9 Veličine tumora u odnosu na tip tumora

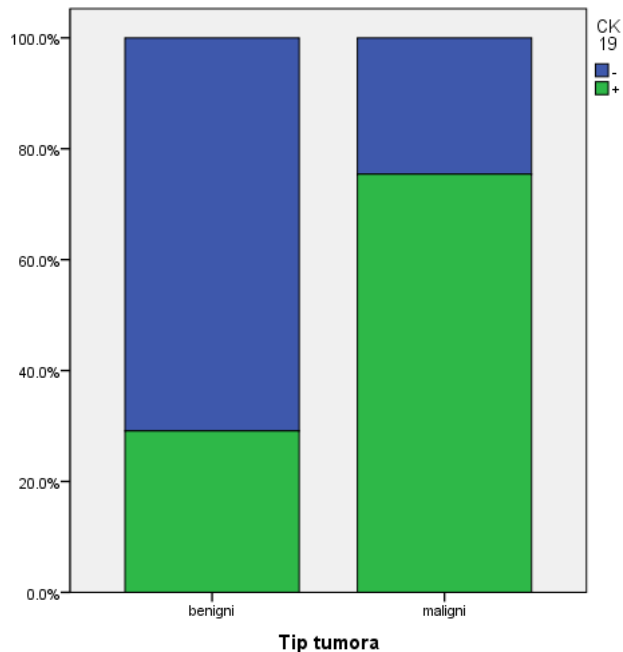
		Velicina tumora				
		Srednja vrednost	Mediana	Min	Max	SD
Tip tumora	Benigni	3.3	3.0	.5	9.0	1.7
	Maligni	3.4	3.0	.5	12.0	2.0

4.3. Ekspresija citokeratina 19 (CK19)

Uvidom u Tabelu 10 i Grafikon 5 uočava se da najveći broj benignih lezija (70,9%) ima negativnu ekspresiju CK19. S druge strane, distribucija ekspresije citokeratina 19 u malignim lezijama pokazuje obrnut trend i pozitivnu ekspresiju CK19 u 75,4% malignih nodusa.

Tabela 10 Ekspresija CK19 u benignim i malignim tumorima

		CK 19		Ukupno	
		-	+		
Tip tumora	Benigni	N	56	23	79
		%	70.9%	29.1%	100.0%
	Maligni	N	30	92	122
		%	24.6%	75.4%	100.0%
		N	86	115	201
		%	42.8%	57.2%	100.0%



Grafikon 5 Poređenje ekspresije CK19 u benignim i malignim tumorima

Ako se posmatra distribucija ekspresije CK19 unutar maligne grupe (Tabela 11), uočava se da najveći broj slučajeva (54; 58,7%) pokazuje izraženu ekspresiju (76-100% tumorskih ćelija). Uočena razlika u ekspresiji CK19 između benignih i malignih lezija je visoko statistički značajna ($p=0.000$). Kada smo iz uzorka eliminisali papilarne karcinome na taj način eliminišući doprinos papilarnog karcinoma, i uporedili maligne i benigne entitete u odnosu na ekspresiju CK19, dobili smo statistički značajnu razliku u ekspresiji CK19 između benigne i maligne grupe ($p=0.045$).

Tabela 11 Distribucija malignih i benignih lezija u odnosu na procenat tumorskih ćelija koje ekspimiraju CK19

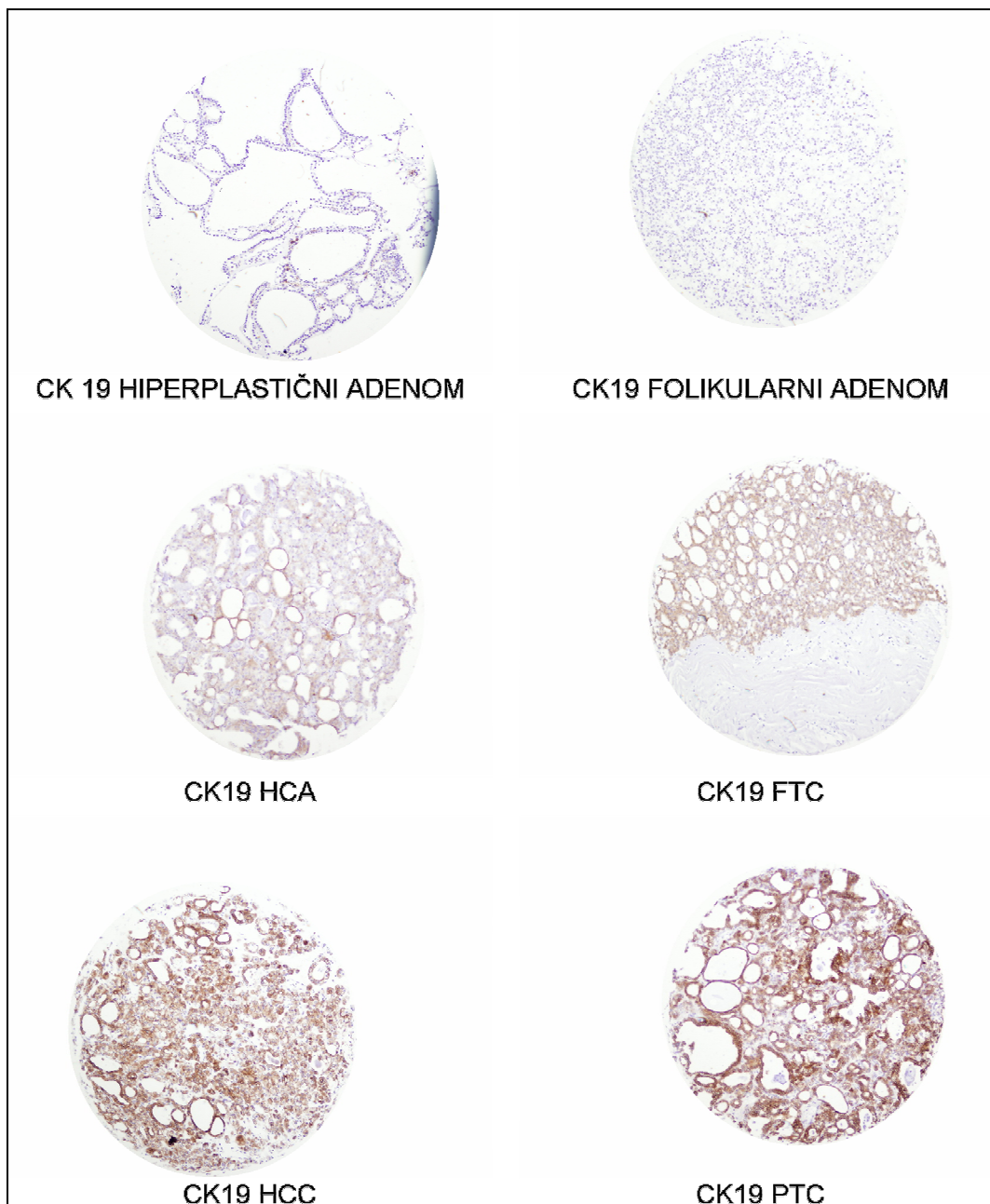
		CK 19					Ukupno	
		0-10%	11-25%	26-50%	51-75%	76-100%		
Tip tumora	Benigni	n	56	10	6	4	3	79
		%	70.9%	12.7%	7.6%	5.1%	3.8%	100.0%
	Maligni	n	30	8	15	15	54	122
		%	24.6%	6.6%	12.3%	12.3%	44.3%	100.0%
Ukupno		n	86	18	21	19	57	201
		%	42.8%	9.0%	10.4%	9.5%	28.4%	100.0%

U grupi benignih lezija (Tabela 12, Slika 1), nijedan hiperplastični adenom nije pokazivao ekspresiju CK19. U skupini koloidnih adenoma, u 36,7% slučajeva se uočava pozitivna ekspresija CK19. U 18% (2/11) pozitivnih slučajeva se uočava umerena do izražena ekspresija CK19 (50-100% ćelija). U skupini folikularnih adenoma, u 22,2% slučajeva se uočava pozitivna ekspresija CK19. U 50% (3/6) pozitivnih slučajeva se uočava umerena do izražena ekspresija CK19 (50-100% ćelija). U skupini adenoma Hirtleovih ćelija, u 60% slučajeva se uočava pozitivna ekspresija CK19.

Uvidom u Tabelu 13, uočava se da je 86,2% papilarnih karcinoma pozitivno, od čega je 81,3% sa izraženom ekspresijom. Karcinomi Hirtleovih ćelija u 60% slučajeva su pozitivni na CK19, sa 50% karcinoma koji pokazuju umerenu do izraženu ekspresiju (50-100% tumorskih ćelija). Folikularni karcinom u 66,7% slučajeva nije pozitivan na CK19, a od 33,3% slučajeva gde je prisutna ekspresija CK19, 60% slučajeva je sa slabom do umerenom ekspresijom CK19.

Tabela 12 Ekspresija CK19 u odnosu na patohistološki nalaz

		CK 19			
		-		+	
		N	%	N	%
PH nalaz	Adenoma colloidess	19	63.3%	11	36.7%
	Adenoma folliculare	21	77.8%	6	22.2%
	Adenoma Hurthle cell	4	40.0%	6	60.0%
	Adenoma hyperplasticum	12	100.0%	0	0.0%
	Carcinoma folliculare	10	66.7%	5	33.3%
	Carcinoma Hurhle cell	8	40.0%	12	60.0%
	Carcinoma papillare	12	13.8%	75	86.2%



Slika 1 Ekspresija CK19 (HCA-Adenom Hirtleovih ćelija, PTC- papilarni karcinom, FTC-folikularni karcinom, HCC-karcinom Hirtleovih ćelija), 100x

Tabela 13 Distribucija patohistoloških nalaza u odnosu na procenat tumorskih ćelija koje ekspimiraju CK19

		CK 19									
		0-10%		11-25%		26-50%		51-75%		76-100%	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
PH nalaz	Adenoma colloides	19	63.3%	5	16.7%	4	13.3%	1	3.3%	1	3.3%
	Adenoma folliculare	21	77.8%	2	7.4%	1	3.7%	2	7.4%	1	3.7%
	Adenoma Hurthle cell	4	40.0%	3	30.0%	1	10.0%	1	10.0%	1	10.0%
	Adenoma hyperplasticum	12	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
	Carcinoma folliculare	10	66.7%	2	13.3%	1	6.7%	1	6.7%	1	6.7%
	Carcinoma Hurhle cell	8	40.0%	3	15.0%	3	15.0%	4	20.0%	2	10.0%
	Carcinoma papillare	12	13.8%	3	3.4%	11	12.6%	10	11.5%	51	58.6%

U odnosu na ekspresiju CK19 uporedili smo međusobno tri različita tumora: papilarni karcinom, folikularni karcinom, i folikularni adenom.

U odnosu na ekspresiju CK19 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji CK19 u papilarnom i folikularnom karcinomu ($p=.000$), kao i između papilarnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p=.000$).

U odnosu na ekspresiju CK19 nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji CK19 između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p=1.00$).

Takođe, u odnosu na ekspresiju CK19 uporedili smo folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularnim karcinomom, i folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularni adenomom.

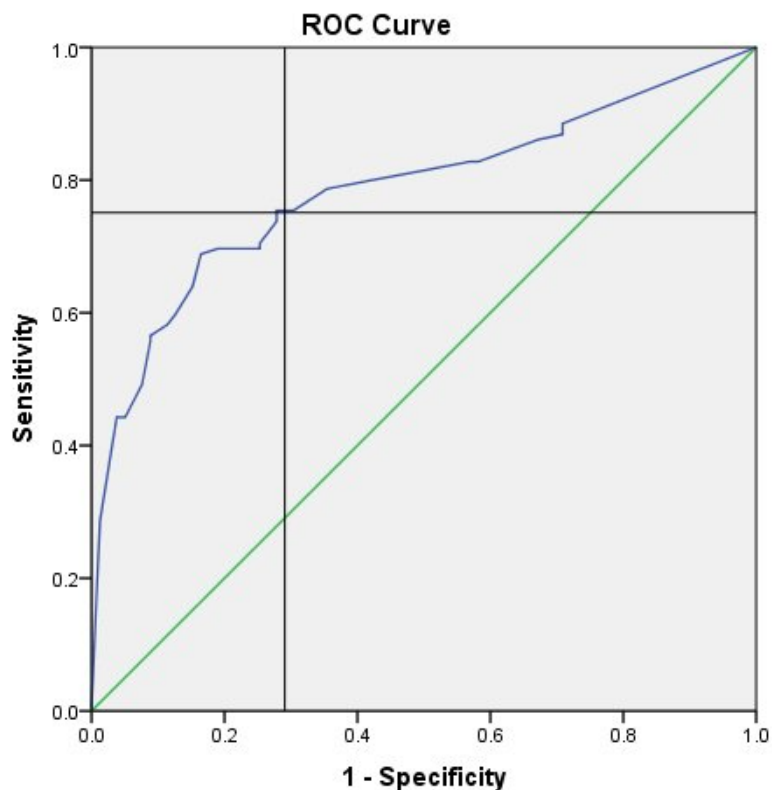
U odnosu na ekspresiju CK19 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji CK19 u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u usporedbi sa folikularnim karcinomom ($p=.004$), a takođe i između folikularne varijante papilarnog karcinoma u odnosu na folikularni adenom ($p=.000$).

Uporedili smo adenom Hirtleovih ćelija sa karcinomom Hirtleovih ćelija u odnosu na ekspresiju CK19 u ovim lezijama i nismo našli postojanje razlike ($p=.894$)

4.3.1. Dijagnostička upotrebljivost CK19 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne

Tabela 14 Karakteristike dijagnostičkog testa CK19 u klasifikaciji lezija na benigne i maligne

Senzitivnost	75.41%	66.79% to 82.75%
Specifičnost	70.89%	59.58% to 80.56%
<i>Positive Likelihood Ratio</i>	2.59	1.81 to 3.71
<i>Negative Likelihood Ratio</i>	0.35	0.25 to 0.49
Prevalenca oboljenja	60.70%	53.58% to 67.49%
Pozitivna prediktivna vrednost	80.00%	71.52% to 86.88%
Negativna prediktivna vrednost	65.12%	54.08% to 75.08%



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 6 ROC kriva – CK19 kao klasifikator lezija na benigne i maligne

Uvidom u kordinate krive (Grafikon 6), dobija se se granična vrednost od 9,5% pozitivnih tumorskih ćelija koje eksprimiraju CK19. Ukoliko je broj tumorskih ćelija sa ekspresijom CK19 jednak ili veći od ove vrednosti, možemo ustvrditi da se radi o malignoj leziji štitaste žlezde sa senzitivnošću od 75,41%, i specifičnošću od 70,89% (Tabela 14).

4.4. Ekspresija HBME-1

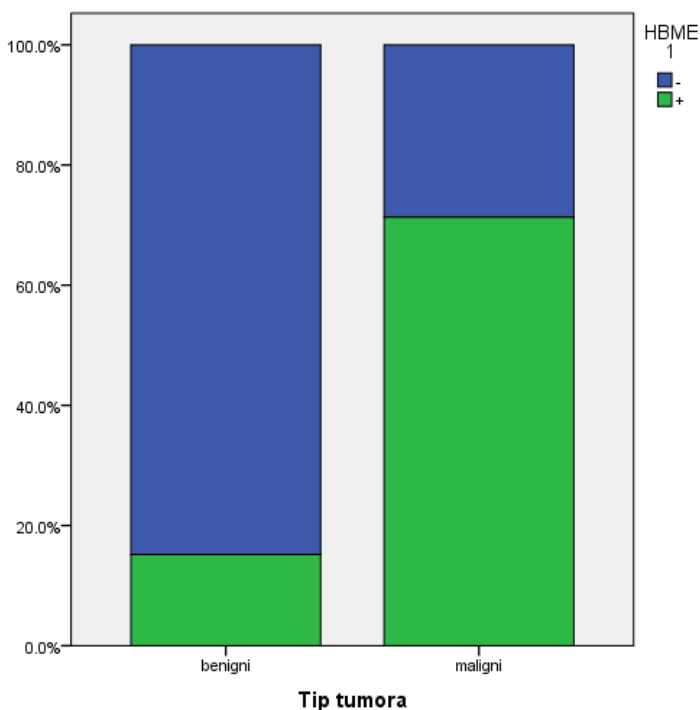
Ekspresija HBME-1 je prikazana tabelarno i grafički. Uvidom u Tabele 15, 16 i Grafikon 7, uočava se da je HBME-1 pozitivan u 15,2% benignih lezija, i 71,3% malignih lezija.

Tabela 15 Ekspresija HBME-1 u benignim i malignim tumorima

			HBME 1		Ukupno
			-	+	
Tip tumora	benigni	N	67	12	79
		%	84.8%	15.2%	100.0%
	maligni	N	35	87	122
		%	28.7%	71.3%	100.0%
Ukupno		N	102	99	201
		%	50.7%	49.3%	100.0%

Tabela 16 Distribucija malignih i benignih lezija u odnosu na procenat tumorskih ćelija koje ekspimiraju HBME-1

			HBME 1					Ukupno
			0-10%	11-25%	26-50%	51-75%	76-100%	
Tip tumora	benigni	n	67	2	6	3	1	79
		%	84.8%	2.5%	7.6%	3.8%	1.3%	100.0%
	maligni	n	35	6	12	27	42	122
		%	28.7%	4.9%	9.8%	22.1%	34.4%	100.0%



Grafikon 7 Poređenje ekspresije HBME-1 u benignim i malignim tumorima

Uočena razlika u ekspresiji HBME-1 između benignih i malignih lezija je visoko statistički značajna ($p=0.000$).

Samo jedan od trideset koloidnih adenoma (3,3%) je ispoljavao HBME-1 (Tabela 17). Svi hiperplastični adenomi su bili negativni. 14,8% folikularnih adenoma je imalo slabo do umerenu ekspresiju HBME-1. Čak 70% adenoma Hirtleovih ćelija je pokazivalo ekspresiju HBME-1, a od toga najveći broj je imao umerenu ekspresiju.

Folikularni karcinomi u ispitivanom uzorku u čak 73,3% slučajeva nisu ekspimirali HBME-1. S druge strane 85% karcinoma Hirtleovih ćelija i 76,9% papilarnih karcinoma su bili pozitivni na HBME-1. 54,5% papilarnih karcinoma je imalo izraženu ekspresiju HBME-1 (76-100% tumorskih ćelija) (Tabela 18, Slika 2).

Tabela 17 Ekspresija HBME-1 u odnosu na patohistološki nalaz

			HBME 1		Ukupno
			-	+	
PH nalaz	Adenoma colloidess	N	29	1	30
		%	96.7%	3.3%	100.0%
	Adenoma folliculare	N	23	4	27
		%	85.2%	14.8%	100.0%
	Adenoma Hurthle cell	N	3	7	10
		%	30.0%	70.0%	100.0%
	Adenoma hyperplasticum	N	12	0	12
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	Carcinoma folliculare	N	11	4	15
		%	73.3%	26.7%	100.0%
	Carcinoma Hurhle cell	N	3	17	20
		%	15.0%	85.0%	100.0%
	Carcinoma papillare	N	21	66	87
		%	24.1%	75.9%	100.0%
Ukupno		N	102	99	201
		%	50.7%	49.3%	100.0%

Tabela 18 Distribucija patohistoloških nalaza u odnosu na procenat tumorskih ćelija koje eksprimiraju HBME-1

		HBME 1					Total	
		0-10	11-25	26-50	51-75	76-100		
PH nalaz	Adenoma colloidesc	N	29	0	1	0	0	30
		%	96.7%	0.0%	3.3%	0.0%	0.0%	100.0%
	Adenoma folliculare	N	23	2	2	0	0	27
		%	85.2%	7.4%	7.4%	0.0%	0.0%	100.0%
	Adenoma Hurthle cell	N	3	0	3	3	1	10
		%	30.0%	0.0%	30.0%	30.0%	10.0%	100.0%
	Adenoma hyperplasticum	N	12	0	0	0	0	12
		%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
	Carcinoma folliculare	N	11	0	2	2	0	15
		%	73.3%	0.0%	13.3%	13.3%	0.0%	100.0%
	Carcinoma Hurthle cell	N	3	2	3	6	6	20
		%	15.0%	10.0%	15.0%	30.0%	30.0%	100.0%
	Carcinoma papillare	N	21	4	7	19	36	87
		%	24.1%	4.6%	8.0%	21.8%	41.4%	100.0%

U odnosu na ekspresiju HBME-1 uporedili smo međusobno tri različita tumora: papilarni karcinom, folikularni karcinom, i folikularni adenom.

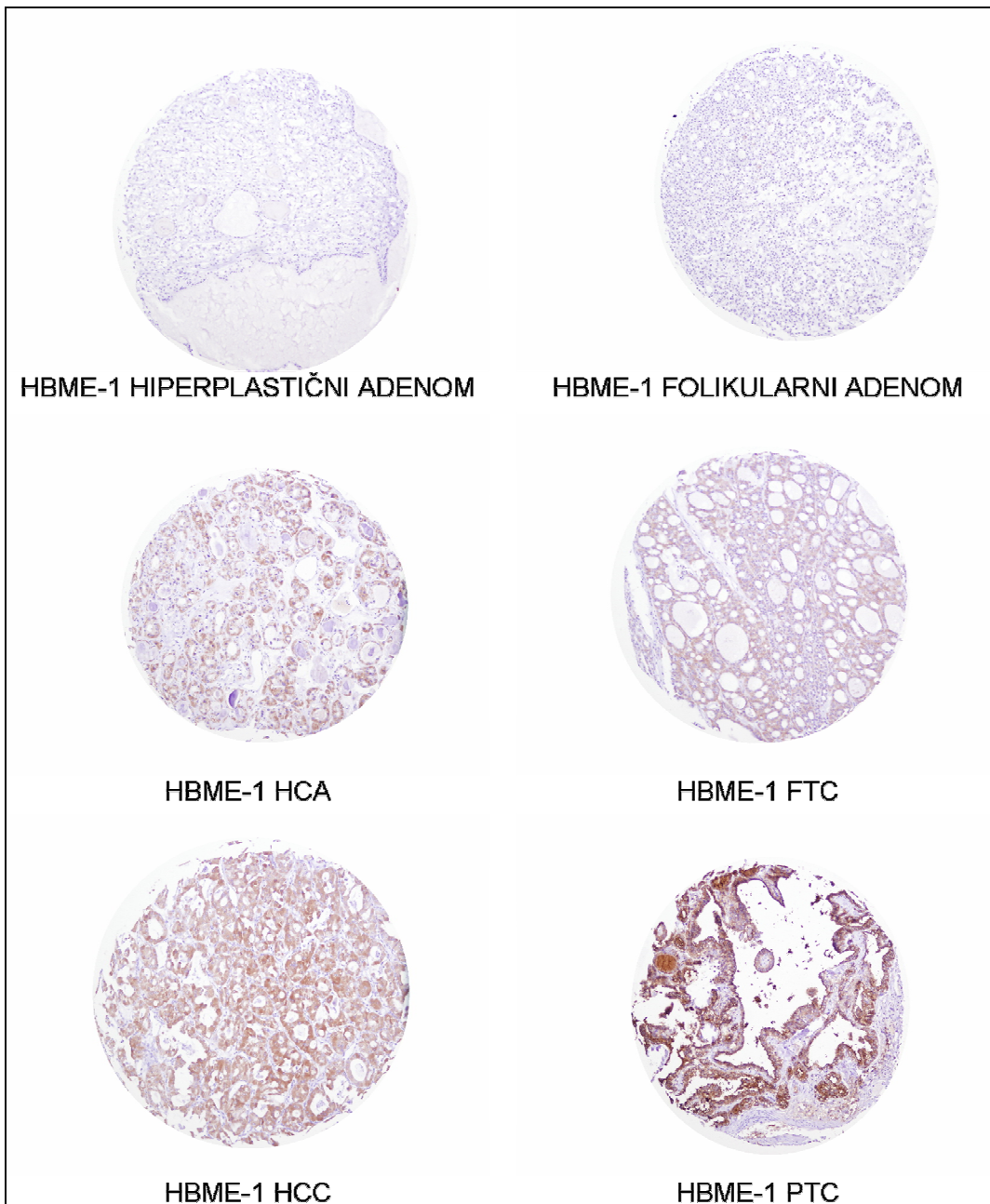
U odnosu na ekspresiju HBME-1 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji HBME-1 između papilarnog i folikularnog karcinoma ($p=.000$), kao i između papilarnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p=.000$).

U odnosu na ekspresiju HBME-1 nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji HBME-1 između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p=1.00$).

Takođe, u odnosu na ekspresiju HBME-1 uporedili smo folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularnim karcinomom, i folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularnim adenomom.

U odnosu na ekspresiju HBME-1 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji HBME-1 u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u usporedbi sa folikularnim karcinomom ($p=.009$), a takođe i između folikularne varijante papilarnog karcinoma u odnosu na folikularni adenom ($p=.000$).

Uporedili smo adenom Hirtleovih ćelija sa karcinomom Hirtleovih ćelija u odnosu na ekspresiju HBME-1 u ovim lezijama i nismo našli postojanje razlike ($p=.176$)

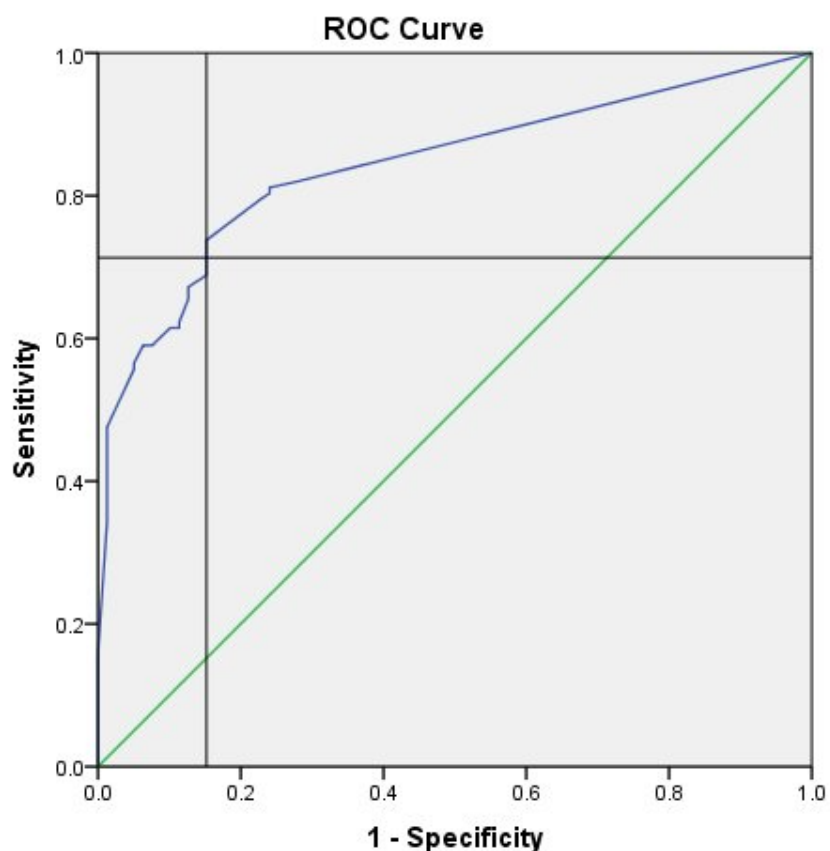


Slika 2 Ekspresija HBME-1 (HCA-adenom Hirtleovih ćelija, PTC- papilarni karcinom, FTC-folikularni karcinom, HCC-karcinom Hirtleovih ćelija), 100x

4.4.1. Dijagnostička upotrebljivost HBME-1 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne

Tabela 19 Karakteristike dijagnostičkog testa HBME-1 u klasifikaciji lezija na benigne i maligne

Senzitivnost	71.31%	62.42% to 79.13%
Specifičnost	84.81%	74.97% to 91.89%
<i>Positive Likelihood Ratio</i>	4.69	2.75 to 8.00
<i>Negative Likelihood Ratio</i>	0.34	0.25 to 0.45
Prevalenca oboljenja	60.70%	53.58% to 67.49%
Pozitivna prediktivna vrednost	87.88%	79.78% to 93.57%
Negativna prediktivna vrednost	65.69%	55.63% to 74.80%



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 8 ROC kriva – HBME-1 kao klasifikator lezija na benigne i maligne

Uvidom u kordinate krive (Grafikon 8), dobija se se granična vrednost od 7,5% pozitivnih tumorskih ćelija koje eksprimiraju HBME-1. Ukoliko je broj tumorskih ćelija sa ekspresijom HBME-1 jednak ili veći od ove vrednosti, možemo ustvrditi da se radi o malignoj leziji štitaste žlezde sa senzitivnošću od 71,31%, i specifičnošću od 84,81% (Tabela 19).

4.5. Ekspresija Galectin-3

Ekspresija Galectin-3 je prikazana tabelarno i grafički (Tabele 20; Grafikon 9). Uvidom u tabelu uočava se pozitivna ekspresija Galectin-3 u 88,5% malignih lezija i 35,4% benignih lezija.

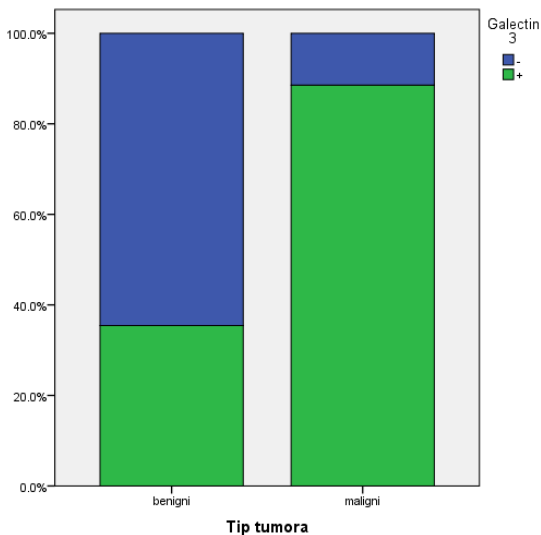
Tabela 20 Ekspresija Galectin 3 u benignim i malignim tumorima

			Galectin 3		Ukupno
			-	+	
Tip tumora	benigni	N	51	28	79
		%	64.6%	35.4%	100.0%
Tip tumora	maligni	N	14	108	122
		%	11.5%	88.5%	100.0%
Ukupno		N	65	136	201
		%	32.3%	67.7%	100.0%

Tabela 21 Distribucija malignih i benignih lezija u odnosu na procenat tumorskih ćelija koje ekspiriraju Galectin 3

			Galectin 3					Ukupno
			0-10%	11-25%	26-50%	51-75%	76-100%	
Tip tumora	benigni	N	51	9	8	5	6	79
		%	64.6%	11.4%	10.1%	6.3%	7.6%	100.0%
Tip tumora	maligni	N	14	8	22	24	54	122
		%	11.5%	6.6%	18.0%	19.7%	44.3%	100.0%

Benigne lezije u 60, 7% slučajeva su imale slabu do umerenu ekspresiju Galectina-3, a u čak 39,3% slučajeva su imale umerenu do izraženu ekspresiju Galectin-3 (Tabela 21).



Grafikon 9 Poređenje ekspresije Galectin 3 u benignim i malignim tumorima

Uočena razlika u ekspresiji Galectina-3 između benignih i malignih lezija je statistički značajna (p=.000)

U 13,3 % slučajeva sa koloidnim adenomom bila je prisutna slaba do umerena ekspresija Galectina 3 (Tabele 22, 23). Folikularni adenomi su u 40,7% imali ekspresiju Galectina 3, koja je varirala od slabe do izražene. Adenomi Hirtleovih ćelija u 50% ispitivanih slučajeva su pokazali varijabilnu pozitivnu ekspresiju Galectin-3. Interesantno, hiperplastični adenomi su imali varijabilnu pozitivnu (od slabe do izražene) ekspresiju u čak 66,7% slučajeva.

Što se tiče malignih lezija, sva tri tipa tumora u visokom procentu pokazuju ekspresiju Galectina 3: folikularni karcinom je pozitivan 73.3% slučajeva, karcinom hirtleovih ćelija je pozitivan u 85% slučajeva, papilarni karcinom je pozitivan u 92% slučajeva.

Ova pozitivnost je najvećim delom umerena do izražena (Slika 3).

Tabela 22 Ekspresija Galectin 3 u odnosu na patohistološki nalaz

		Galectin 3		Ukupno	
		-	+		
PH nalaz	Adenoma colloidis	N	26	4	30
		%	86.7%	13.3%	100.0%
	Adenoma folliculare	N	16	11	27
		%	59.3%	40.7%	100.0%
	Adenoma Hurthle cell	N	5	5	10
		%	50.0%	50.0%	100.0%
	Adenoma hyperplasticum	N	4	8	12
		%	33.3%	66.7%	100.0%
	Carcinoma folliculare	N	4	11	15
		%	26.7%	73.3%	100.0%
	Carcinoma Hurthle cell	N	3	17	20
		%	15.0%	85.0%	100.0%
	Carcinoma papillare	N	7	80	87
		%	8.0%	92.0%	100.0%

Tabela 23 Distribucija patohistoloških nalaza u odnosu na procenat tumorskih ćelija koje eksprimiraju Galectin 3

		Galectin 3					Ukupno	
		0-10%	11-25%	26-50%	51-75%	76-100%		
PH nalaz	Adenoma colloidess	N	26	1	3	0	0	30
		%	86.7%	3.3%	10.0%	0.0%	0.0%	100.0%
	Adenoma folliculare	N	16	3	2	3	3	27
		%	59.3%	11.1%	7.4%	11.1%	11.1%	100.0%
	Adenoma Hurthle cell	N	5	0	1	2	2	10
		%	50.0%	0.0%	10.0%	20.0%	20.0%	100.0%
	Adenoma hyperplasticum	N	4	5	2	0	1	12
		%	33.3%	41.7%	16.7%	0.0%	8.3%	100.0%
	Carcinoma folliculare	N	4	1	2	5	3	15
		%	26.7%	6.7%	13.3%	33.3%	20.0%	100.0%
	Carcinoma Hurthle cell	N	3	2	2	5	8	20
		%	15.0%	10.0%	10.0%	25.0%	40.0%	100.0%
	Carcinoma papillare	N	7	5	18	14	43	87
		%	8.0%	5.7%	20.7%	16.1%	49.4%	100.0%

U odnosu na ekspresiju Galectin-3 uporedili smo međusobno tri različita tumora: papilarni karcinom, folikularni karcinom, i folikularni adenom.

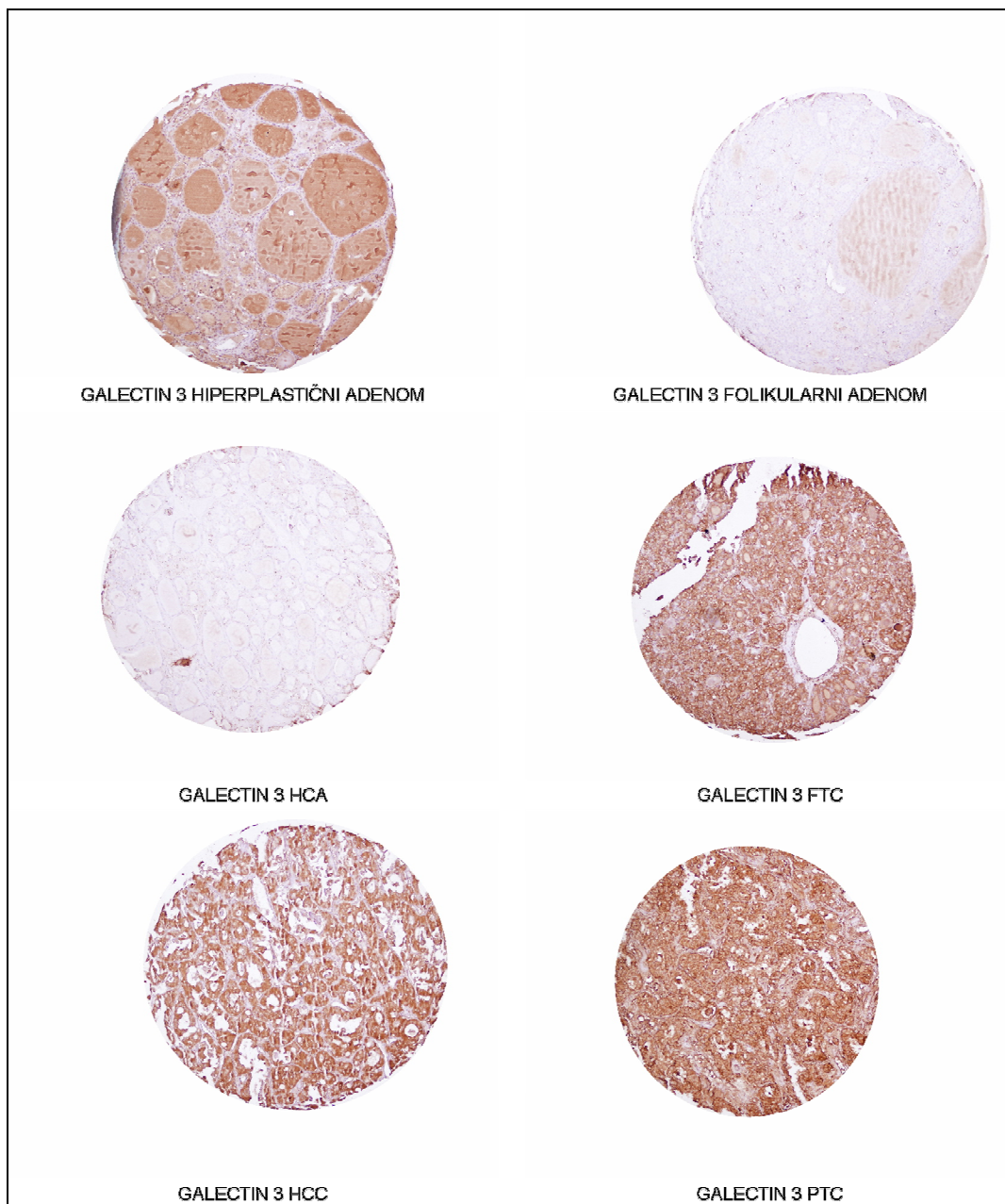
U odnosu na ekspresiju Galectin-3 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji Galectin-3 u papilarnom karcinomu i folikularnom adenomu ($p=0.000$).

U odnosu na ekspresiju Galectin-3 nađena je statistički značajna razlika u ekspresiji Galectin-3 između folikularnog adenoma i folikularnog karcinoma ($p=0.043$). Dalje, ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji Galectin-3 između papilarnog karcinoma i folikularnog karcinoma ($p=0.197$).

Takođe, u odnosu na ekspresiju Galectin 3 uporedili smo folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularnim karcinomom, i folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularnim adenomom.

U odnosu na ekspresiju Galectin 3 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji Galectin 3 u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u usporedbi sa folikularnim adenomom ($p=0.001$). Nije nađena razlika u ekspresiji Galectin 3 između folikularne varijante papilarnog karcinoma i folikularnim karcinoma ($p=1.000$).

Uporedili smo adenom Hirtleovih ćelija sa karcinomom Hirtleovih ćelija u odnosu na ekspresiju Galectin 3 u ovim lezijama i našli smo postojanje razlike ($p=0.041$; Asymp 2. sided Pearson Chi Square).

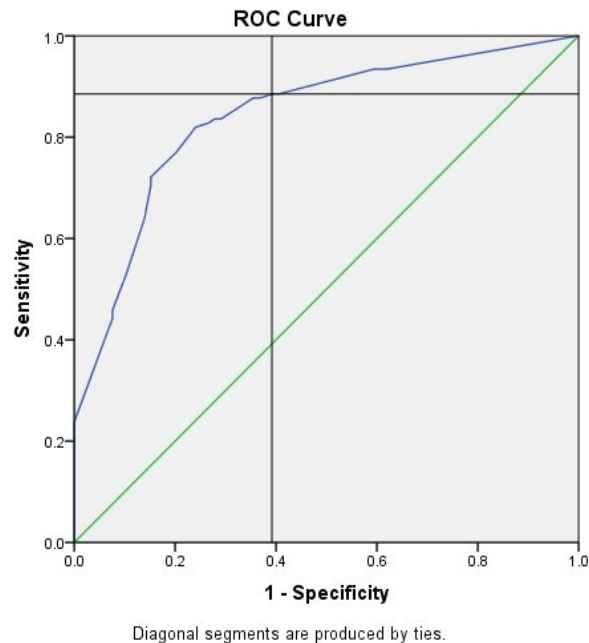


Slika 3 Ekspresija Galectin 3 (HCA-adenom Hirtleovih ćelija, PTC- papilarni karcinom, FTC-folikularni karcinom, HCC-karcinom Hirtleovih ćelija), 100x

4.5.1. Dijagnostička upotrebljivost Galectin-3 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne

Tabela 24 Karakteristike dijagnostičkog testa Galectin 3 u klasifikaciji lezija na benigne i maligne

Senzitivnost	88.52%	81.49% to 93.58%
Specifičnost	64.56%	52.99% to 75.00%
<i>Positive Likelihood Ratio</i>	2.50	1.84 to 3.39
<i>Negative Likelihood Ratio</i>	0.18	0.11 to 0.30
Prevalenca oboljenja	60.70%	53.58% to 67.49%
Pozitivna prediktivna vrednost	79.41%	71.64% to 85.86%
Negativna prediktivna vrednost	78.46%	66.51% to 87.69%



Grafikon 10 ROC kriva – Galectin 3 kao klasifikator lezija na benigne i maligne

Uvidom u kordinate krive (Grafikon 10), dobija se se granična vrednost od 7,5% pozitivnih tumorskih ćelija koje ekspimiraju Galectin 3. Ukoliko je broj tumorskih ćelija sa ekspresijom Galectin 3 jednak ili veći od ove vrednosti, možemo ustvrditi da se radi o malignoj leziji štitaste žlezde sa senzitivnošću od 88,52%%, i specifičnošću od 64,5% (Tabela 24).

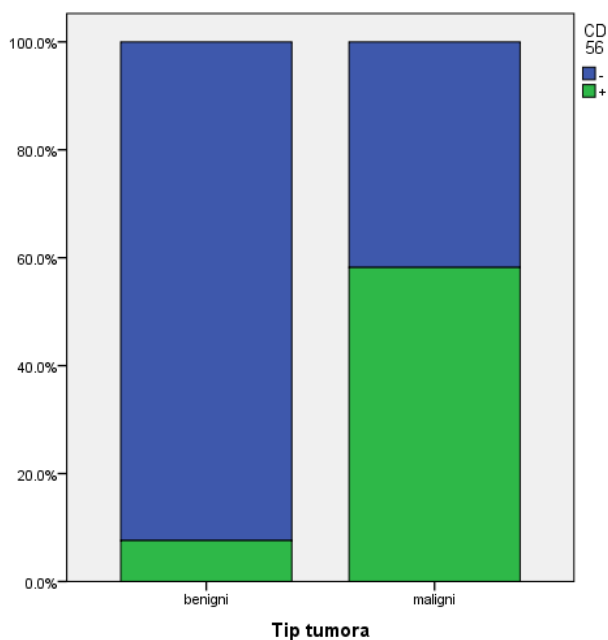
4.6. Ekspresija CD56

CD56 je marker čija je ekspresija redukovana ili odsutna u karcinomima štitaste žlezde, pozitivni rezultat (ili “maligni profil”) će biti smatran kada se 0-10% tumorskih ćelija boji pozitivno. Rezultati su prikazani tabelarno, grafički i mikrofotografijama (Tabele 25, Grafikon 11, Slika 4).

Uvidom u tabelu uočava se gubitak ekspresije CD56 (pozitivan rezultat) u 58,2 % malignih lezija i 7,6% benignih lezija. Razlika u ekspresiji CD56 između benignih i malignih lezija štitaste žlezde je statistički značajna ($p=0.000$).

Tabela 25 Ekspresija CD56 u benignim i malignim tumorima

		CD 56		Ukupno	
		-	+		
Tip tumora	benigni	N	73	6	79
		%	92.4%	7.6%	100.0%
Tip tumora	maligni	N	51	71	122
		%	41.8%	58.2%	100.0%
Ukupno		N	124	77	201
Ukupno		%	61.7%	38.3%	100.0%



Grafikon 11 Poređenje ekspresije CD56 u benignim i malignim tumorima

U Tabelama 26, i 27, je prikazano odsustvo (+) /prisustvo (-) ekspresije CD56 za različite nodularne lezije štitaste žlezde. U 86,7% koloidnih adenoma je prisutna varijabilna pozitivna ekspresija CD56. U 96,3% folikularnih adenoma, i 90% Hirtleovih adenoma je prisutna najvećim delom umerena do izražena ekspresija CD56.

Folikularni i Hirtleovih ćelija karcinomi ispoljavaju ekspresiju CD56 u 73,3%, i 90% slučajeva, respektivno. Papilarni karcinom ispoljava ekspresiju CD56 u 25,3% slučajeva, i gubitak iste u 74,7% slučajeva. U 72,7% slučajeva gde je prisutna ekspresija CD56 u papilarnom karcinomu, ona je slaba do umerena.

Tabela 26 Ekspresija CD56 u odnosu na patohistološki nalaz

PH nalaz			CD 56		Ukupno
			-	+	
Adenoma colloidis	N	26	4	30	
	%	86.7%	13.3%	100.0%	
Adenoma folliculare	N	26	1	27	
	%	96.3%	3.7%	100.0%	
Adenoma Hurthle cell	N	9	1	10	
	%	90.0%	10.0%	100.0%	
Adenoma hyperplastic.	N	12	0	12	
	%	100.0%	0.0%	100.0%	
Carcinoma folliculare	N	11	4	15	
	%	73.3%	26.7%	100.0%	
Carcinoma Hurthle cell	N	18	2	20	
	%	90.0%	10.0%	100.0%	
Carcinoma papillare	N	22	65	87	
	%	25.3%	74.7%	100.0%	

Tabela 27 Distribucija patohistoloških nalaza u odnosu na procenat tumorskih ćelija koje ekspimiraju CD56

PH nalaz			CD56					Ukupno
			0-10%	11-25%	26-50%	51-75%	76-100%	
Adenoma colloidis	N	4	15	2	2	7	30	
	%	13.3%	50.0%	6.7%	6.7%	23.3%	100.0%	
Adenoma folliculare	N	1	6	5	5	10	27	
	%	3.7%	22.2%	18.5%	18.5%	37.0%	100.0%	
Adenoma Hurthle cell	N	1	3	2	3	1	10	
	%	10.0%	30.0%	20.0%	30.0%	10.0%	100.0%	
Adenoma hyperplasticum	N	0	2	0	4	6	12	
	%	0.0%	16.7%	0.0%	33.3%	50.0%	100.0%	
Ca folliculare	N	4	7	3	1	0	15	
	%	26.7%	46.7%	20.0%	6.7%	0.0%	100.0%	
Ca Hurthle cell	N	2	2	5	9	2	20	
	%	10.0%	10.0%	25.0%	45.0%	10.0%	100.0%	
Ca papillare	N	65	11	5	4	2	87	
	%	74.7%	12.6%	5.7%	4.6%	2.3%	100.0%	

U odnosu na ekspresiju CD56 uporedili smo međusobno tri različita tumora: papilarni karcinom, folikularni karcinom, i folikularni adenom.

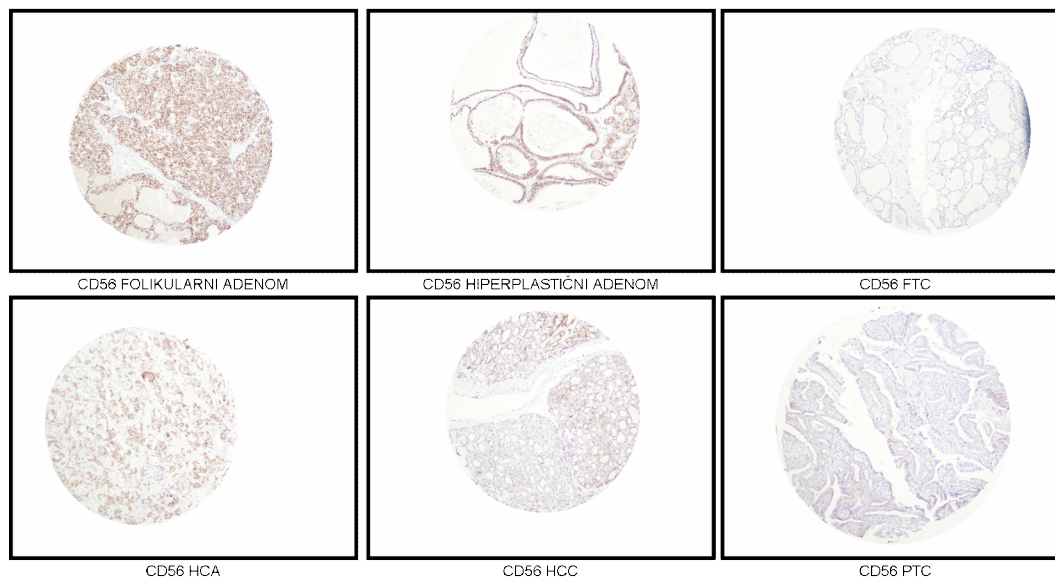
U odnosu na ekspresiju CD56 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji CD56 u papilarnom i folikularnom karcinomu ($p=.006$), kao i između papilarnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p=.000$).

U odnosu na ekspresiju CD56 nađena je statistički značajna razlika u ekspresiji CD56 između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p=0.028$), kao i između folikularnog karcinoma i benignih lezija (izuzimajući adenome Hirtleovih ćelija ; $p=0.006$).

Takođe, u odnosu na ekspresiju CD56 uporedili smo folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularnim karcinomom, i folikularnu varijantu papilarnog karcinoma sa folikularnim adenomom.

U odnosu na ekspresiju CD56 postoji statistički značajna razlika u ekspresiji CD56 u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u usporedbi sa folikularnim adenomom ($p=.000$). Nije nađeno postojanje razlike u ekspresiji CD56 između folikularne varijante papilarnog karcinoma i folikularnog karcinoma ($p=.282$).

Uporedili smo adenom Hirtleovih ćelija sa karcinomom Hirtleovih ćelija u odnosu na ekspresiju CD56 u ovim lezijama i nismo našli postojanje razlike ($p=.450$).

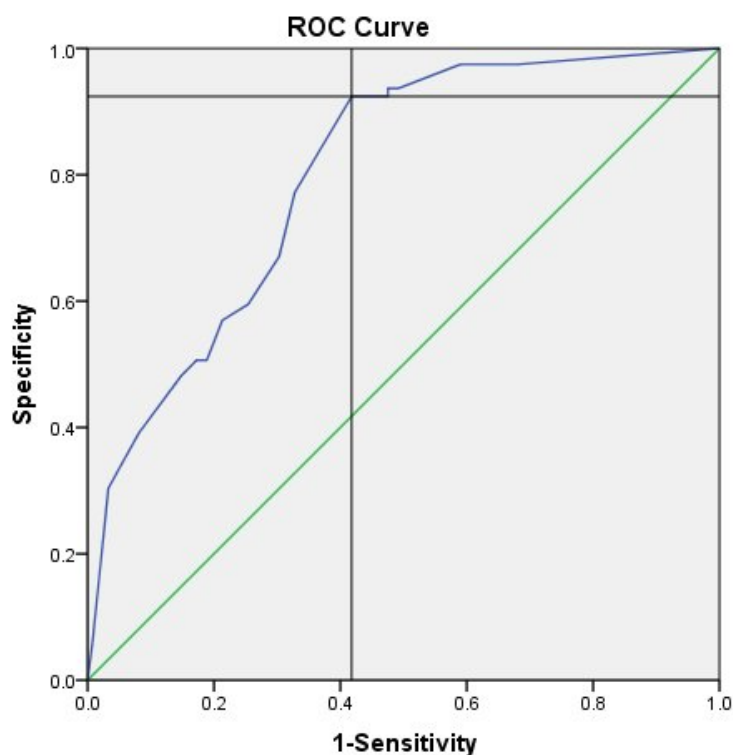


Slika 4 Ekspresija CD56 (HCA-adenom Hirtleovih ćelija, PTC- papilarni karcinom, FTC-folikularni karcinom, HCC-karcinom Hirtleovih ćelija), 100x

4.6.1. Dijagnostička upotrebljivost CD56 u stratifikaciji lezija na benigne i maligne

Tabela 28 Karakteristike dijagnostičkog testa CD56 u klasifikaciji lezija na benigne i maligne

Senzitivnost	58.20%	48.93% to 67.06%
Specifičnost	92.41%	84.19% to 97.14%
<i>Positive Likelihood Ratio</i>	7.66	3.50 to 16.78
<i>Negative Likelihood Ratio</i>	0.45	0.36 to 0.56
Prevalenca oboljenja	60.70%	53.58% to 67.49%
Pozitivna prediktivna vrednost	92.21%	83.80% to 97.07%
Negativna prediktivna vrednost	58.87%	49.68% to 67.63%



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 12 ROC kriva – CD56 kao klasifikator lezija na benigne i maligne

Uvidom u kordinate krive (Grafikon 12), dobija se se granična vrednost od 12,5% pozitivnih tumorskih ćelija koje eksprimiraju CD56. Ukoliko je broj tumorskih ćelija sa ekspresijom CD56 jednak ili manji od ove vrednosti, možemo ustvrditi da se radi o malignoj leziji štitaste žlezde sa senzitivnošću od 58,20%, i specifičnošću od 92,4% (Tabela 28).

4.7. Dijagnostička valjanost kombinacija različitih markera

Tabela 29 Distribucija lezija u odnosu na kombinovanu pozitivnost CK19, CD56, HBME-1, Galectin3

		f	%
Pozitivan broj markera	0	35	17.4
	1	47	23.4
	2	27	13.4
	3	42	20.9
	4	50	24.9
	Ukupno	201	100.0

Najveći broj slučajeva u ispitivanom uzorku je bio pozitivan na sva četiri markera (Tabela 29).

Tabela 30 Ekspresija CK19, CD56, HBME-1, Galectin3 u benignim i malignim tumorima (zbirna tabela)

Markeri	Ekspresija	Tumor			
		Benigni		Maligni	
		N	%	N	%
CK 19	+	23	29.1%	92	75.4%
	-	56	70.9%	30	24.6%
HBME 1	+	12	15.2%	87	71.3%
	-	67	84.8%	35	28.7%
Galectin 3	+	28	35.4%	108	88.5%
	-	51	64.6%	14	11.5%
CD 56	+	6	7.6%	71	58.2%
	-	73	92.4%	51	41.8%

U obe grupe lezija (benigne i maligne) galectin 3 je bio najčešće eksprimiran marker (Tabela 30, Tabela 31).

Tabela 31 Ekspresija CK19, CD56, HBME-1, Galectin3 u benignim i malignim tumorima (zbirna tabela)

		PH nalaz													
		Adenoma colloidis		Adenoma folliculare		Adenoma Hurthle cell		Adenoma hyperplasticum		Carcinoma folliculare		Carcinoma Hurhle cell		Carcinoma papillare	
		N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %
CK 19	-	19	63.3%	21	77.8%	4	40.0%	12	100.0%	10	66.7%	8	40.0%	12	13.8%
	+	11	36.7%	6	22.2%	6	60.0%	0	0.0%	5	33.3%	12	60.0%	75	86.2%
HBME-1	-	29	96.7%	23	85.2%	3	30.0%	12	100.0%	11	73.3%	3	15.0%	21	24.1%
	+	1	3.3%	4	14.8%	7	70.0%	0	0.0%	4	26.7%	17	85.0%	66	75.9%
GAL- 3	-	26	86.7%	16	59.3%	5	50.0%	4	33.3%	4	26.7%	3	15.0%	7	8.0%
	+	4	13.3%	11	40.7%	5	50.0%	8	66.7%	11	73.3%	17	85.0%	80	92.0%
CD 56	-	26	86.7%	26	96.3%	9	90.0%	12	100.0%	11	73.3%	18	90.0%	22	25.3%
	+	4	13.3%	1	3.7%	1	10.0%	0	0.0%	4	26.7%	2	10.0%	65	74.7%

Tabela 32 Svi markeri u kombinaciji pozitivni

			Pozitivna 4 markera		Ukupno
			ne	da	
PH nalaz	Adenoma colloidess	N	30	0	30
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	Adenoma folliculare	N	27	0	27
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	Adenoma Hurthle cell	N	9	1	10
		%	90.0%	10.0%	100.0%
	Adenoma hyperplasticum	N	12	0	12
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	Ca folliculare	N	13	2	15
		%	86.7%	13.3%	100.0%
	Ca Hurhle cell	N	19	1	20
		%	95.0%	5.0%	100.0%
	Ca papillare	N	41	46	87
		%	47.1%	52.9%	100.0%
Ukupno		N	151	50	201
		%	75.1%	24.9%	100.0%

Uvidom u Tabelu 32 uočava se da postoji jedan slučaj adenoma Hirtleovih ćelija, kao i 52.9% slučajeva papilarnog karcinoma koji pokazuju pozitivnost na sva četiri markera.

Tabela 33 Poređenje kombinovane ekspresije markera u benignim i malignim tumorima

Za malignitet	cd56 ck19	cd56 hbme1	cd56 gal3	ck19 hbme1	ck19 gal 3	hbme1 gal 3	cd56 gal 3 ck19	hbme1 gal 3 ck19	cd56 gal 3 hbme1	cd56 ck19 hbme1	cd56 ck19 hbme1 gal 3
Senzitivnost	50.82 %	50.00 %	52.46 %	60.66 %	68.03 %	64.75 %	45.90 %	54.92 %	45.08 %	45.08 %	40.16 %
Specifičnost	94.94 %	98.73 %	97.47 %	89.87 %	88.61 %	92.41 %	97.47 %	93.67 %	98.73 %	98.73 %	98.73 %
<i>Positive Likelihood Ratio</i>	10.04	39.5	20.72	5.99	5.97	8.53	18.13	8.68	35.61	35.61	31.73
<i>Negative Likelihood Ratio</i>	0.52	0.51	0.49	0.44	0.36	0.38	0.56	0.48	0.56	0.56	0.61
Prevalenca oboljenja	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %	60.70 %
Pozitivna prediktivna vrednost	93.94 %	98.39 %	96.97 %	90.24 %	90.22 %	92.94 %	96.55 %	93.06 %	98.21 %	98.21 %	98.00 %
Negativna prediktivna vrednost	55.56 %	56.12 %	57.04 %	59.66 %	64.22 %	62.93 %	53.85 %	57.36 %	53.79 %	53.79 %	51.66 %

Najveću vrednost senzitivnosti za malignitet ima kombinacija markera CK19/Galectin-3 (68.3%) (Tabela 33). S druge strane najviše vrednosti specifičnosti za malignitet ima kombinacija CD56/HBME-1 (98.7%). Interesantno je zapažanje da

vrednost specifičnosti nije porasla uvođenjem dodatnih markera u kombinaciju . U Tabeli 34 prikazana je kombinovana ekspresija markera u odnosu na različite patohistološke nalaze.

Tabela 34 Poređenje kombinovane ekspresije markera u odnosu na patohistološki nalaz

Kombinacije markera (svi markeri u kombinaciji su pozitivni)		PH nalaz													
		Adenoma colloidus		Adenoma folliculare		Adenoma Hurthle		Adenoma hyperplasticum		Carcinoma folliculare		Carcinoma Hurhle		Carcinoma papillare	
		N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	Column N %
cd56_ck19	-	27	90.0%	27	100.0%	9	90.0%	12	100.0%	12	80.0%	18	90.0%	30	34.5%
	+	3	10.0%	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%	3	20.0%	2	10.0%	57	65.5%
cd56_gal3	-	29	96.7%	27	100.0%	9	90.0%	12	100.0%	12	80.0%	19	95.0%	27	31.0%
	+	1	3.3%	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%	3	20.0%	1	5.0%	60	69.0%
cd56_hbme1	-	30	100.0%	27	100.0%	9	90.0%	12	100.0%	13	86.7%	18	90.0%	30	34.5%
	+	0	0.0%	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%	2	13.3%	2	10.0%	57	65.5%
ck19_gal3	-	27	90.0%	24	88.9%	7	70.0%	12	100.0%	10	66.7%	10	50.0%	19	21.8%
	+	3	10.0%	3	11.1%	3	30.0%	0	0.0%	5	33.3%	10	50.0%	68	78.2%
hbme1_ck19	-	29	96.7%	25	92.6%	5	50.0%	12	100.0%	12	80.0%	8	40.0%	28	32.2%
	+	1	3.3%	2	7.4%	5	50.0%	0	0.0%	3	20.0%	12	60.0%	59	67.8%
gal3_hbme1	-	29	96.7%	26	96.3%	6	60.0%	12	100.0%	12	80.0%	5	25.0%	26	29.9%
	+	1	3.3%	1	3.7%	4	40.0%	0	0.0%	3	20.0%	15	75.0%	61	70.1%
cd56_gal3_ck19	-	29	96.7%	27	100.0%	9	90.0%	12	100.0%	12	80.0%	19	95.0%	35	40.2%
	+	1	3.3%	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%	3	20.0%	1	5.0%	52	59.8%
hbm3_gal3_ck19	-	29	96.7%	26	96.3%	7	70.0%	12	100.0%	12	80.0%	10	50.0%	33	37.9%
	+	1	3.3%	1	3.7%	3	30.0%	0	0.0%	3	20.0%	10	50.0%	54	62.1%
cd56_gal3_hbme1	-	30	100.0%	27	100.0%	9	90.0%	12	100.0%	13	86.7%	19	95.0%	35	40.2%
	+	0	0.0%	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%	2	13.3%	1	5.0%	52	59.8%
cd56_ck19_hbme1	-	30	100.0%	27	100.0%	9	90.0%	12	100.0%	13	86.7%	18	90.0%	36	41.4%
	+	0	0.0%	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%	2	13.3%	2	10.0%	51	58.6%
cd56_hbme1_gal3_ck19	-	30	100.0%	27	100.0%	9	90.0%	12	100.0%	13	86.7%	19	95.0%	41	47.1%
	+	0	0.0%	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%	2	13.3%	1	5.0%	46	52.9%

Tabela 35 Senzitivnost i specifičnost različitih međusobnih kombinacija CK 19, HBME 1, CD56, Galectin-3 u diskriminaciji između različitih patohistoloških entiteta

Svi marker u kombinaciji su pozitivni Senzitivnost & Specifičnost za prvog u usporedbi		Maligno Benigno	PTC vs FA	FVPTC vs FA	FVPTC vs FTC	FTC vs FA	PTC vs non- tumor	HCC vs HCA
CD56_CK19	Senzitivnost	50.8%	65.5%	50.0%	50.0%	20.0%	65.5%	10.0%
	Specifičnost	94.9%	100%	100.0%	85.7%	100.0%	92.9%	90.0%
CD56_HBME1	Senzitivnost	50.0%	65.5%	55.0%	55.0%	13.3%	65.5%	10.0%
	Specifičnost	98.7%	100%	100.0%	92.9%	100.0%	100.0%	90.0%
CD56_GAL3	Senzitivnost	52.5%	69%	57.5%	57.5%	20.0%	69.0%	5.0%
	Specifičnost	97.5%	100%	100.0%	85.7%	100.0%	97.6%	90.0%
HBME1_CK19	Senzitivnost	60.7%	67.8%	52.5%	52.5%	20.0%	67.8%	60.0%
	Specifičnost	89.9%	92.6%	92.6%	85.7%	92.6%	97.6%	50.0%
GAL3_HBME1	Senzitivnost	64.8%	70.1%	60.0%	60.0%	20.0%	70.1%	75.0%
	Specifičnost	92.4%	96.3%	96.3%	85.7%	96.3%	97.6%	60.0%
CK19_GAL3	Senzitivnost	68.0%	78.2%	70.0%	70.0%	33.3%	78.2%	50.0%
	Specifičnost	88.6%	88.9%	88.9%	71.4%	88.9%	92.9%	70.0%
CD56_CK19_HBME1	Senzitivnost	45.1%	58.6%	45.0%	45.0%	13.3%	58.6%	10.0%
	Specifičnost	98.7%	100%	100.0%	92.9%	100.0%	100.0%	90.0%
CD56_GAL3_HBME1	Senzitivnost	45.1%	59.8%	50.0%	50.0%	13.3%	59.8%	5.0%
	Specifičnost	98.7%	100%	100.0%	92.9%	100.0%	100.0%	90.0%
CD56_GAL3_CK19	Senzitivnost	45.9%	59.8%	45.0%	45.0%	20.0%	59.8%	5.0%
	Specifičnost	97.5%	100%	100.0%	85.7%	100.0%	97.6%	90.0%
HBME1_GAL3_CK19	Senzitivnost	54.9%	62.1%	47.5%	47.5%	20.0%	62.1%	50.0%
	Specifičnost	93.7%	96.3%	96.3%	85.7%	96.3%	97.6%	70.0%
CD56_HBME1_GAL3_CK 19	Senzitivnost	40.2%	52.9%	40.0%	40.0%	13.3%	52.9%	5.0%
	Specifičnost	98.7%	100%	100.0%	92.9%	100.0%	100.0%	90.0%

(PTC- papilarni karcinom, FVPTC-folikularna varijanta papilarnog karcinoma; FA- folikularni adenoma; FTC- folikularni karcinom; HCC-karcinom Hirtleovih ćelija; HCA – adenom Hirtleovih ćelija)

Uvidom u Tabelu 35 , najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti za maligne lezije pokazuje kombinacija GAL-3/HBME-1. Za diferencijalnu dijagnozu papilarnog karcinoma, kao i njegove folikularne varijante, u odnosu na folikularni adenom, CK19/GAL3 je kombinacija sa najpovoljnijim odnosom senzitivnosti i specifičnosti za papilarni karcinom. Kombinacije markera u kojima je prisutan gubitak ekspresije CD56 pokazuju specifičnost od 100% za folikularni karcinom u usporedbi sa folikularnim adenomom. Problem u vezi sa gore iznesenim je ekstremno niska senzitivnost .

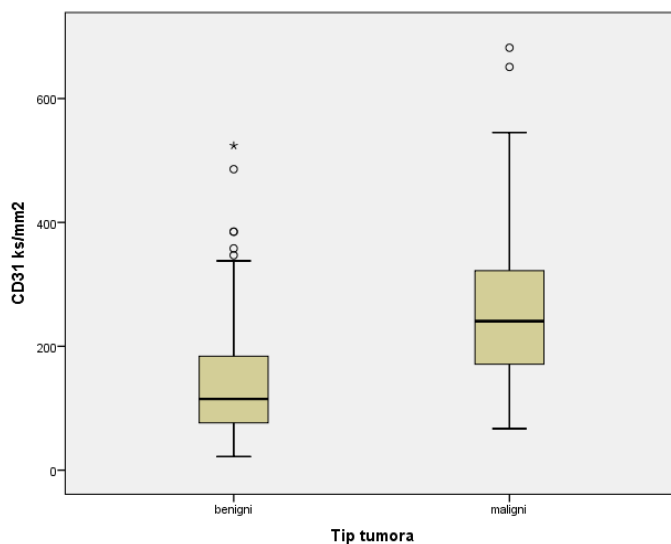
4.8. Opšta mikrovaskularna gustina (CD31)

Mikrovaskularna gustina (MVD) je izražena brojem krvnih sudova po milimetru kvadratnom (Tabela 36, Slika 5). Prosečna vrednost broja krvnih sudova po milimetru kvadratnom u benignim lezijama je 145 ± 104 . Broj krvnih sudova se kretao u rasponu od 22 do 542 izbrojana krvna suda po slučaju. Prosečna vrednost broja krvnih sudova po milimetru kvadratnom u malignim lezijama je 255 ± 114 . Broj krvnih sudova se kretao u rasponu od 67 do 682 izbrojana krvna suda po slučaju.

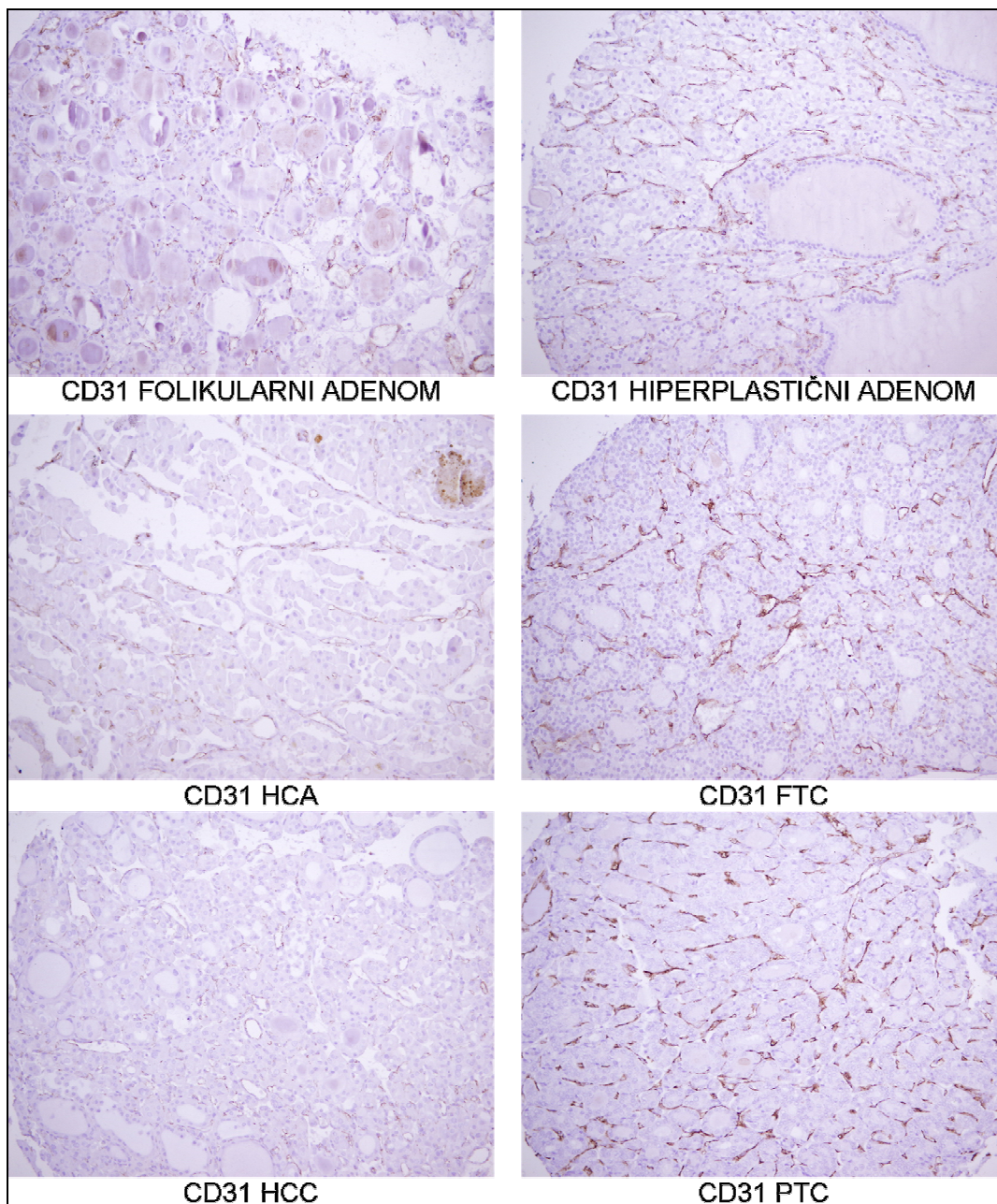
Opažene razlike u srednjim vrednostima su statistički evaluirane, i došlo se do zaključka da postoji statistički visoko značajna razlika između malignih i benignih lezija u odnosu na mikrovaskularnu gustinu ($p=.000$) (Grafikon 13).

Tabela 36 Broj krvnih sudova po milimetru kvadratnom u benignim i malignim tumorima

		CD31 broj ks/mm ²						
		N	Prosečna vrednost (ks/mm ²)	SD	Medijana	Min	Max	Raspon
Tip tumora	benigni	79	145	104	115	22	524	502
	maligni	122	255	114	241	67	682	615



Grafikon 13 Poređenje benignih i malignih tumora u odnosu na mikrovaskularnu gustinu (ks/mm²)



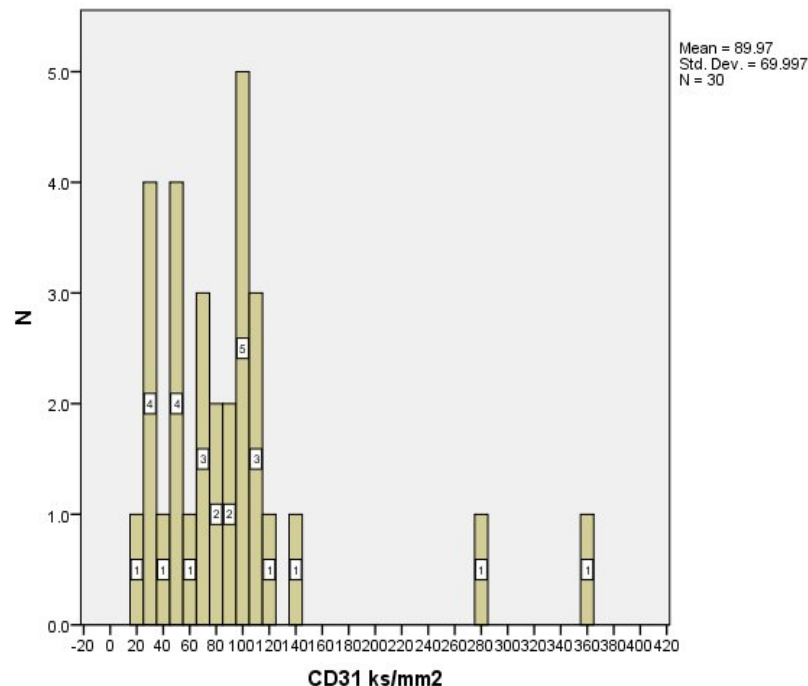
Slika 5 Mikrovaskularna gustina predstavljena ekspresijom CD31 (HCA-adenom Hirtleovih ćelija, PTC-papilarni karcinom, FTC-folikularni karcinom, HCC-karcinom Hirtleovih ćelija), 200x

Najveću mikrovaskularnu gustinu od benignih lezija ima folikularni adenom (204 ± 70) a najmanju mikrovaskularnu gustinu ima koloidni adenom (90 ± 70). Vrednosti mikrovaskularne gustine za hiperplastični adenom (148 ± 46) i adenom Hirtleovih ćelija (151 ± 97) se nalaze između gore spomenutih vrednosti za koloidni i folikularni adenom. Najviše vrednosti mikrovaskularne gustine od malignih lezija ima papilarni karcinoma (264 ± 125), a najniže vrednosti ima karcinom Hirtleovih ćelija (222 ± 63) (Tabela 37).

Tabela 37 Mikrovaskularna gustina u različitim patohistološkim entitetima

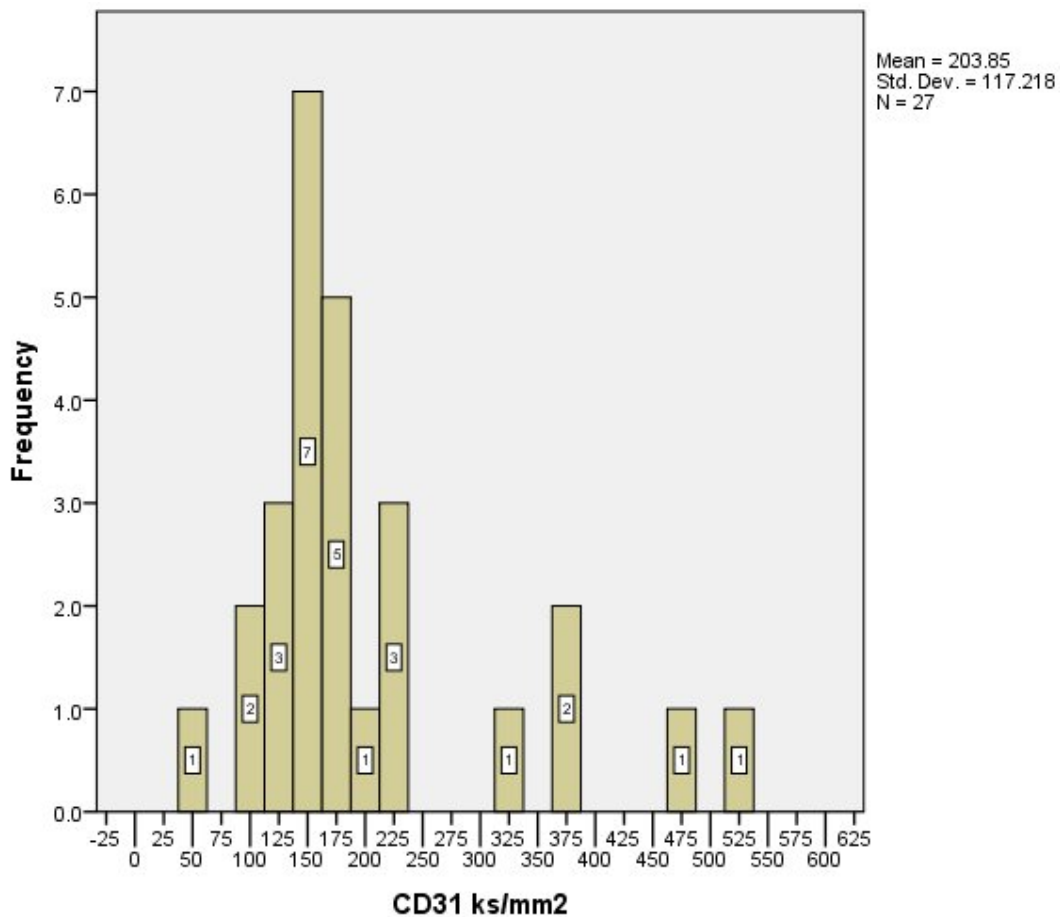
		CD31 ks/mm ²						
		N	Prosečna	SD	Mediana	Min	Max	Raspon
PH nalaz	Adenoma colloidnes	30	90	70	79	22	358	336
	Adenoma folliculare	27	204	117	164	53	524	471
	Adenoma Hurthle cell	10	151	97	136	31	338	307
	Adenoma hyperplasticum	12	148	86	138	45	347	302
	Carcinoma folliculare	15	244	94	215	95	375	280
	Carcinoma Hurthle cell	20	222	63	216	115	322	207
	Carcinoma papillare	87	264	125	247	67	682	615

Na histogramu (Grafikon 14) koji reprezentuje distribuciju mikrovaskularnih gustina unutar grupe koloidnih adenoma, uočava se da je 76,7% slučajeva sa gustinom manjom od 100 ks/mm^2



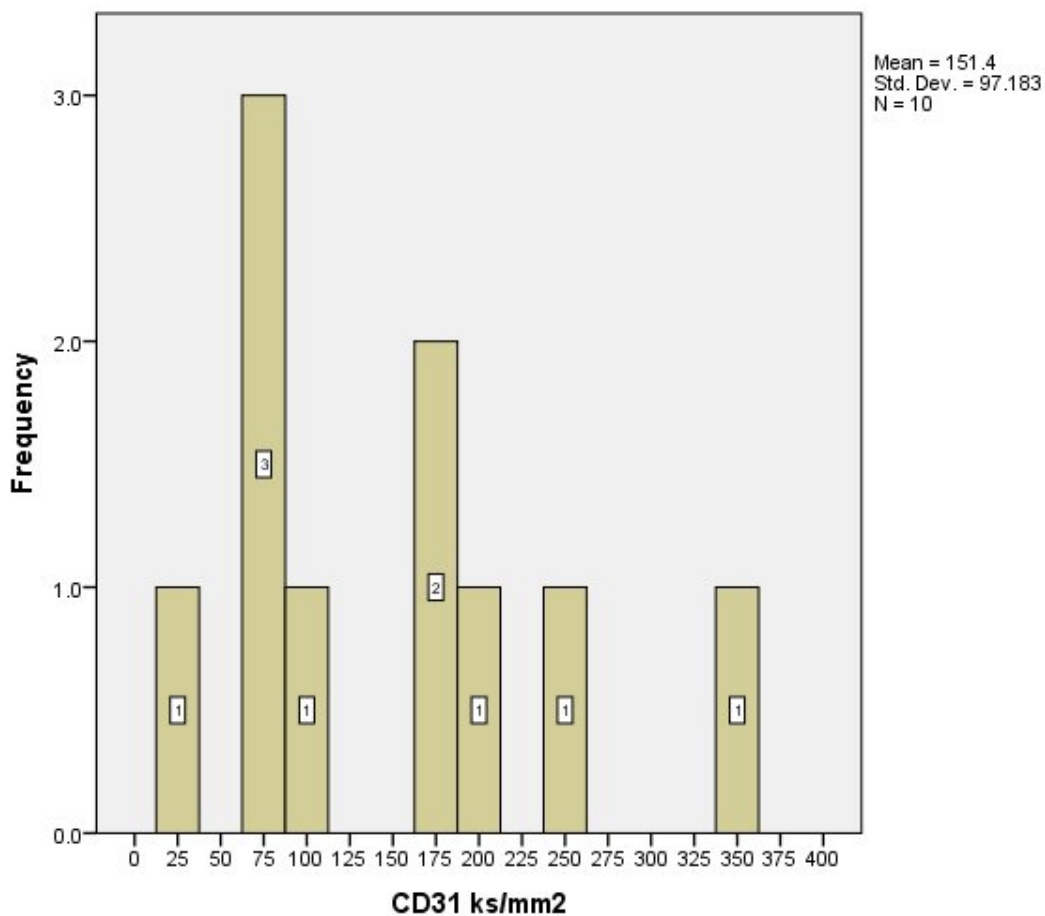
Grafikon 14 Mikrovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom koloidnog adenoma

Na histogramu koji reprezentuje distribuciju mikrovaskularnih gustina unutar grupe folikularnih adenoma, uočava se da 66,7% slučajeva sa mikrovaskularnom gustinom koja varira u rasponu od 100- 200 ks/1mm² (Grafikon 15).



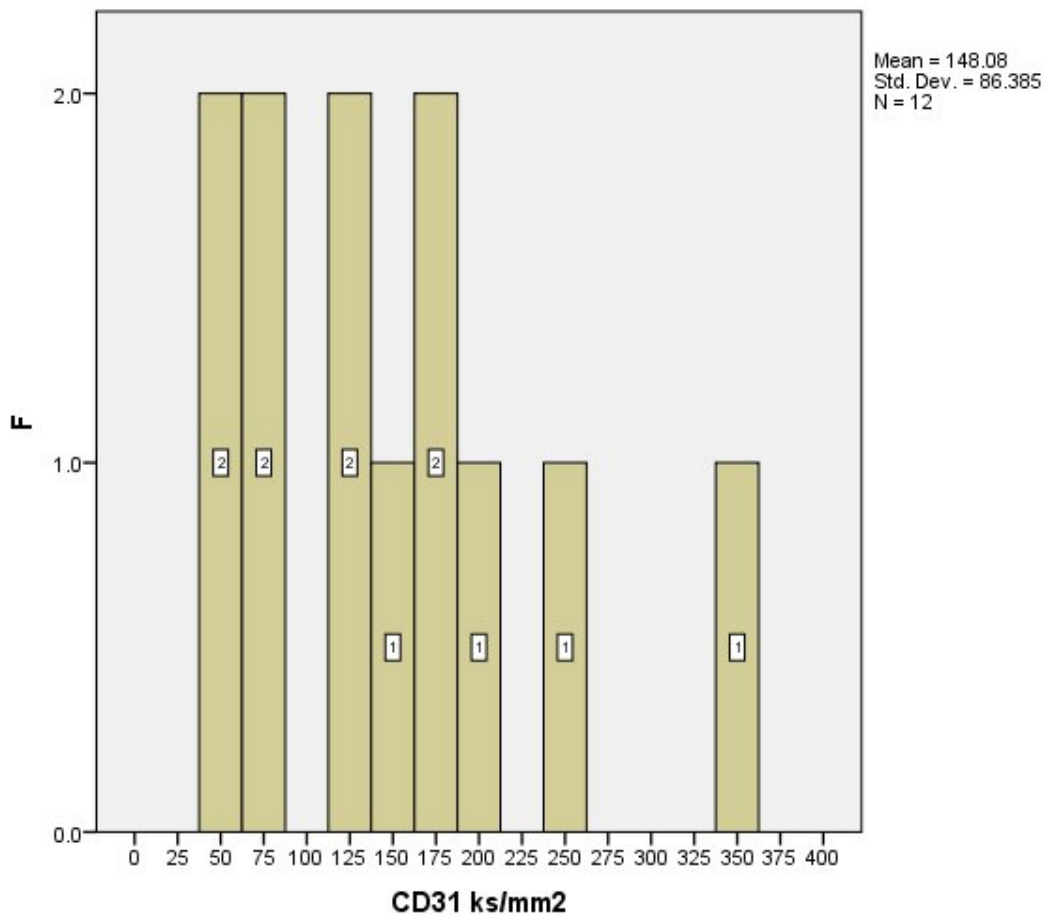
Grafikon 15 Mikrovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom folikularnog adenoma

Na histogramu koji reprezentuje distribuciju mikrovaskularnih gustina unutar grupe adenoma Hirtleovih ćelija, uočava se da 50% slučajeva ima mikrovaskularnu gustinu koja varira u rasponu od 31-100 ks/1mm², a drugi segment sa udelom od 50% ima mikrovaskularnu gustinu koja je jednaka ili veća od 184 ks/1mm² (Grafikon 16).



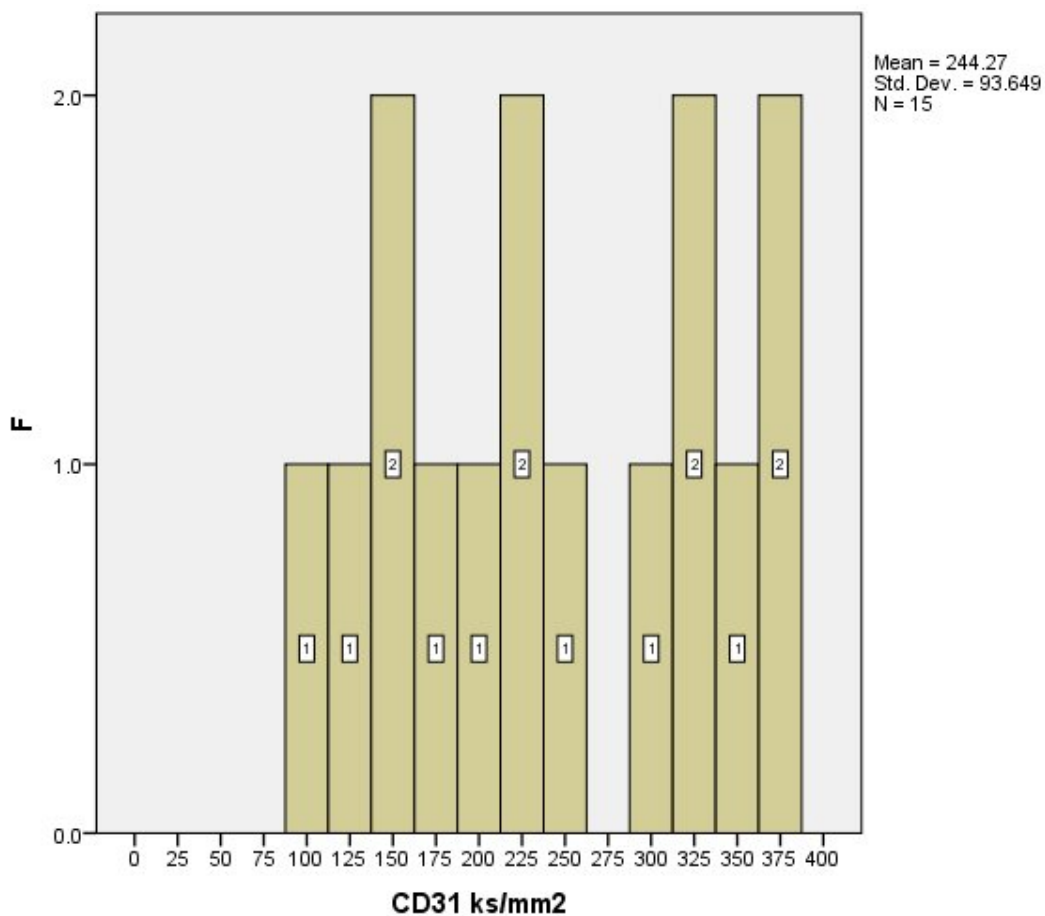
Grafikon 16 Mikrovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom adenoma Hirtleovih ćelija

Na histogramu koji reprezentuje distribuciju mikrovaskularnih gustina unutar grupe hiperplastičnih adenoma, uočava se da 58,3% slučajeva ima mikrovaskularnu gustinu koja varira u rasponu od 45-142 ks/1mm². Ostatak slučajeva (31,7%) ima mikrovaskularnu gustinu koja varira od 171-347 ks/1mm² (Grafikon 17).



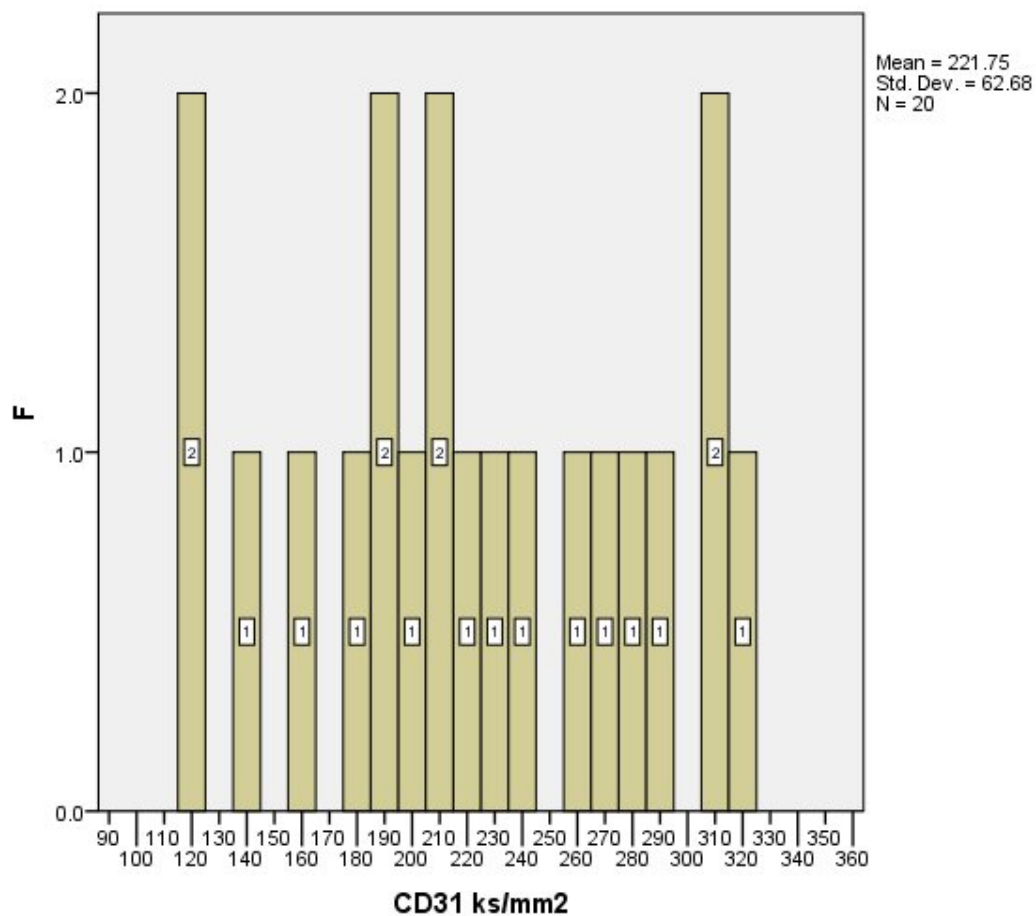
Grafikon 17 Mikrovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom hiperplastičnog adenoma

Na histogramu koji reprezentuje distribuciju mikrovaskularnih gustina unutar grupe folikularnih karcinoma, uočava se da 73,3% slučajeva ima mikrovaskularnu gustinu koja je jednaka ili veća od 185 ks/1mm² (18).



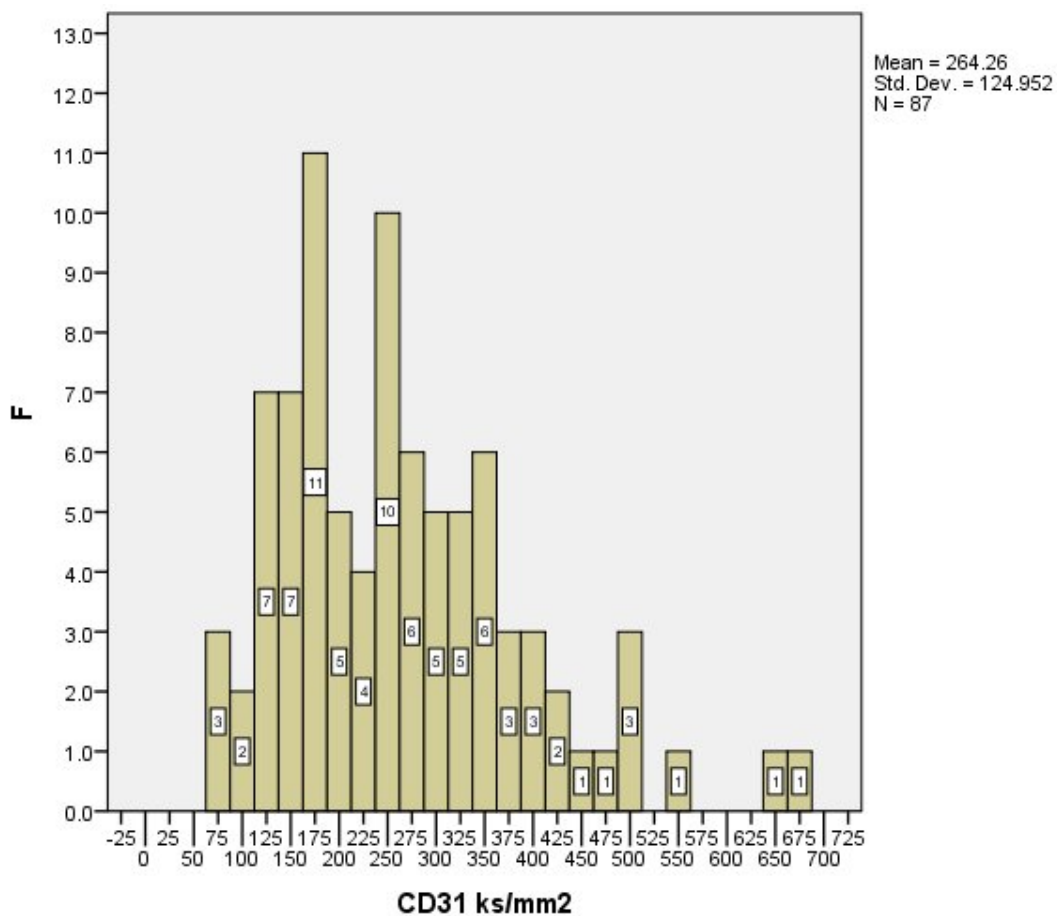
Grafikon 18 Mikrovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom folikularnog karcinoma

Na histogramu koji reprezentuje distribuciju mikrovaskularnih gustina unutar grupe karcinoma Hirtleovih ćelija, uočava se da 80 % slučajeva ima mikrovaskularnu gustinu koja je veća od 188 ks/1mm² (Grafikon 19)



Grafikon 19 Mikrovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom karcinoma Hirtleovih ćelija

Na histogramu koji reprezentuje distribuciju mikrovaskularnih gustina unutar grupe papilarnih karcinoma, uočava se da 70,1% slučajeva ima mikrovaskularnu gustinu koja je veća od 174 ks/1mm² (Grafikon 20)

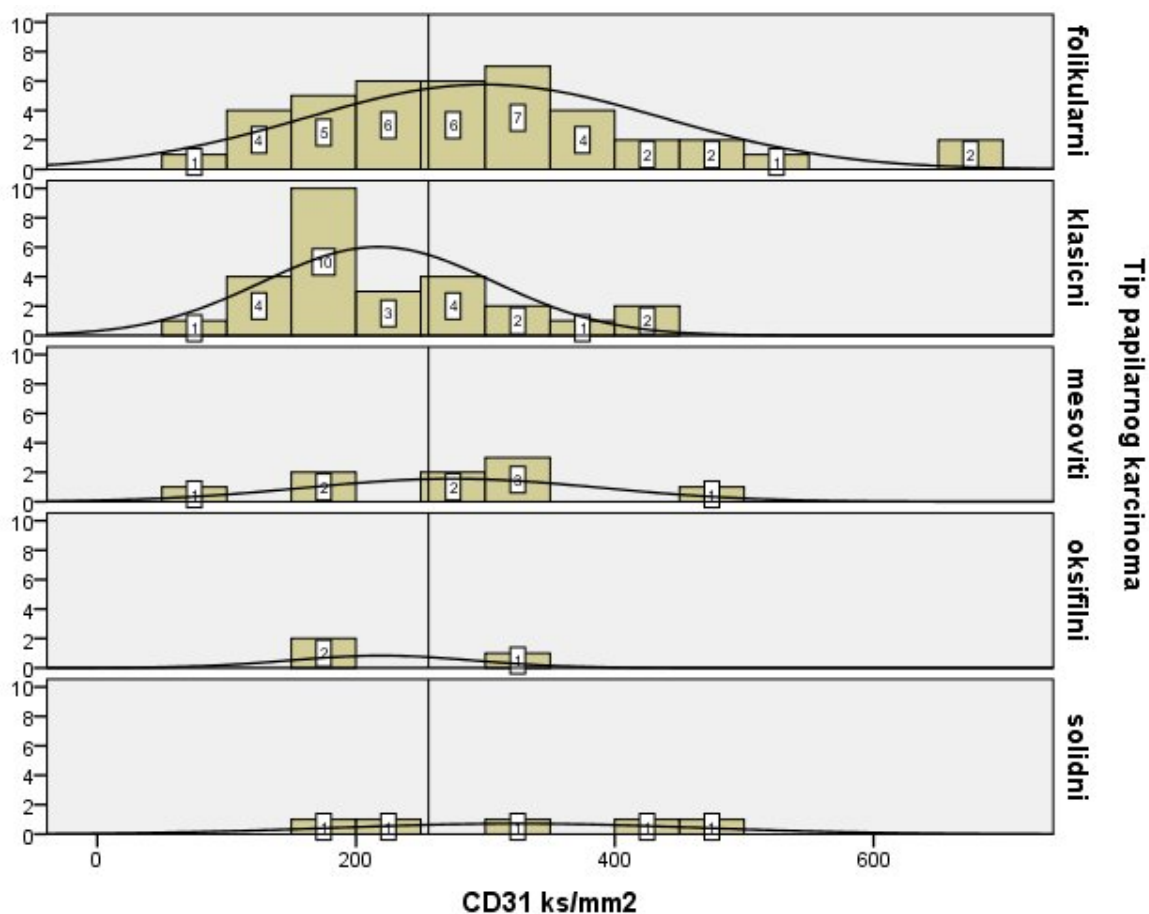


Grafikon 20 Mikrovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom papilarnog karcinoma

Uvidom u Tabelu 38 i Grafikon 21 (referentna linija u odnosu na x osu postavljena na vrednost 256 ks/mm²) vidimo da najveće mikrovaskularne gustine imaju solidna varijanta (325 ±140) i folikularna varijanta papilarnog karcinoma (299 ±138). Najniže vrednosti pokazuje klasična varijanta papilarnog karcinoma (217±89).

Tabela 38 Mikrovaskularna gustina u različitim podtipovima papilarnog karcinoma

		CD31 ks/mm ²						
		N	Srednja	SD	Median	Min	Max	Raspon
Varijante papilarnog karcinoma	folikularni	40	299	138	277	80	682	602
	klasični	27	217	89	185	95	422	327
	mesoviti	9	274	115	296	87	489	402
	oksilfilni	3	219	72	185	171	302	131
	solidni	5	325	140	325	158	496	338



Grafikon 21 Mikrovaskularna gustina unutar varijanti papilarnog karcinoma

Tabela 39 Mikrovaskularna gustine u folikularnoj varijanti PTC, folikularnom karcinomu, i folikularnom adenomu

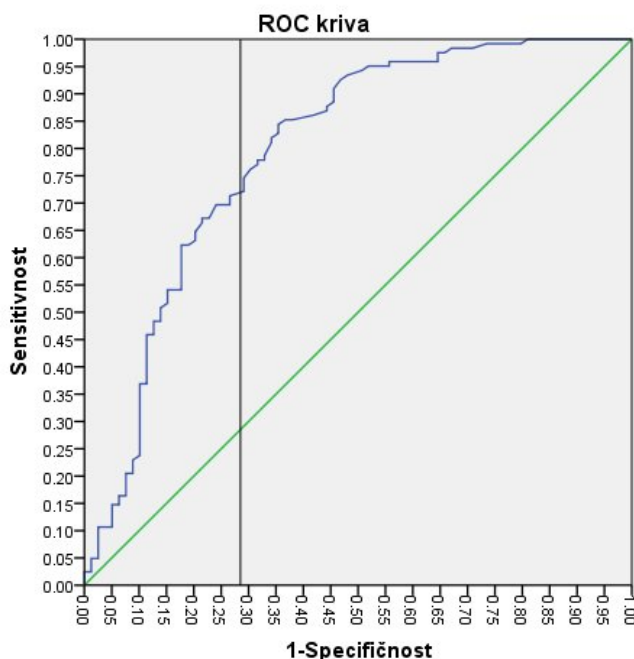
	CD31 ks/mm ²						
	N	Prosečno	SD	Median	Min	Max	Raspon
Folikularna varijanta PTC	40	299	138	277	80	682	602
Folikularni karcinom	15	244	94	215	95	375	280
Folikularni adenoma	27	204	117	164	53	524	471

Poredili smo grupu sa folikularnom varijantom papilarnog karcinoma i grupu sa folikularnim adenomima u odnosu na mikrovaskularnu gustinu i pokazali da je prisutna statistički značajna razlika između navedenih grupa po pitanju mikrovaskularne gustine ($p=.003$) (Tabela 39).

Razlike u mikrovaskularnoj gustini između folikularnog adenoma i folikularnog karcinoma ($p=.403$), i folikularnog karcinoma i folikularne varijante papilarnog karcinoma ($p=.834$) nisu statistički značajne.

Uporedili smo adenom Hirtleovih ćelija sa karcinomom Hirtleovih ćelija u odnosu na mikrovaskularne gustine u ovim lezijama i našli smo postojanje razlike ($p=.028$).

Konstruisali smo ROC krivu za CD31 broj ks/mm², u odnosu na kategorije benigni tumor/maligni tumor (Grafikon 22).



Grafikon 22 ROC kriva – Mikrovaskularna gustina kao klasifikator lezija na benigne i maligne

Površina ispod krive je 0.796 (std. error 0.034; p=.000, 95% interval poverenja: .729-.863) (Tabela 40).

Tabela 40 Kordinate krive

Test pozitivan ako je	Senzitivnost	1 - Specifičnost
...
173.50	.730	.291
175.00	.721	.291
177.00	.713	.266
179.00	.705	.266
182.00	.697	.266
...

Tabela 41 Karakteristike mikrovaskularne gustine kao dijagnostičkog testa u klasifikaciji lezija na benigne i maligne

Senzitivnost	71.31%	62.42% to 79.13%
Specifičnost	73.42%	62.28% to 82.73%
<i>Positive Likelihood Ratio</i>	2.68	1.83 to 3.94
<i>Negative Likelihood Ratio</i>	0.39	0.29 to 0.53
Prevalenca oboljenja	60.70%	53.58% to 67.49%
Pozitivna prediktivna vrednost	80.56%	71.82% to 87.54%
Negativna prediktivna vrednost	62.37%	51.72% to 72.20%

Iz priloženog se može zaključiti da ako ima više od 177 krvnih sudova po milimetru kvadratnom preseka tumora, da je nalaz maligni sa senzitivnošću od 71,31% i specifičnošću od 73,42% (Tabela 41).

Uzimajući vrednosti mikrovaskularne gustine jednake ili veće od 177 ks/mm² kao pozitivan test, u nastavku smo izračunali senzitivnost, specifičnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrednost, ako se ovaj test iskombinuje sa nekim od sledećih pozitivnih testova: CD56, CK19, Galectin 3, HBME-1 (Tabela 42, 43, 44).

Tabela 42 Poređenje kombinovane ekspresije markera u benignim i malignim tumorima

Kombinacije markera (svi markeri u kombinaciji su pozitivni)		Tip tumora			
		benigni		maligni	
		N	N %	N	N %
cd56_cd31	-	77	97.5%	73	59.8%
	+	2	2.5%	49	40.2%
galectin3_cd31	-	63	79.7%	42	34.4%
	+	16	20.3%	80	65.6%
ck19_cd31	-	72	91.1%	63	51.6%
	+	7	8.9%	59	48.4%
hbme1_cd31	-	74	93.7%	64	52.5%
	+	5	6.3%	58	47.5%

Tabela 43 Poređenje kombinovane ekspresije markera u odnosu na patohistološki nalaz

		PH nalaz													
		Adenoma colloidus		Adenoma folliculare		Adenoma Hurthle cell		Adenoma hyperplasticum		Carcinoma folliculare		Carcinoma Hurthle cell		Carcinoma papillare	
		N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	Column N %
cd56_cd31	-	30	100.0%	26	96.3%	9	90.0%	12	100.0%	13	86.7%	18	90.0%	42	48.3%
	+	0	0.0%	1	3.7%	1	10.0%	0	0.0%	2	13.3%	2	10.0%	45	51.7%
galectin3_cd31	-	28	93.3%	20	74.1%	5	50.0%	10	83.3%	7	46.7%	5	25.0%	30	34.5%
	+	2	6.7%	7	25.9%	5	50.0%	2	16.7%	8	53.3%	15	75.0%	57	65.5%
ck19_cd31	-	28	93.3%	25	92.6%	7	70.0%	12	100.0%	13	86.7%	11	55.0%	39	44.8%
	+	2	6.7%	2	7.4%	3	30.0%	0	0.0%	2	13.3%	9	45.0%	48	55.2%
hbme1_cd31	-	29	96.7%	27	100.0%	6	60.0%	12	100.0%	14	93.3%	6	30.0%	44	50.6%
	+	1	3.3%	0	0.0%	4	40.0%	0	0.0%	1	6.7%	14	70.0%	43	49.4%

Tabela 44 Karakteristike mikrovaskularne gustine kao dijagnostičkog testa u kombinaciji sa pozitivnim testovima CD56, Galectin-3, CK19, HBME-1 u klasifikaciji lezija na benigne i maligne

	CD31-CD56	CD31-GAL3	CD31-CK19	CD31-HBME1
Senzitivnost	40.16%	65.57%	48.36%	47.54%
Specifičnost	97.47%	79.75%	91.14%	93.67%
<i>Positive Likelihood Ratio</i>	15.86	3.24	5.46	7.51
<i>Negative Likelihood Ratio</i>	0.61	0.43	0.57	0.56
Prevalenca oboljenja	60.70%	60.70%	60.70%	60.70%
Pozitivna prediktivna vrednost	96.08%	83.33%	89.39%	92.06%
Negativna prediktivna vrednost	51.33%	60.00%	53.33%	53.62%

Uvidom u Tabelu 44, najviše vrednosti senzitivnosti za maligne lezije ima kombinacija CD31-Galectin 3, a najveću vrednost specifičnosti ima kombinacija CD31-CD56.

Tabela 45 Senzitivnost i specifičnost CD31 testa

		BENIGNI vs MALIGNI	PTC vs FA	FVPTC vs FA	FVPTC vs FTC	FTC vs FA	PTC vs netumor	HCC vs HCA
CD31	Senzitivnost	71.3%	69.0%	77.5%	77.5%	73.3%	69.0%	80.0%
	Specifičnost	73.4%	59.3%	59.3%	28.6%	59.3%	88.1%	50.0%

(FVPTC-folikularna varijanta papilarnog karcinoma; FA- folikularni adenoma; FTC- folikularni karcinom; HCC-karcinom Hirtleovih ćelija; HCA – adenoma Hirtleovih ćelija)

Uvidom u Tabelu 45, pored relativno visokih vrednosti senzitivnosti i specifičnosti za maligne lezije, ove vrednosti su značajno visoke za papilarni karcinom u odnosu na benigne ne-tumorske lezije.

4.9.Limfovaskularna gustina – LVD (D2-40)

Mikroskopskom analizom i naknadno, analizom slike, uočava se odsustvo limfatika u najvećem broju preseka i veoma mali broj limfnih sudova po preseku, u ostatku pregledanog materijala. Limfni sudovi su u 71% slučajeva veliki, nepravilnih ivica, zjapećeg lumena (otvoreni). U 29% slučajeva limfni sudovi su manji, reprezentovani sa nekoliko ćelija, ili linearni, sa neuočljivim ili fokalno otvorenim diskontinuiranim lumenom (linearni) (Tabela 46 i 47, Slika 6).

Tabela 46 Tipovi limfnih sudova

Prisustvo limfnih sudova		F	%	% validnih
Ima	linearni	20	10.0	29.4
	otvoreni	48	23.9	70.6
	Ukupno	68	33.8	100.0
Nema		133	66.2	
Ukupno		201	100.0	

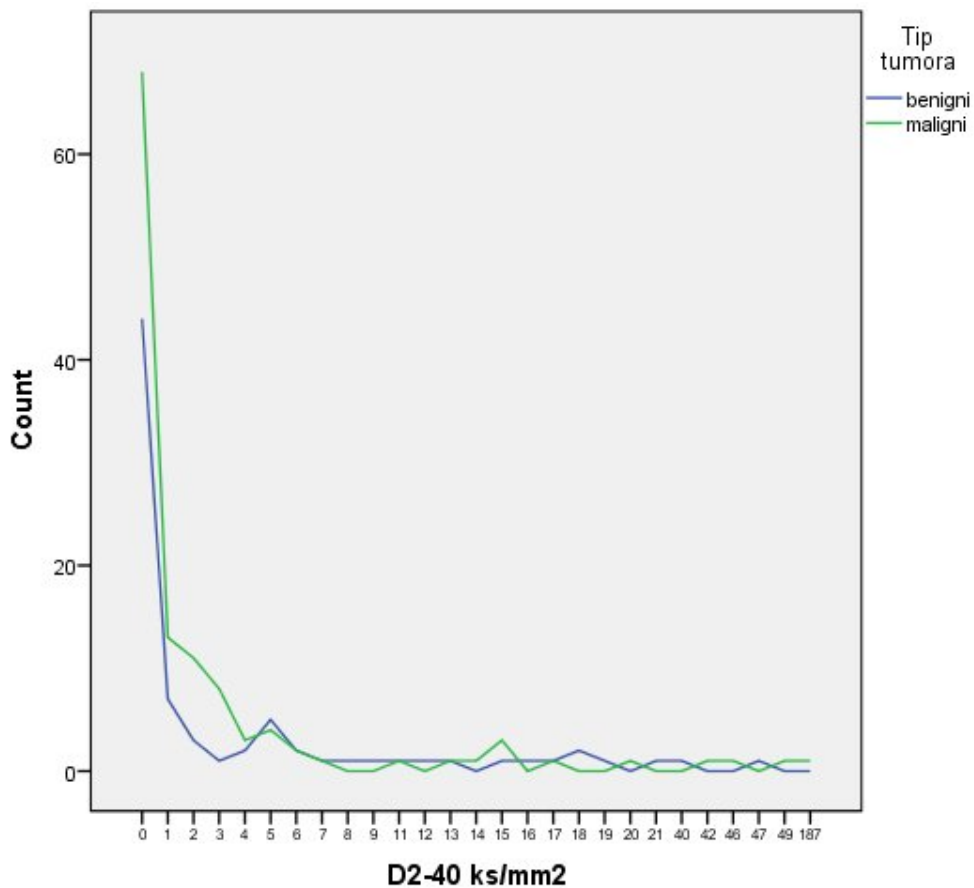
Tabela 47 Razlike u distribuciji tipova limfnih sudova u među različitim entitetima.

		Tip limfnih sudova		Ukupno
		linearni	otvoreni	
Ukupno	Adenoma colloidess	5	8	13
	Adenoma folliculare	4	6	10
	Adenoma Hurthle cell	0	3	3
	Adenoma hyperplasticum	0	3	3
	Carcinoma folliculare	1	2	3
	Carcinoma Hurthle cell	0	6	6
Ukupno		10	20	30
Ukupno		20	48	68

Uvidom u Tabelu 48 uočava se da je prosečan broj limfnih sudova u benignim lezijama (4±8) nešto malo manji od prosečnog broja limfnih sudova u malignim lezijama (5±18) (Grafikon 23). Uočena razlika između dve grupe, nije statistički značajna (p=.550)

Tabela 48 Limfovaskularna gustina (broj limfatika po mm²) u benignim i malignim tumorima

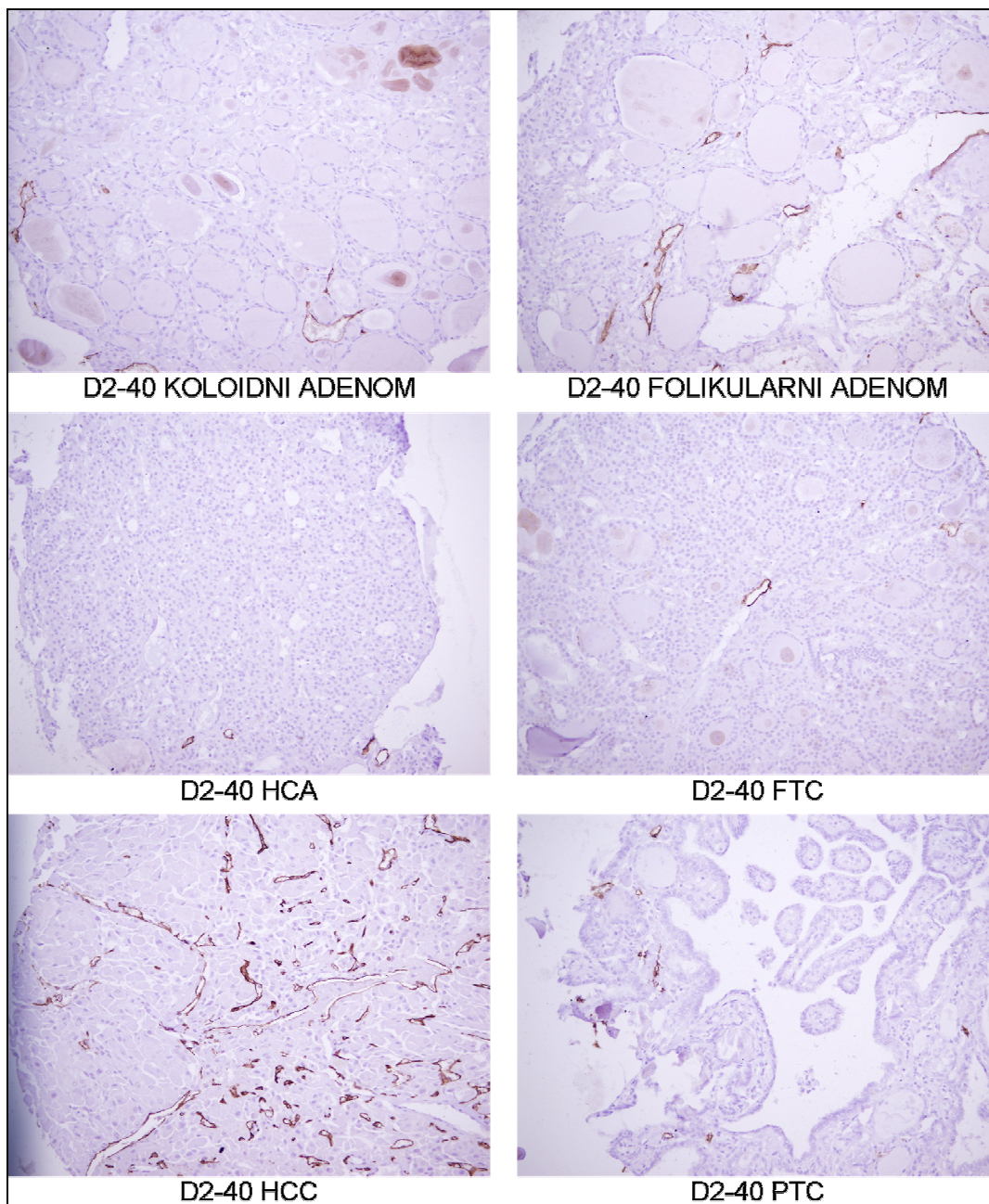
		D2-40 broj ks/mm ²						
		N	Srednja vrednost	SD	Medijana	Min	Max	Raspon
Tip tumora	benigni	79	4	8	0	0	47	47
	maligni	122	5	18	0	0	187	187



Grafikon 23 Limfovaskularna gustina (broj limfatika po mm²) u benignim i malignim tumorima

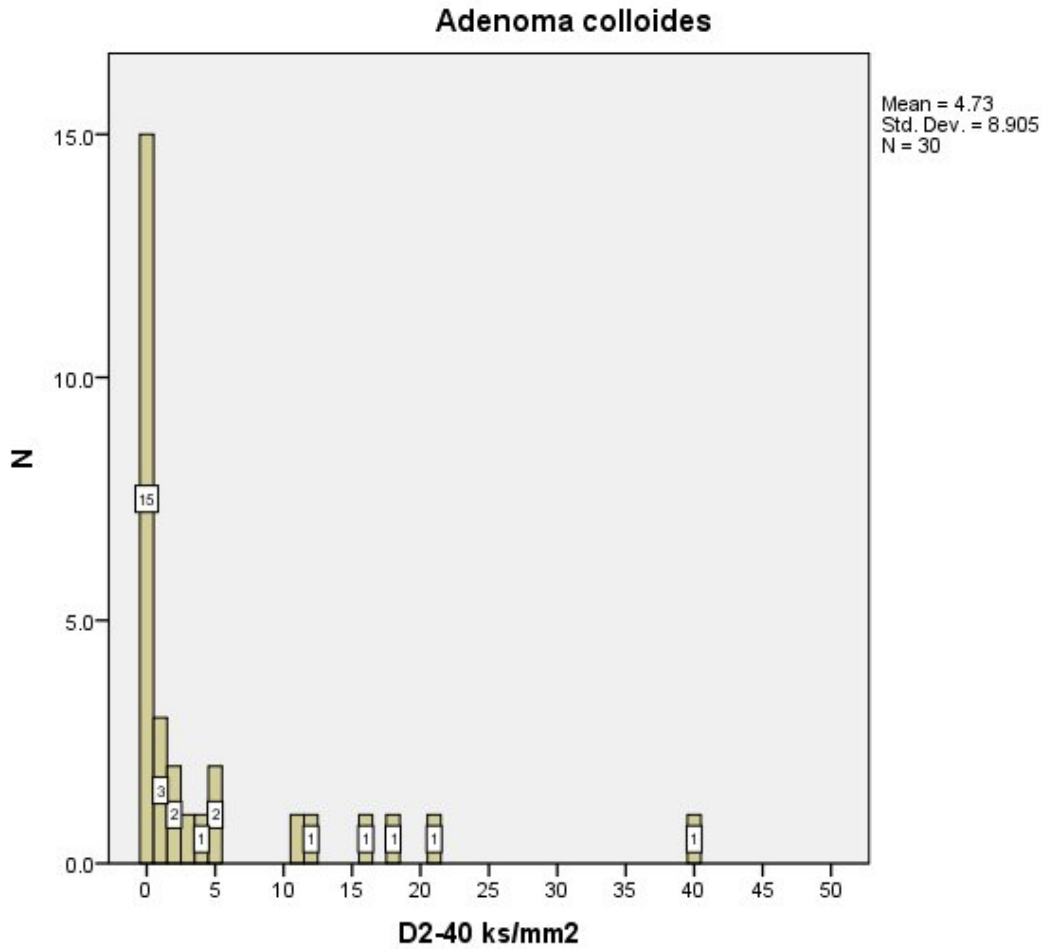
Tabela 49 Limfovaskularna gustina ((broj limfatika po mm²) u različitim patohistološkim entitetima

		D2-40 broj ks/mm2						
		N	Srednja vrednost	SD	Medijana	Min	Max	Raspon
PH nalaz	Adenoma colloidess	30	5	9	1	0	40	40
	Adenoma folliculare	27	5	10	0	0	47	47
	Adenoma Hurthle cell	10	1	2	0	0	5	5
	Adenoma hyperplasticum	12	4	7	0	0	18	18
	Carcinoma folliculare	15	2	4	0	0	14	14
	Carcinoma Hurthle cell	20	12	42	0	0	187	187
	Carcinoma papillare	87	3	8	0	0	49	49



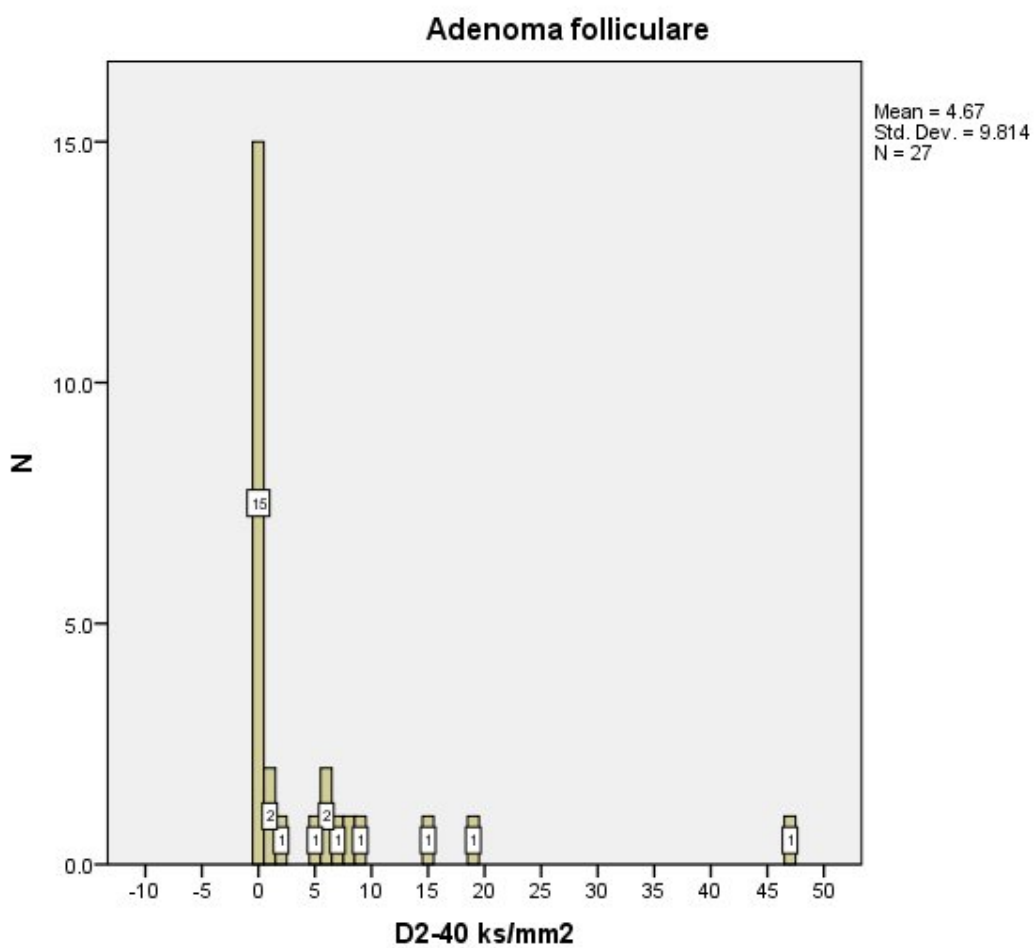
Slika 6 Limfovaskularna gustina predstavljena ekspresijom D2-40 (HCA-adenom Hirtleovih ćelija, PTC-papilarni karcinom, FTC-folikularni karcinom, HCC-karcinom Hirtleovih ćelija), 200x

U 50% slučajeva koloidnih adenoma ni jedan limfni sud nije indentifikovan. U 30% slučajeva indentifikovano je do 5 limfnih sudova po milimetru kvadratnom(Grafikon 24)



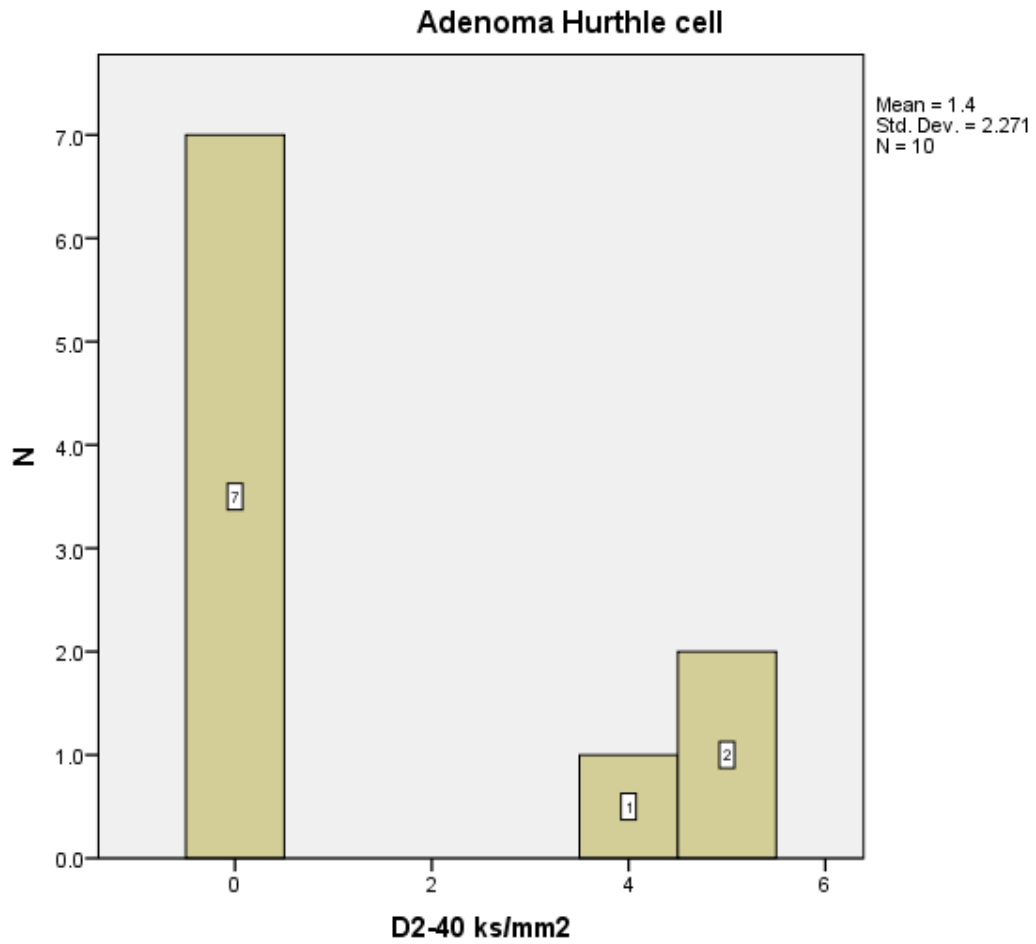
Grafikon 24 Limfovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom koloidnog adenoma

U 55,5% slučajeva folikularnih adenoma ni jedan limfni sud nije indentifikovan. U 30% slučajeva indentifikovano je do 10 limfnih sudova po milimetru kvadratnom (Grafikon 25).



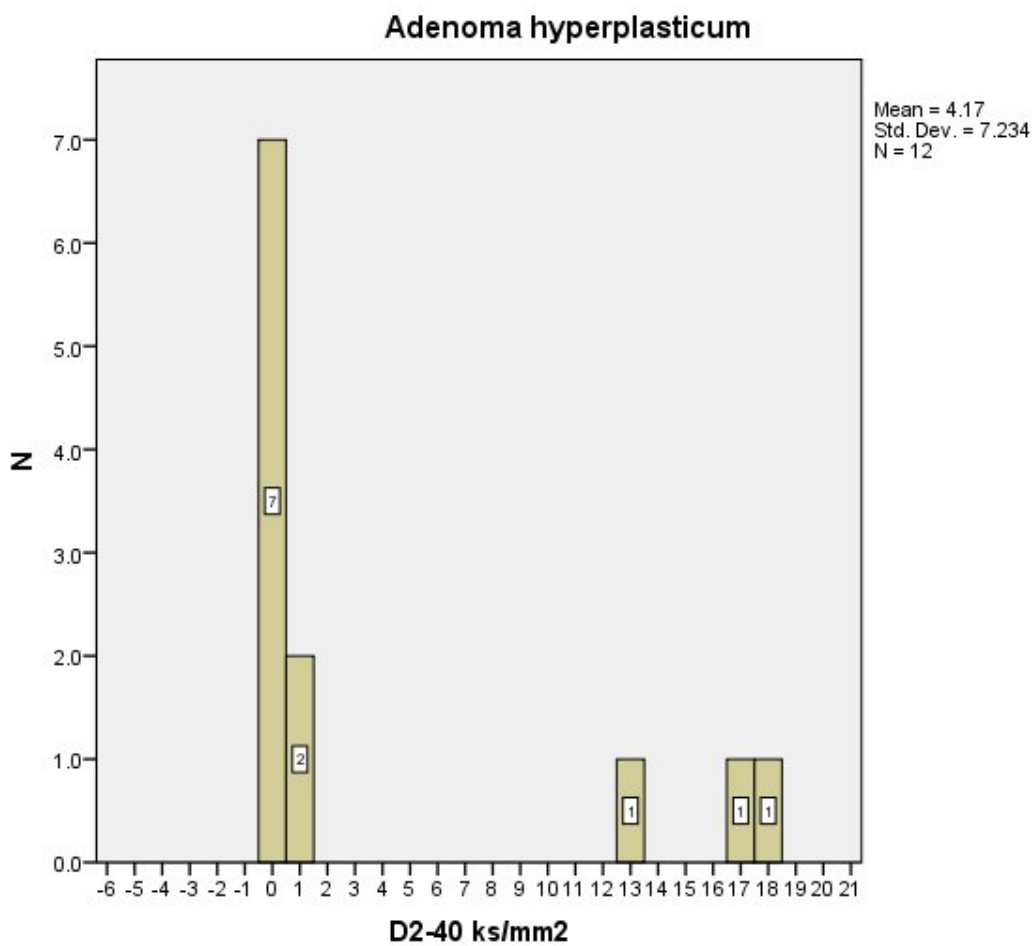
Grafikon 25 Limfovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom folikularnog adenoma

U 70% slučajeva adenoma Hirtleovih ćelija ni jedan limfni sud nije indentifikovan. U 30% slučajeva indentifikovano je do 5 limfnih sudova po milimetru kvadratnom (Grafikon 26).



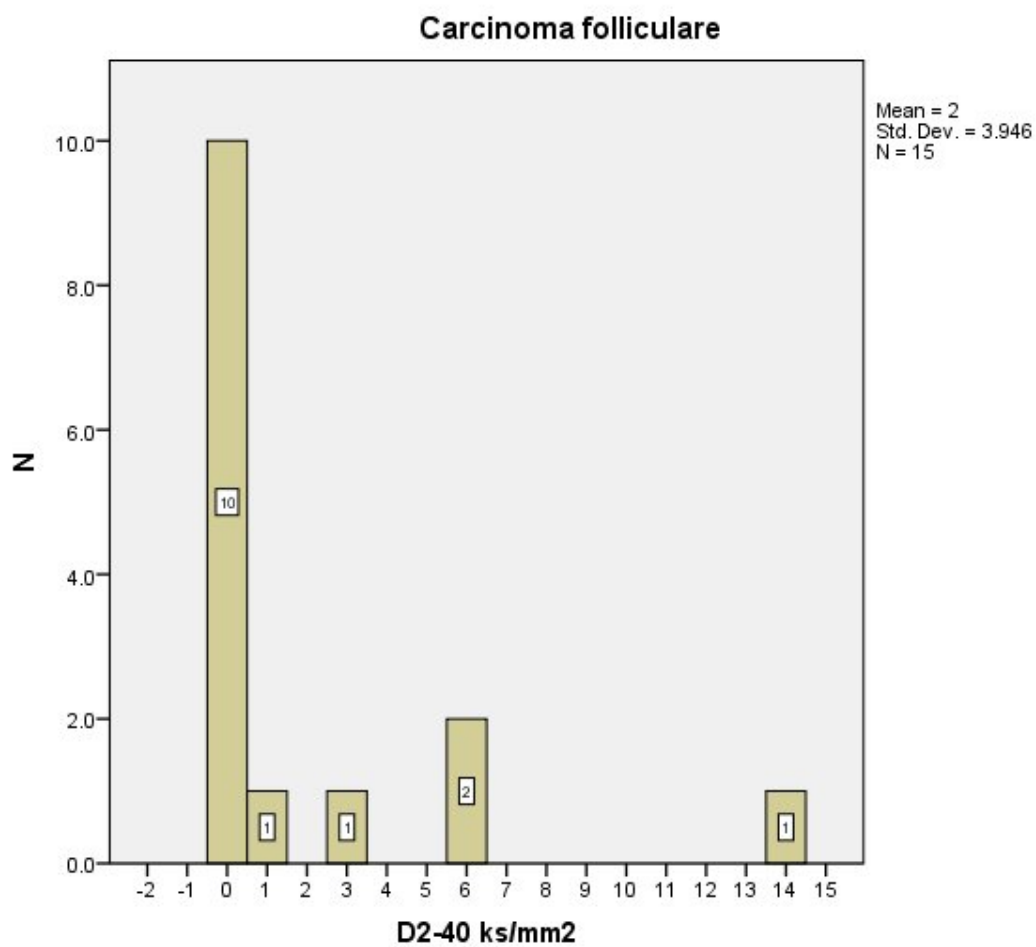
Grafikon 26 Limfovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom adenoma Hirtleovih ćelija.

U 58,3% slučajeva hiperplastičnih adenoma ni jedan limfni sud nije indentifikovan. U 16,5 posto slučajeva je indentifikovan samo 1 limfni sud po milimetru kvadratnom, a u 25% slučajeva registrovano je 13 do 18 limfnih sudova po milimetru kvadratnom(Grafikon 27).



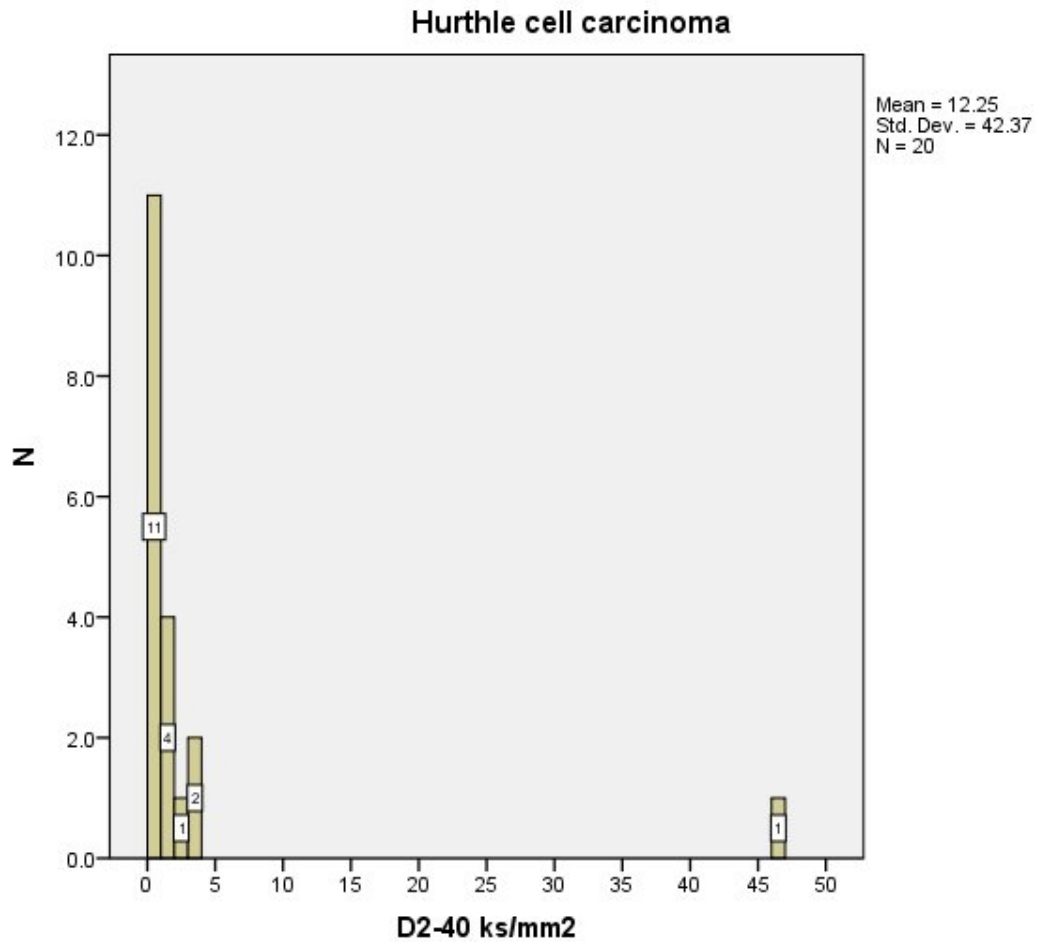
Grafikon 27 Limfovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom hiperplastičnog adenoma

U 66,7% slučajeva folikularnih karcinoma ni jedan limfni sud nije indentifikovan. U 33,3% registrovano je 1 do 14 limfnih sudova po milimetru kvadratnom (Grafikon 28).



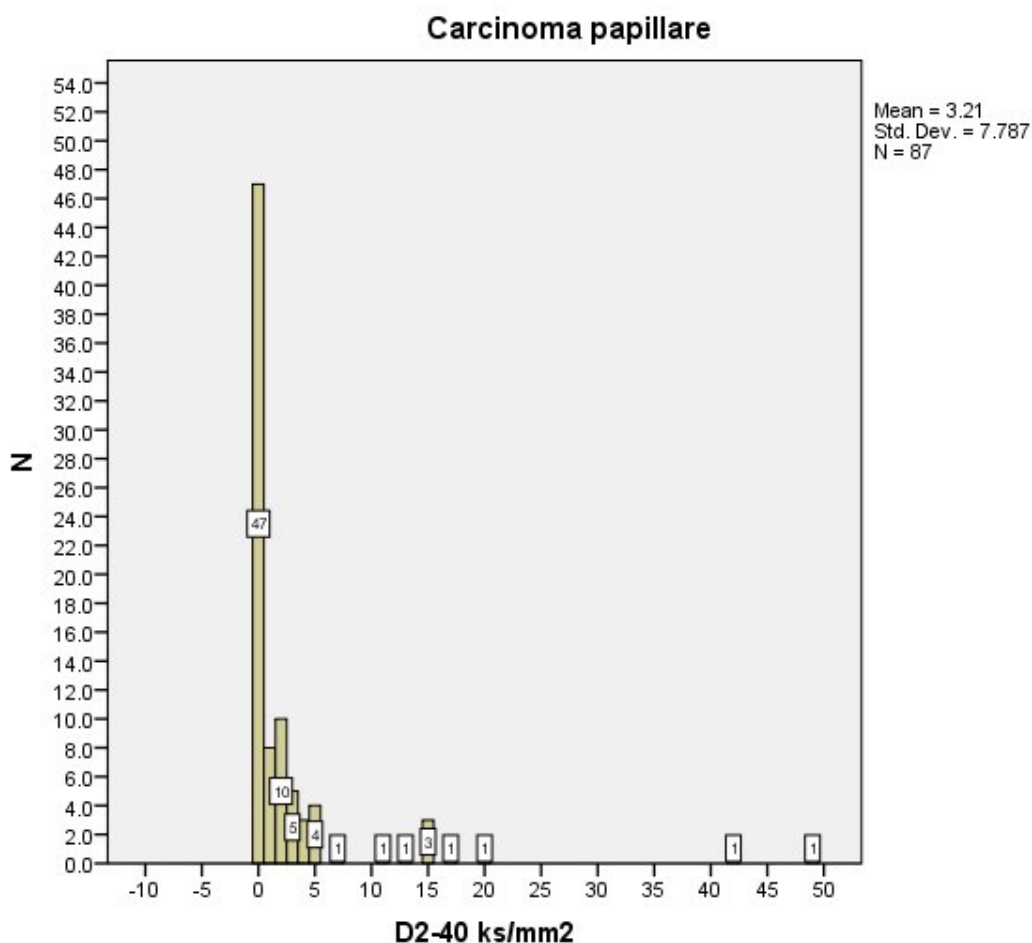
Grafikon 28 Limfovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom folikularnog karcinoma

U 55% slučajeva karcinoma Hirtleovih ćelija ni jedan limfni sud nije indentifikovan. U 35% slučajeva registrovano je 1 do 3 limfna suda po milimetru kvadratnom (Grafikon 29).



Grafikon 29 Limfovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom karcinoma Hirtleovih ćelija

U 54% slučajeva papilarnih karcinoma ni jedan limfni sud nije indentifikovan. U 34,4 posto slučajeva je registrovano je 1 do 5 limfnih sudova po milimetru kvadratnom (Grafikon30).



Grafikon 30 Limfovaskularna gustina unutar grupe sa patohistološkim nalazom papilarnog karcinoma Ispitujući da li postoje razlike u gustini limfovaskularne mreže između papilarnog karcinoma, folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma, našli smo da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih entiteta ($p=0.690$).

Ne postoji statistički značajna razlika u limfovaskularnoj gustini između papilarnog karcinoma s jedne strane i grupe predstavljene zbirom slučajeva koloidnog i hiperplastičnog adenoma s druge ($p=0.373$).

Takođe smo uporedili adenoma Hirtleovih ćelija i karcinom Hirtleovih ćelija i našli da ne postoji razlika u limfovaskularnoj gustini ($p=.709$)

5. DISKUSIJA

Citokeratin 19 je najmanji član citokeratinske familije, heterogene grupe intermedijarnih filamenata. Zdravi tireociti ne proizvode ovaj protein, dok je ushodna regulacija povezana sa neoplastičnom transformacijom. Postoje čvrsti dokazi u literaturi koji ukazuju na slabu ekspresiju CK19 u benignim stanjima, ali promenjivu ekspresiju u malignom tkivu štitaste žlezde (140). Jaka i difuzna imunohistochemijska pozitivnost CK19 je najčešće povezana sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde.

Naši rezultati pokazuju da je CK19 prekomerno ekspresiran u papilarnom tiroidnom karcinomu (PTC). Dokaz da prekomerna ekspresija ovog markera nije samo povezana sa PTC, smo dobili kada smo iz uzorka eliminisali papilarne karcinoma, na taj način eliminisašući doprinos PTC, i uporedili maligne i benigne entitete u odnosu na ekspresiju CK19 (pogledati rezultate). Obeshrabrujući rezultat je da nezanemarljiv broj benignih lezija takođe ekspresira CK19, premda fokalno i slabo. Potpuno odsustvo ekspresije CK19 je uočeno jedino u grupi hiperplastičnih adenoma.

U studiji koju su sprovedeli Barroeta i saradnici(197) (Tabela 50), ekspresija CK 19 je bila prisutna u 70% malignih lezija i 34% benignih lezija. Rezultati ove studije su dosta slični našim rezultatima (75,1% i 29,1%). Prva razlika ove studije u odnosu naše istraživanje je u postavci klasifikatora ekspresije. Imunoreaktivnost je smatrana pozitivnom ukoliko je više od 25% ćelija ekspresira CK19 . Drugo, u navedenoj studiji odnos benignih prema malignim promenama je 60%:40%, za razliku od naše studije gde je taj odnos 39%:61%. Treće, studija je uključila između ostalog i slabo diferentovane i anaplastične karcinome štitaste žlezde, za razliku od naše studije koja je uključila samo dobro diferentovane karcinome štitaste žlezde. Poredeći rezultate ove studije sa našim rezultatima u odnosu na imunopozitivnost CK19 u različitim patohistološkim entitetima uočavaju se značajne razlike u ekspresiji CK19 (prateći rezultati prikazani respektivno u zagradama) u folikularnom adenomu (0%; 22%), adenomu Hirtleovih ćelija (0% ; 60%), karcinomu Hirtleovih ćelija (25%; 60%) i folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma (100% ; 77%). Ove razlike mogu biti posledica razlike u veličini uzorka jer je veličina našeg uzorka po entitetima veća 3-10 puta u zavisnosti od entiteta.

S obzirom da su ovoj studiji pored ekspresije CK19, ispitivani i HBME-1, i Galectin 3, još jedan od rezultata sa kojim možemo uporediti naše nalaze je i koekspresija sva tri markera u benignim i malignim lezijama. Tako, u ovoj studiji kombinovana koekspresija sva tri markera daje senzitivnost od 54% i specifičnost od 100% za karcinome, nasuprot senzitivnosti od 54% i specifičnosti od 94% u našem istraživanju.

U zaključku ove studije se ističe da he TMA dragocena tehnika za brzo ispitivanje ekspresije različitih markera na velikom broju uzorkovanih malignih i benignih lezija porekla folikularnih ćelija. Takođe, nalazi ove studije ukazuju da panel koji se sastoji od CK19, HBME-1 i Galectin 3 može pomoći u dijagnozi malignih lezija porekla folikularnih ćelija (197).

U studiji Hong i saradnika (2010) svih 20 (100%) papilarnih karcinoma je imalo intenzivnu imunopozitivnost na CK19. Jedna od razlika ove studije u odnosu na našu je da su negativnim smatrani samo oni slučajevi u kojima izostaje u potpunosti ekspresija CK19 (0%). Korekcijom rezultata, sa pomeranjem granice pozivnosti na vrednosti od 10%, dobija se vrednost od 95% papilarnih karcinoma koji ekspimiraju CK19. Takođe, uvidom u podatke ove studije, može se zaključiti da u odnosu na hijalinizujuće trabekularne tumore, a u dijagnostici papilarnog karcinoma, imunopozitivnost CK19 ima senzitivnost od 95% i specifičnost od 92% (198).

Bez obzira na razlike u metodološkom pristupu (granica pozitivnosti je jednaka ili veća od 5% ćelija, IHH rađena na standardnim presecima) rezultati studije Zhu X i saradnika (2010) se najvećim delom poklapaju sa našim rezultatima(138). U ovoj studiji su pored dobro diferentovanih karcinoma (PTC, FTC) bili uključeni i slabo diferentovani karcinom, i medularni karcinom koji nije porekla folikularnih ćelija. Autori zaključuju da je CK19 veoma koristan ne samo u diferencijaciji benignih i malignih papilarnih struktura, već takođe i za diferencijalnu dijagnozu folikularne varijante PTC i FTC.

U studiji Park YJ i saradnika (2007) koja je metodološki u dva aspekta različita u odnosu na našu studiju (odstustvo TMA, i nisu uključene onkocitne lezije) senzitivnost CK19 je bila 90.3 %, a specifičnost 83.1% (75.4%; 70.9% u našoj studiji). Najveća razlika je bila u ekspresiji CK 19 u benignim netumorskim nodusima, 9.3% u navedenoj studiji i 26.2% u našoj. Takođe uporedili smo rezultate i po pitanju koekspresije dva markera u cilju klasifikacije lezija na maligne i benigne. Za koekspresiju Galectin-3 i CK19 senzitivnost je bila 86.4%, (68.03%), a specifičnost 100% (88.61%), a za ko-

ekspresiju Galectina 3 i HBME-1 senzitivnost je bila 85.9%, (64.5%), a specifičnost 100% (92.41%). Razlike u ko-ekspresiji za navedene markere bi se možda mogle objasniti odsustvom oksifilnih lezija u navedenoj studiji. Jedan od zaključaka navedene studije je da kombinovana upotreba CK19 i HBME-1 može povećati specifičnost i dijagnostičku preciznost u razlikovanju benignih i malignih tumora štitaste žlezde. Takođe, CK19 i visokomolekularni keratin (HMWCK) mogu pomoći u dijagnozi papilarnog karcinoma (199).

Specifičnost studije Scognamiglio i sar. (2006) je u tome što su selektovani samo slučajevi papilarnog karcinoma (klasična i folikularna varijanta) kao i folikularni adenom. Senzitivnost i specifičnost CK19 u dijagnozi papilarnog karcinoma je 96% (nasuprot 86,2% u našoj studiji) i 86% (nasuprot 77.8% u našoj studiji). Razlike u metodološkom smislu u odnosu na našu studiju su i što nije precizirana zona od interesa prilikom selekcije za TMA, kao i činjenica da su samo slučajevi koji su ekspimirali CK19 u jednako ili više od 10% ćelija, sa umerenom ili izraženom citoplazmatskom imunopozitivnošću smatrani pozitivnim. Zaključci navedene studije su i da jaka ko-ekspresija dva ili više markera podržava dijagnozu PTC, naročito ako je jedno od antitela HBME-1. Suprotno tome, negativno bojenje sa 3 ili 4 antitela jako podržava dijagnozu folikularnog adenoma (200).

U studiji Nasr MR i saradnika (2006) senzitivnost i specifičnost CK19 su 100% i 32%. U ovoj studiji je nađena ekspresija CK19 u 39/57 benignih lezija. Autori zaključuju da je bojenje na CK19 često i u benignim promenama štitaste žlezde i u PTC, a da je izostanak ekspresije CK19 dobar dokaz protiv dijagnoze papilarnog karcinoma. Dalje, kombinacija HBME-1 i CK19 daje visoku senzitivnost i specifičnost (201).

Senzitivnost CK19 od 68% i specifičnost od 88.5% za dobro diferentovane karcinome je pokazana u istraživanju Prasad ML i saradnika (2005). Zbog prisustva fokalne ekspresije CK19 i Galectin 3 u nodoznoj strumi i normalnom tkivu, autori donose zaključak da se ovaj marker mora koristiti u kombinaciji sa drugim markerima, i u sprezi sa pažljivom morfološkom evaluacijom. Takođe u ovoj studiji je pokazano da nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiju CK19 između papilarnog karcinoma s jedne i folikularnog + Hirtleovih ćelija karcinoma s druge strane ($p=0.23$) (202).

Većina slučajeva folikularnog adenoma, folikularnog karcinoma i nodozne strume su negativni ili pokazuju fokalno bojenja sa CK19, premda povremeno, neki slučajevi

pokazuju difuznu pozitivnost. Citokeratin 19 intenzivno i difuzno boji većinu papilarnih karcinoma, uključujući i FVPTC. Zbog ekspresije i u drugim folikularnim lezijama, iako retko, ograničena je upotreba ovog markera u rutinskom dijagnostičkom okruženju (203, 204).

Casey MB (2003) i saradnici su pokazali da CK19 ima visoku senzitivnost (100%) u dijagnostici papilarnog karcinoma u odnosu na papilarnu hiperplaziju, ali ima relativno nisku specifičnost (60%). Takođe, autori ističu da je uočena ekspresija CK19 u folikularnim ćelijama u sklopu Hashimoto tireoiditisa (148).

U diferencijalnoj dijagnozi papilarnog karcinoma i multinodozne strume sa papilarnim zonama CK19 može biti od pomoći. Fokalno i blede bojenje se može videti u folikularnim adenomima i multinodoznim strumama sa papilarnim zonama, a intenzivno i difuzno u papilarnom karcinomu. Ovu imunoreaktivnost treba sagledavati uporedo sa histopatološkim nalazima, sa ciljem da se spreči prekomerno dijagnostikovanje papilarnog karcinoma (205).

Prisustvo jake i difuzne ekspresije CK19 u tiroidnom tumoru sa folikularnim obrascem rasta treba da pobudi sumnju na FVPTC, i lezija treba biti pažljivo pregledana na prisustvo PTC tipa jedara. Ponekad, CK19 bojenje PTC-a može biti fokalno, pre nego difuzno. Zbog toga, ako izostaje difuzno bojenje CK19, to ne isključuje dijagnozu FVPTC ako su prisutne difuzne jedarne promene tipične za ovaj tumor. (206)

Ekspresija CK19 pored kvantifikacije broja ćelija zahteva i kvalitativno procenjivanje. U slučaju difuzne intenzivne imunopozitivnosti, ovaj marker je dobar podržavajući dokaz za papilarni karcinom (207, 208).

Pregledana su 23 naučna rada (138, 148, 153, 191, 197, 199-202, 204-217) na temu ekspresije CK19 u nodozno izmenjenoj štitastoj žlezdi, i ekstrahovani su podaci o istinito i lažno pozitivnim slučajevima, kao i o istinito i lažno negativnim slučajevima. Nakon učinjenog dobijeni su rezultati globalne senzitivnosti i specifičnosti ekspresije CK19 za malignitet (80%, 78%, respektivno). Rezultati ove studije su u saglasnosti sa rezultatima većine radova koje smo pregledali.

Vrednosti senzitivnosti su varirale od 13% -100% ($median_{sens}=84\%$) (201, 216, 217), dok su vrednosti specifičnosti za malignitet varirale od 0% - 100% ($median_{spec}=75\%$) (191,206). Pozitivna ekspresija ovog markera u kontrolnim ne-tumorskim tkivima, folikularnom adenomu, folikularnom karcinomu, i papilarnom karcinomu je varirala u

sledećim opsezima : 4-89% (median=20%); 0-100% (median=24%); 0-50% (median=40%); 46-100% (median=95%) slučajeva, respektivno.

Uopšteno, brojne studije su pokazale da je CK19 više ispoljen u malignim nego u benignim lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija(138, 197). Ekspresija CK19 u papilarnom karcinomu generalno, kao i u njegovoj folikularnoj varijanti, je značajno viša nego u folikularnom karcinomu) (138). Dalje, ovaj marker može poslužiti u razlikovanju papilarnog karcinoma od folikularnog adenom (139), ali ne može pomoći u razlikovanju folikularnog karcinoma od folikularnog adenoma (199, 216). Takođe, ovaj marker ne pravi razliku između folikularnog karcinoma i tumorski neizmenjenog tkiva štitaste žlezde (210).

Na kraju, može se doneti nekoliko zaključaka: CK19 može da pomogne u dijagnostici papilarnog karcinoma, ali se moraju uzeti u obzir intenzitet i distribucija ekspresije unutar tumora; intenzivna imunoreaktivnost na CK19 uz izostanak kriterijuma za PTC, treba da alarmira na mogućnost postojanja maligniteta; zbog relativno niske specifičnosti ovog markera , preporučuje se upotreba ovog markera u kombinaciji sa drugim markerima.

Tabela 50 Senzitivnost i specifičnost CK19 za malignitet, ukupan broj i procenat slučajeva sa pozitivnom imunoekspresijom

Reference	Benign		Malignant		NG		FA		HA		HCA		FTC		PTC		HCC		FVPTC		Sens	Spec	Cut off	TMA	Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%					
Dundjerovic (2015)	79	29%	122	75%	30	37%	27	22%	12	0%	10	60%	15	33%	87	86%	20	60%	40	78%	75%	71%	10%	yes	201
Barroeta (2006)	53	34%	37	70%	4	25%	3	0%	18	17%	3	0%	7	43%	11	91%	4	25%	4	100%	70%	66%	25%	yes	90
Zhu X (2010)	58	26%	180	79%	17	12%	21	14%					11	27%	155	87%			7	86%	79%	74%	5%	no	238
Park YJ (2007)	89	17%	206	90%	54	9%	35	29%					25	44%	181	98%			17	100%	90%	83%	10%	no	295
Scognamiglio(2006)	49	14%	78	96%			49	14%							78	96%			29	90%	96%	86%	10%	yes	127
Nasr MR (2006)	57	68%	51	100%	37	75%	6	83%	14	43%					51	100%			10	100%	100%	32%	10%	no	108
Prasad ML (2005)	123	11%	85	66%	88	15%	19	10%	14	0%	2	0%	6	50%	67	72%	8	50%	13	79%	66%	89%	10%	no	208
Casey MB (2003)	30	40%	30	100%					30	40%					30	100%					100%	60%	>0%	no	60
Erkilic S (2002)	40	28%	25	100%	25	20%	15	40%							25	100%					100%	73%	NA	no	65
Sahoo S (2001)	20	100%	15	100%			20	100%							15	100%			10	100%	100%	0%	NA	no	35
Cheung CC (2001)	75	20%	157	61%	40	20%	35	3%					4	0%	138	66%	7	29%	84	57%	61%	80%	NA	no	232
Barut F (2010)	393	22%	65	92%			22	50%	283	0%	8	50%	10	50%	55	100%			14	100%	92%	78%	10%	no	458
Wiseman SM (2008)	100	46%	105	95%																	95%	54%	NA	yes	205
Liu YY (2008)	100	3%	77	56%	64	4%	12	0%					13	0%	53	78%			11	22%	56%	98%	other	yes	177
Murphy K (2008)	45	47%	43	65%	19	89%	15	27%					14	43%	29	76%			9	22%	65%	54%	>0%	yes	88
Nakamura N (2006)	32	44%	130	81%	5	40%	27	44%					21	38%	94	94%			45	91%	81%	56%	10%	yes	162
Rossi ED (2006)	58	3%	42	86%			17	2%	41	2%					42	86%			28	82%	86%	97%	NA	no	100
Song Q (2011)	151	26%	441	96%	97	26%	54	24%							441	96%					96%	74%	10%	no	592
Beesley MF (2002)	28	25%	41	83%	8	25%	20	25%					12	41%	26	100%					83%	75%	>0%	no	69
de Matos PS (2005)	210	7%	129	54%	170	0%	18	33%	12	17%			38	21%	84	73%			25	52%	54%	93%	>0%	no	339
Nechifor-Boilă A (2014)	11	0%	11	45%	3	0%	5	0%							11	46%			5	0%	45%	100%	10%	yes	22
Jang MH (2015)	113	6%	79	13%	41	7%	72	6%					79	13%							13%	94%	10%	yes	192
Yassin FE (2015)	18	33%	24	100%			8	25%	4	0%					24	100%			6	100%	100%	67%	>0%	no	42
Choi YL (2005) [9	22%	125	80%	9	22%							30	47%	67	100%	6	67%			90%	78%	5%	no	134
Total	1941		2298		711		500		428		23		285		1764		45		357						4239

NG/N nodularna struma/normalno, FA-folikularni adenom, HA-hiperplastični adenom, HCA-Hurthle cell adenoma, FTC-folikularni karcinom, PTC- papilarni karcinom, HCC-Karcinom Hurthlevih ćelija, FVPTC-folikularna varijanta papilarnog karcinoma. Sens-sensitivity, Spec-specificity, TMA-tkivni mikroniz, NA-nije dostupno

Monoklonalno antitelo HBME-1 reaguje sa nepoznatim antigenom u mikrovilima mezotelnih ćelija, epitelu traheje, i adenokarcinomima pankreasa, pluća, i dojke. Ovo antitelo je procenjivano u smislu delotvornosti razlikovanja benignih i malignih lezija štitaste žlezde, i u aspiratima (direktni razmazi, i ćelijski blokovi), i u tkivnim isečcima (150).

Ovaj marker je ekstenzivnije ispoljen u papilarnim karcinomima poredeći sa folikularnim karcinom ili folikularnim adenomom (202, 204) (Tabela 51).

Folikularna varijanta papilarnog karcinoma ima značajno veću ekspresiju ovog markera nego folikularni karcinom ili folikularni adenom (204, 215). Rezultati naše studije su u saglasnosti sa rezultatima gore navedenih studija.

Nekoliko studija je pokazalo postojanje značajno više ekspresije HBME-1 u folikularnom karcinomu u odnosu na folikularni adenom (199, 211, 216, 218, 219), što pak nije slučaj sa našom studijom i nekoliko drugih studija (138, 204, 215).

U studiji Jang MH i saradnika (2015) je pokazano, da je HBME-1 marker koji se češće ispoljava u folikularnom karcinomu nego u folikularnom adenomu ($p=0.021$). Ova studija je u mnogo čemu slična našoj studiji, ali bih istakao nekoliko bitnih razlika. Broj slučajeva folikularnih karcinoma i folikularnih adenoma selektovanih za studiju je nekoliko puta veći u odnosu na broj slučajeva uključenih u našoj studiji (FTC 79 naspram 15; FA 72 naspram 27). Druga bitna razlika se ogleda u činjenici da iako je korišćena metoda TMA, dijametar cilindra je skoro 4 puta veći u odnosu na naše cilindre (4mm:1.1mm). Takođe, nije precizirana metodologija u vezi sa selekcijom polja za TMA. Uočena je ekspresija za adenomatoidnu strumu, folikularni adenom i folikularni karcinom u 10% , 47% i 66% slučajeva, respektivno. Ono što autori ističu kao rezultat je ekspresija u gotovo polovini ispitivanih folikularnih adenoma. Sa ekspresijom u 27% folikularnih karcinoma, naši rezultati značajno odstupaju od navedenih u studiji Jang MH i saradnika (216).

U studiji Abd-El Raouf SM i saradnika (2014) HBME-1 je imao više nivoe ekspresije u malignim tumorima (25/28, 89.3%), u poređenju sa benignim lezijama (5/22, 22.7%) ($P < 0.001$), i takođe višu imunoreaktivnost u malignim tumorima (25/28, 89.3%) u odnosu na grupu folikularnih adenoma (2/9, 22.2%) ($P = 0.003$). Takođe, u ovoj studiji,

HBME-1 je bio eksprimiran u 4/5 folikularnih karcinoma, sa dijagnostičkom senzitivnošću od 80%, što pokazuje značajnu razliku u odnosu na folikularne adenome ($P = 0.036$) (219).

Paunović i saradnici (2012) izveštavaju da HBME-1 i Galectin 3 mogu biti korišćeni pojedinačno kao diskriminatori između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma, ali je HBME-1 marker izbora (218).

S druge strane, Zhu X i saradnici (2010), ne nalaze razliku u ekspresiji između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p > 0.05$) (138).

U studiji Liu YY i saradnika (2008) HBME-1 ekspresija je bila značajno veća u malignoj u odnosu na benignu grupu, u papilarnom karcinomu i njegovoj folikularnoj varijanti u odnosu na folikularni karcinom ($P < 0.01$; $P < 0.05$ respektivno), kao i u papilarnom karcinomu i njegovoj folikularnoj varijanti u odnosu na folikularni adenom ($P < 0.01$ za oba). S druge strane, ova studija nije pokazala postojanje razlike u ekspresiji HBME-1 između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma ($p > 0.05$). Zaključak ove studije je da HBME-1 može biti od koristi u diferencijalnoj dijagnozi između folikularne varijante papilarnog karcinoma i folikularnog adenoma (dijagnostička tačnost 88%) (204).

Kada smo iz pregledanih studija ekstrahovali sve rezultate ekspresije HBME-1 u folikularnim adenomima i folikularnim karcinomima, i uporedili ove dve grupe, dobijena je statistički značajna razlika u ekspresiji HBME-1 između folikularnog adenoma i karcinoma (Fisher's exact test, the two-tailed: $P < 0.0001$).

Benigne lezije eksprimiraju HBME-1 fokalno, pre nego difuzno.

Između 26 pregledanih studija (124, 138, 148, 152, 153, 191, 192, 197, 199-202, 204, 207-209, 211, 212, 215, 216, 219-223) senzitivnost i specifičnost ovog markera varira značajno. Senzitivnost za malignitet se kretala u opsegu od 34% u studiji Nikiforove i saradnika (2003) do 100% u studiji Casey i saradnika (2003) (124, 168). Vrednosti specifičnosti za malignitet su varirale u nešto užem opsegu, od 54% u studiji Zhu X i saradnika (2010) (138) do 100% u studijama Guo Z i saradnika (2015) (220) i Cheung CC i saradnika (2001) (207).

Prosečne vrednosti senzitivnosti i specifičnosti markera za malignitet, objedinjujući rezultate svih pregledanih studija, su iznosile 76% (mediana=77%) i 87% (mediana=89%), respektivno. Kontrolna ne-tumorska tkiva su pokazivala pozitivnu

ekspresiju u opsegu od 0-35% slučajeva (mediana=10%) (138, 207,211). Folikularni adenomi, folikularni karcinomi i papilarni karcinomi su u različitim studijama imali pozitivnu ekspresiju u sledećim opsezima: 0-56% (mediana=25%), 17-100% (mediana=65%); 55-100% (mediana=92%), respektivno. Uočljiv je uzlazni trend u jačini ekspresije, počevši od ne-tumorskih tkiva ka papilarnom karcinomu.

U studiji Park i saradnika (2007) je pokazano da istovremena imunopozitivnost za HBME-1 i Galectin 3, kao i za HBME-1 i CK19 u dijagnozi diferentovanog tiroidnog karcinoma daje senzitivnosti od 85,9%, i 86.4%, respektivno, kao i specifičnost od 100% za obe kombinacije. Zaključak studije je da se kombinacijom markera povećava vrednost specifičnosti, ali da su vrednosti senzitivnosti niže od istih za pojedinačne markere (199).

U studiji Scognamiglio i saradnika (2006), koekspresija HBME-1 i CK19 ima senzitivnost od 83% i specifičnost od 100% za dijagnozu papilarnog karcinoma poredeći sa folikularnim adenomom. Obrnuto, negativno bojenje za HBME-1 i CK19 za oba markera istovremeno je visoko indikativno za folikularni adenom, sa vrednostima senzitivnosti od 82% i specifičnošću od 99% (200).

U studiji Volante i saradnika (2004) je pokazano da kombinovana upotreba HBME-1 i Galectin-3 poboljšava senzitivnost do čak 99% i specifičnost do 80% u dijagnozi malignih Hurthle ćelijskih tumora poredeći sa adenomima Hirtleoviih ćelija (223).

U zaključku možemo istaći da je HBME-1, uzimajući u obzir prosečne vrednosti senzitivnosti i specifičnosti, dosta pouzdan marker za dijagnozu maligniteta štitaste žlezde. Najizraženija ekspresija u grupi folikularnih lezija je prisutna u papilarnim karcinoma. Kombinovana ko-ekspresija ovog markera i CK19 je visoko specifična za papilarni karcinom u diferencijalnoj dijagnozi sa folikularnim adenomom.

Tabela 51 Senzitivnost i specifičnost HBME-1 za malignitet, ukupan broj i procenat slučajeva sa pozitivnom imunoekspresijom

Reference	Benign		Malignant		NG		FA		HA		HCA		FTC		PTC		HCC		FVPTC		Sens	Spec	cut off	TMA	Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%					
Dunderović (2015)	79	15%	122	71%	30	3%	27	15%	12	0%	10	70%	15	27%	87	76%	20	85%	40	65%	71%	85%	10%	yes	201
Barroeta(2006)	53	10%	37	70%	4	25%	3	33%	18	6%	3	0%	7	71%	11	91%	4	25%	4	75%	70%	90%	25%	yes	90
Zhu X (2010)	58	47%	180	92%	17	35%	21	52%					11	82%	155	95%			7	100%	92%	54%	5%	no	238
Park YJ (2007)	89	32%	206	91%	54	20%	35	49%					25	88%	181	92%			17	94%	91%	69%	10%	no	295
Scognamiglio (2006)	49	4%	78	87%			49	4%							78	87%			29	86%	87%	96%	10%	yes	127
Nasr MR(2006)	57	7%	51	96%	37	11%	6	0%	14	0%					51	96%			10	90%	96%	93%	10%	no	108
Prasad ML (2005)	123	2%	92	72%	88	1%	19	10%	14	0%	2	0%	6	50%	67	85%	8	13%	13	93%	72%	98%	10%	no	215
Casey MB(2003)	30	3%	30	100%					30	3%					30	100%					100%	97%	>0%	no	60
Cheung CC (2001)	75	0%	157	54%	40	0%	35	0%					4	50%	138	55%	7	29%	84	45%	54%	100%	ukn	no	232
Barut F (2010)	393	5%	65	97%			22	50%	283	1%	8	25%	10	90%	55	98%			14	100%	97%	95%	10%	no	458
Wiseman SM(2008)	100	5%	105	54%																	54%	95%	ukn	yes	205
Liu YY (2008)	100	2%	77	66%	64	2%	12	11%					13	17%	53	74%			11	89%	66%	98%	other	yes	177
Nakamura N (2006)	32	9%	130	77%	5	0%	27	11%					21	38%	94	97%			45	96%	77%	91%	10%	yes	162
Rossi ED (2006)	58	2%	42	93%			17	2%	41	0%					42	93%			28	93%	93%	98%	ukn	no	100
de Matos PS (2005)	210	11%	129	80%	170	0%	18	56%	12	33%			38	63%	84	94%			25	84%	80%	89%	>0%	no	339
Nikiforova MN (2003)	23	13%	33	34%			23	13%			13	NA	33	34%			19	NA			34%	87%	10%	no	56
Mai KT (2002)	93	14%	96	71%			45	42%			48	8%	29	65%	55	85%	12	0%			71%	86%	>0%	no	189
Liang HS (2009)	48	29%	71	92%			48	29%					26	92%	45	91%					92%	71%	5%	yes	119
Ito Y (2005)	253	26%	175	69%			155	30%	98	17%			138	61%	37	100%					69%	74%	>0%	no	428
Mase T (2003)	124	20%	81	84%	62	13%	62	27%					39	85%	36	97%					84%	80%	25%	no	205
Volante M (2004)	50	12%	102	53%							50	12%			32	88%	70	37%			53%	88%	>0%	no	152
Nechifor-Boilă A (2014)	11	27%	11	64%	3	33%	5	40%							11	64%			5	60%	64%	73%	10%	yes	22
Jang MH (2015)	113	34%	79	66%	41	10%	72	47%					79	66%							66%	66%	10%	yes	192
Guo Z (2015)	52	0%	85	77%	20	0%	32	0%					28	40%	57	96%			29	92%	77%	100%	>0%	yes	137
Abd-El Raouf (2014)	22	23%	28	89%	13	23%	9	22%					5	80%	23	91%			5	80%	89%	77%	10%	no	50
Choi YL (2005)	9	33%	125	90%	9	33%							30	100%	67	97%	6	67%			90%	67%	5%	no	134
Total	2304		2387		657		742		522		134		557		1489		146		366		77%	89%			4691

NG/N nodularna struma/normalno, FA-folikularni adenom, HA-hiperplastični adenom, HCA-Hurthle cell adenoma, FTC-folikularni karcinom, PTC- papilarni karcinom, HCC-Karcinom Hurthlejevih ćelija, FVPTC-folikularna varijanta papilarnog karcinoma. Sens-sensitivity, Spec-specificity, TMA-tkivni mikroniz, NA-nije dostupno

Galectin 3 je strukturalno jedinstven član (31-kDa) galektinske familije. Galektin je sposoban da pravi ukrštene veze sa glikoproteinima ćelijske membrane, na taj način formirajući nove mreže uključene u ćelijsku signalizaciju i receptorsku endocitozu. Galectin 3 je detektovan u jedru, citoplazmi i u ekstraćelijskom prostoru. Galectin 3 ima uloge u regulaciji apoptoze, ćelijskom motilitetu, i u progresiji tiroidnog karcinoma (143)

Pre dvadesetak godina, Xu i saradnici su ispitivali ekspresiju Galectin 1 i Galectin 3 u maloj seriji tiroidnih tumora i pronašli su njihovo ispoljavanje u papilarnom i folikularnom karcinomu, ali ne i u adenomima, nodularnoj strumi ili u normalnom tkivu štitaste žlezde. Na osnovama ovih ispitivanja oni su zaključili da galektini mogu biti korisni za razlikovanje benignih od malignih tiroidnih tumora (144)

Ekspresija Galectina 3 je veća u malignim lezijama u usporedbi sa benignim tiroidnim lezijama (138, 197, 199, 202, 204, 208) (Tabela 52).

U studiji Park i saradnika (2007) ekspresija Galectin 3 je bila prisutna u 94.7% diferentovanih tiroidnih karcinoma i u 4.5% benignih tiroidnih nodusa ($p < 0.001$). Svi slučajevi benignih tiroidnih nodusa su pokazivali fokalnu i slabu imunopozitivnost za galectin3, a s druge strane nijedan nije ekspresirao CK19 ili HBME-1. U grupi dobro diferentovanih tiroidnih karcinoma (5.3%), 11 su bili negativni na galectin 3, ali su svi pokazivali pozitivno bojenje na HBME-1 (199).

U studiji Barut i saradnika (2010) stopa difuzne ekspresije Galectina 3 je bila u 72.3% (47/65) malignih tiroidnih lezija (55 papilarnih i 10 folikularnih karcinoma), nasuprot fokalnoj ekspresiji u 4% benignih tiroidnih lezija (208).

Takođe, u studiji Liu i saradnika (2008) pokazana je razlika u ekspresiji Galectin 3 između benignih i malignih lezija, sa prekomernom ekspresijom u malignim ($p < 0.01$). Galectin 3 se ispoljavao jedarno i intracitoplazmatski, a razlika u ispoljavanju između benignih i malignih lezija je bila značajna za oba obrasca (204).

Neke studije su pokazale da je galectin 3 visoko ekspresiran u benignim tiroidnim lezijama i u normalnom tkivu štitaste žlezde (202, 224, 225).

Diskrepanca u učestalostima imunoreaktivnosti Galectin 3 u benignim lezijama možda je u vezi sa različitim sistemima za detekciju antitela, kao i u vezi sa graničnim vrednostima za pozitivna i negativna bojenja. U štitastoj žlezdi, endogeni biotin je uvek

ekspimiran u tireocitima, uglavnom u Hirtleovim ćelijama. Zbog toga, detekcioni sistemi zasnovani na biotinu mogu dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Sugerisano je da imunodetekcija galectin 3 može biti korisno pomoćno sredstvo u razlikovanju benignih i malignih tiroidnih tumora, ali samo ako je izvedena u okvirima biotin-slobodnih detekcionih sistema (223).

Neki autori su našli razliku u ekspresiji Galectin 3 između papilarnog karcinoma, kao i njegove folikularne varijante, u usporedbi sa folikularnim karcinomom (199,204,215).

U studiji Park YJ i saradnika (2007) Galectin 3 je bio ekspimiran u 99% papilarnih karcinoma (PTC vs FTC; $p < 0.001$), 94% papilarnih karcinoma folikularne histološke varijante (FVPTC vs FTC; $p = 0.031$), i u 64% folikularnih karcinoma. Dodatno, dok je većina papilarnih karcinoma pokazivala difuznu i jaku pozitivnost na Galectin 3, folikularni karcinomi su pokazivali fokalnu pozitivnost u 56% Galectin 3 pozitivnih slučajeva, naročito u subkapsularnoj zoni. Zato, upotreba Galectin 3 za imunocitohemiju citoloških aspirata može rezultovati lažno negativnim rezultatima (199).

De Matos i saradnici (2005), registruju pozitivnu imunoekspresiju Galectina 3 u 73%, 52%, i 21% papilarnih karcinoma, papilarnih karcinoma folikularne varijante, i folikularnih karcinoma, respektivno. Ekspresija je uglavnom bila citoplazmatska, ređe jedarna, sa difuznim obrascem u papilarnom karcinomu i fokalno segmentnim u folikularnom karcinomu štitaste žlezde (215).

Liu YY i saradnici (2008) nalaze razliku u ekspresiji Galectin 3 između papilarnog i folikularnog karcinoma, ali ne i postojanje razlike između folikularne varijante papilarnog karcinoma i folikularnog karcinoma. U navedenoj studiji jedina razlika između dva poslednje spomenuta entiteta je nađena u ekspresiji HBME-1 (204).

Ipak, drugi autori nisu našli značajne razlike u ekspresiji, uključujući i rezultat naše studije (138,219).

U studiji Zhu X i saradnika (2010) ekspresija Galectin 3 je bila prisutna u 92% papilarnih karcinoma, 100%, papilarnih karcinoma folikularne histološke varijante, i 64% folikularnih karcinoma. Uočene razlike u ekspresiji između folikularne varijante papilarnog karcinoma i folikularnog karcinoma nisu bile statistički značajne (138).

Galectin 3 ima izraženiju imunoreaktivnost u papilarnom (uključujući i folikularnu varijantu) karcinomu u usporedbi sa folikularnim adenomom, što je uporedivo sa našim rezultatima (138,204,211, 215,219).

Nakamura i saradnici (2006) su pokazali pozitivnu imunoekspresiju u 98% papilarnih karcinoma folikularne histološke varijante i 30% folikularnih adenoma ($p < 0.0001$). Autori ističu da normalna tkiva nisu eksprimirala Galectin 3, ali bez obzira na uočenu razliku u ekspresiji između FVPTC i FA, zbog visokog procenta pozitivnih slučajeva FA na Galectin 3, marker samostalno upotrebljen i nije veoma koristan u razdvajanju FA od FVPTC (211).

U nekoliko studija, uključujući i tekuću, su pronađene razlike u ekspresiji Galectin 3 između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma (199,219).

Abd-El Raouf i saradnici (2014) u svojoj studiji su pokazali pozitivnost Galectin 3 u 80% slučajeva folikularnog karcinoma i 11% slučajeva folikularnog adenoma ($p = 0.036$) (219).

Galectin 3 je jedini marker sposoban da napravi razliku između karcinoma i adenoma Hirtleovih ćelija, što je takođe pokazano i u studiji Volante i saradnika (223). Oni su koristeći biotin slobodni sistem detekcije uočili imunopozitivnost Galectin 3 u 94% karcinoma i svega 12% adenoma. Lokalizacija imunoreaktivnosti u slučajevima karcinoma je uglavnom bila na periferiji nodusa, i posebno u zonama kapsularne i vaskularne invazije, made su registrovani slučajevi sa difuznom imunopozitivnošću.

Uvidom u podatke pregledanih studija (29, 128, 138, 148, 200-202, 204, 208-216, 219, 224, 226-238), još jednom, uočena je izražena varijabilnost senzitivnosti i specifičnosti ovog markera za karcinom.

Vrednosti senzitivnosti su varirale od 8-100% (medijana=88%) i 40-100% (medijana=82%) za specifičnost. Prosečne vrednosti nisu mnogo različite od vrednosti medijane (84%; 83%).

U studiji Jang i saradnika (2015) senzitivnost od 8% delom je posledica činjenice da su grupu malignih tumora činili isključivo folikularni karcinomi. Svega 8% folikularnih karcinoma je bilo imunopozitivno na Galectin 3. Vrednosti imunopozitivnosti za Galectin 3 u folikularnom karcinomu, u različitim studijama, su se kretale od 8-100% tumora, sa medijanom od 41% imunopozitivnih tumora za TMA metodologiju, i medijanom od 67% imunopozitivnih tumora za klasične isečke sa parafinskih kalupa (216).

U studijama Manivannan (2012), i Casey (2003) vrednosti senzitivnosti od 100% za malignitet se verovatno mogu objasniti delom malim uzorkom (10 malignih tumora u

studiji Manivannan-a) ili prelomnom vrednošću (>0% ćelija u studiji Casey-a). U poslednje spomenutoj studiji, visoka vrednost senzitivnosti je praćena relativno niskom vrednošću specifičnosti za malignitet od 40% (148, 239).

Vrednosti specifičnosti su se kretale od 40% u studiji Casey-a(2002) do 100% u studijama Nechifor-Boilă i sar.(2014), Lavra L i sar. (2011), i Rossi i sar. (2006) (148, 191,212, 234).

Procenti imunopozitivnih slučajeva za kontrolnu grupu (ne tumorsko tkivo), folikularni adenom, folikularni karcinom i papilarni karcinom su značajno varirali: 0-52%(medijana=8%);0-63%(medijana=17%); 8-100%(medijana=66%); 46-100%(medijana=93%), respektivno.

Koekspresija tri markera (HBME1,Gal-3,CK19) je imala senzitivnost za malignitet od 83%, 87%, i 54% , kao i specifičnost za malignitet od 100%, 89% i 100% u studijama Scognamiglio i saradnika (2006), Nakamura i saradnika (2006) , and Barroeta i saradnika (2006), respektivno (197, 200, 211) . Uporedno odsustvo ekspresije sva tri markera ima senzitivnost od 38% i specifičnost od 100% za benigno (197). U studiji Zhu i saradnika (2010), pojedinačna ekspresija više od tri imunohistohemijska markera je bila prisutna u 100% slučajeva papilarnog karcinoma i u 0-30% pacijenata sa drugim tipovima oboljenja (138).

Tabela 52 Senzitivnost i specifičnost Galectin -3 za malignitet, ukupan broj i procenat slučajeva sa pozitivnom imunoekspresijom

Reference	Benign		Malignant		NG		FA		HA		HCA		FTC		PTC		HCC		FVPTC		Sens	Spec	Cut off	TMA	Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%					
Dunderović (2015)	79	35%	122	89%	30	13%	27	41%	12	67%	10	50%	15	73%	87	92%	20	85%	40	93%	89%	65%	10%	Yes	201
Barroeta et al 2006	53	34%	37	73%	4	0%	3	0%	18	6%	3	33%	7	57%	11	82%	4	75%	4	75%	73%	66%	25%	Yes	90
Zhu X et al 2010	58	34%	180	86%	17	24%	21	14%					11	64%	155	92%				100%	86%	66%	5%	No	238
Park YJ et al 2007	89	5%	206	95%	54	6%	35	3%					25	64%	181	99%			17	94%	95%	96%	10%	No	295
Scognamiglio (2006)	49	18%	78	94%			49	18%							78	94%			29	90%	94%	82%	10%	Yes	127
Prasad ML e(2005)	123	15%	92	92%	88	18%	19	10%	14	7%	2	0%	6	66%	67	94%	8	88%	13	100%	92%	85%	10%	No	215
Casey MB (2003)	30	60%	30	100%					30	60%					30	100%					100%	40%	0%	No	60
Barut F (2010)	393	4%	65	94%			22	36%	283	0%	8	25%	10	90%	55	95%			14	98%	94%	96%	10%	No	458
Wiseman SM (2008)	100	23%	105	87%																	87%	77%	ukn	Yes	205
Liu YY (2008)	100	6%	77	71%	64	10%	12	0%					13	33%	53	92%			11	33%	71%	94%	other	Yes	177
Murphy K (2008)	45	42%	43	65%	19	42%	15	33%					14	21%	29	86%			9	55%	65%	58%	>0%	Yes	88
Nakamura N (2006)	32	25%	130	88%	5	0%	27	30%					21	48%	94	96%			45	98%	88%	75%	10%	Yes	162
Rossi ED (2006)	58	0%	42	88%			17	0%	41	0%					42	88%			28	86%	88%	100%	ukn	No	100
Song Q (2011)	151	51%	441	97%	97	52%	54	48%							441	97%					97%	49%	10%	No	592
Beesley MF (2002)	28	18%	41	85%	8	38%	20	10%					12	100%	26	85%					85%	82%	>0%	No	69
de Matos PS (2005)	210	5%	129	53%	170	0%	18	11%	12	8%			38	21%	84	73%			25	52%	53%	95%	>0%	No	339
Nikiforova MN (2003)	23	4%	33	15%			23	4%					33	15%							15%	96%	10%	No	56
Inohara H (2008)	60	28%	56	89%	34	24%	26	35%					16	63%	40	100%					89%	72%	>0%	No	116
Aiad HA (2008)	38	11%	41	93%	19	11%	19	11%					13	92%	28	93%					93%	90%	>0%	No	79
Sapio MR (2007)	62	27%	106	87%	51	29%	11	18%					32	75%	74	92%			19	79%	87%	73%	10%	No	168
Galusca B (2005)	62	18%	23	96%	36	8%	16	31%			10	30%	6	100%	15	93%					96%	82%	>0%	No	85
Nucera C (2005)	105	11%	28	68%	20	0%	22	45%					6	66%	15	80%	4	75%			68%	90%	NA	NA	133
Weber KB (2004)	13	31%	33	79%			13	31%					9	44%	24	92%					79%	69%	5%	No	46
Oestreicher-Kedem(2004)	25	28%	29	75%			19	11%			6	83%	11	63%	18	83%			18	83%	75%	72%	5%	No	54
Volante M (2004)	50	12%	102	95%							50	12%			32	97%	70	94%			95%	88%	>0%	No	152
Torres-Cabala C (2004)	91	9%	60	77%	57	0%	12	17%	14	0%	3	33%	13	62%	34	91%	4	100%	12	92%	77%	91%	>0%	No	151
Lavra L (2011)	14	0%	29	93%					14	0%			3	67%	24	96%	2	100%	9	100%	93%	100%	ukn	No	43
Kovacs RB (2003)	55	22%	36	89%	25	0%	19	21%	3	0%			10	67%	20	100%					89%	78%	>0%	No	91
Jakubiak-Wielganowiczv	42	19%	42	86%			42	19%					17	71%			25	96%			86%	81%	>0%	No	84
Giannini R (2003)	20	10%	45	93%			20	10%							45	93%					93%	90%	NA	NA	65
Gaffney RL (2003)	14	21%	81	85%			14	21%					21	67%	60	92%					85%	79%	other	No	95
Martins L (2002)	60	32%	32	94%	29	14%	31	45%					20	90%	12	100%					94%	68%	other	No	92
Coli A (2002)	52	46%	38	92%			27	63%	25	28%			5	60%	28	100%	1	100%			92%	54%	>0%	No	90
Nascimento MC(2001)	82	2%	42	71%	48	0%	9	11%			14	7%	14	79%	11	82%	17	59%			71%	98%	>0%	No	124
Nechifor-Boilă A(2014)	11	0%	11	46%	3	0%	5	0%							11	46%			5	0%	46%	100%	10%	Yes	22
Jang MH (2015)	113	4%	79	8%	41	2%	72	6%					79	8%							8%	96%	10%	Yes	192
Abd-El Raouf SM (2014)	22	9%	28	93%	13	7%	9	11%					5	80%	23	96%			5	80%	93%	91%	10%	No	50
Manivannan P (2012)	12	17%	10	100%									3	100%					7	100%	100%	83%	10%	No	22
Total	2624		2802		932		748		466		106		488		1947		155		310						5426

NG/N nodularna struma/normalno, FA-folikularni adenom, HA-hiperplastični adenom, HCA-Hurthle cell adenoma, FTC-folikularni karcinom, PTC- papilarni karcinom, HCC-Karcinom Hurthlevih ćelija, FVPTC-folikularna varijanta papilarnog karcinoma. Sens-sensitivity, Spec-specificity, TMA-tkivni mikroniz, NA-nije dostupno

CD56 je neuralni ćelijski adhezioni molekul (NCAM) koje je normalno eksprimiran u tiroidnim folikularnim ćelijama. Redukovana ekspresija CD56 korelira sa tumorskom progresijom kod pacijenata sa kancerima. Njegova ekspresija je smanjena, ili u potpunosti izostaje, u slučajevima papilarnog, folikularnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (159,240,241).

Rezultati naše studije ukazuju da su maligni tumori izgubili ili eksprimiraju u manjoj meri CD56 nego benigne tiroidne lezije, što je u saglasnosti sa predhodno objavljenim podacima (242,243,244) (Tabela 53).

Ceyran i saradnici (2015) registruju imunopozitivnost u 91.7% benignih tiroidnih lezija i u samo 8.9% papilarnih tiroidnih karcinoma ($p < 0.05$) (245).

Ma H i saradnici (2014), u istraživanju nalaze umerenu do jaku ekspresiju u svim kontrolnim tkivima (peritumoralno benigno tkivo; specifičnost 100%) ,dok u papilarnom karcinomu 79.1% slučajeva je u potpunosti negativno ili pokazuje slabu fokalnu pozitivnost. Ukratko, CD56 je dobar negativni pokazatelj za dijagnozu papilarnog karcinoma (246).

U studiji Shahebrahimi i saradnika (2013) ekspresija CD56 je bila prisutna u 93% benignih lezija, nasuprot ekspresiji u samo 5% papilarnih karcinoma ($p = 0.001$) (242).

Abd El Atti RM. i saradnici (2012) su pokazali da CD56 razlikuje folikularnu varijantu papilarnog karcinoma od drugih nodusa sa folikularnim obrascem (folikularni adenomi, hiperplastični nodusi i FT-UMP) sa visokom statistički značajnom razlikom ($p < 0.001$) (243).

CD56 ekspresija je viđena u 95.8% folikularnih lezija (folikularni adenom i karcinom karcinom, Hirtle cell karcinom i adenom, multinodozna struma, Hashimoto tireoiditis) nasuprot 1,3% slučajeva papilarnih karcinoma ($p < 0.001$) (155).

Ekspresija CD56 je više redukovana u papilarnim karcinomima u odnosu na folikularne karcinome i folikularne adenome (241). Park i saradnici (2009) registruju imunopozitivnost CD56 u 100% medularnih karcinoma (PTCvsMedularni; $p = 0.000$), 93.3% folikularnih adenoma (PTCvsFA; $p = 0.000$), 82.6% folikularnih karcinoma (PTCvsFTC; $p = 0,000$), i 7.5% papilarnih karcinoma . Nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji CD56 između folikularnog adenoma i karcinoma ($p = 0.339$) (241).

S druge strane, u studiji Etem i saradnika (2010) CD56 imunopozitivnost je bila prisutna u 35% folikularnih tumora i u 35% papilarnih karcinoma folikularne varijante. Bojenje

je bilo odsutno u 65% slučajeva u obe grupe ($p=0.186$). Ovi rezultati donekle su u saglasnosti sa našim rezultatima (247).

Intrigantno, u našoj studiji je nađena razlika u ekspresiji CD56 između folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma, što nije u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (241). Ako se prethodno navedena informacija dovede u vezu sa nalazima da folikularni karcinomi imaju značajno smanjenu ekspresiju CD56 u odnosu na benigne folikularne lezije, mogli bi smo zaključiti da redukovana ekspresija CD56 nije ekskluzivno svojstvo papilarnih karcinoma. Kao dodatak, navodimo i studiju Satoh i saradnika (2001) koji ispitujuću ekspresiju CD56 registruju odsustvo iste u svim slučajevima folikularnog karcinoma (100%), i kao i u 93% slučajeva papilarnog karcinoma (248).

Razlike između studija u odnosu na senzitivnost i specifičnost za malignitet su bile značajne. Senzitivnost za karcinom je varirala od 58-100%, sa vrednostima medijane od 84% (preračunata prosečna vrednost za sve pregledane studije je 80%). Vrednosti specifičnosti za malignitet su varirale od 46% do 100% sa vrednostima medijane od 92% (preračunata prosečna vrednost za sve pregledane studije je 93%)

Najveću senzitivnost ovaj marker pokazuje za papilarni karcinom, a najmanju za folikularni karcinom.

Imajući na umu da su naši tkivni uzorci dobijeni iz tumora na dodirnoj površini sa normalnim tkivom, naši rezultati mogu biti podržani rezultatima studija ElDemellawy i saradnika (2009) i Scarpino i saradnika (2007) koji su unutar grupe papilarnih karcinoma našli da su pojedine CD56 pozitivne ćelije su identifikovane, i u svim slučajevima ove ćelije su bile locirane unutar tumora na spoju sa zdravim tkivom. Zbog toga, niska vrednost senzitivnosti (58%) CD56 u našem istraživanju može biti posledica uzorkovanja tkiva (159, 240).

Nechifor-Boilă i saradnici (2014) su našli da panel koji se sastoji od CD56 i/ili CK19/Gal-3 (oni su koristili izraz Gal-3/CK19 zbog toga što su slični rezultati dobijeni sa panelom koji je sadržao bilo CK19, bilo Gal-3) i CD56 i/ili HBME-1 ima najveće senzitivnosti (90.9%) i negativne prediktivne vrednosti (87.5 i 83.3, respektivno), dok je kombinacija markera sa najvećom specifičnošću (72.7%) predstavljena panelom koji se sastojao od HBME-1 sa CK19/Gal-3, u indentifikaciji slučajeva papilarnog karcinoma.

Panel koji se sastojao od CD56 i/ili HBME-1 je veoma senzitivna i specifična (100%; 90%) u razlikovanju slučajeva folikularne varijante papilarnog karcinoma od benignih tiroidnih lezija /tumora (249) .

Kad je procenjena vrednost panela koji se sastoji od tri markera, najbolja kombinacija za slučajeve sa folikularnom varijantom papilarnog karcinoma je bila HBME-1, CD56 i/ili CK19 sa senzitivnošću od 91%(249).

Kada je evaluirana imunopozitivnost za tri markera, u studiji Ceyran i saradnika (2015), kombinacija za papilarni karcinom sa najvećom senzitivnosti i specifičnosti je CD56(-), HBME-1 (+), Galectin-3 (+) sa vrednostima od 97%, i 70%, respektivno (245).

U studijama Mi i saradnika (2011), kao i Park i saradnika (2009), kombinacijom tri markera, CD56, Galectin3, i CK19, sa ciljem da se napravi razlika između papilarnog karcinoma od drugih benignih tiroidnih lezija, dobijene su vrednosti senzitivnosti za papilarni karcinom od 93,8% i 88,1%, i specifičnosti za papilarni karcinom od 90.9% i 93.8%, respektivno (241, 250).

Tabela 53 Senzitivnost i specifičnost CD56 za malignitet, ukupan broj i procenat slučajeva sa pozitivnom imunoekspresijom

Reference	Benign		Malignant		NG		FA		HA		HCA		FTC		PTC		HCC		FVPTC		Sens	Spec	Cut off	TMA	Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%					
Dunderović (2015)	79	92%	122	42%	30	87%	27	96%	12	100%	10	90%	15	73%	87	25%	20	90%	40	38%	58%	92%	10%	yes	201
Shahebrahimi K (2013)	39	92%	39	5%	32	NA	7	NA					39	5%					5	NA	95%	92%	0%	no	78
Nechifor-Boilă A (2014)	11	64%	11	18%	3	33%	5	60%							11	18%			5	20%	82%	64%	10%	yes	22
Abd El Atti RM (2012)	44	93%	29	17%			12	92%	32	88%					29	17%			16	19%	83%	93%	10%	no	73
Scarpino S (2007)	107	100%	66	27%			26	100%							61	30%			21	10%	73%	100%	other	no	173
ElDemellawy D (2009)	100	100%	75	0%									2	NA	72	0%	1	NA	23	0%	100%	100%	10%	no	175
Satoh F (2001)	11	46%	39	8%			11	46%					10	0%	14	7%					92%	46%	0%	no	50
Park WY (2009)	36	92%	112	38%	21	91%	15	93%					23	83%	67	8%					63%	92%	10%	no	148
Nechifor-Boila A (2013)	NA	83%	204	15%											204	15%			90	27%	85%	83%	10%	yes	204
Mi KS (2011)	22	73%	80	5%	12	58%	5	100%							80	5%					95%	73%	10%	no	102
Total	449		777		98		108		44				50		664		21		200						1226

NG/N nodularna struma/normalno, FA-folikularni adenom, HA-hiperplastični adenom, HCA-Hurthle cell adenoma, FTC-folikularni karcinom, PTC- papilarni karcinom, HCC-Karcinom Hurthlevih ćelija, FVPTC-folikularna varijanta papilarnog karcinoma. Sens-sensitivity, Spec-specificity, TMA-tkivni mikroniz, NA-nije dostupno

Angiogeneza (merena kao tumorska mikrovaskularna gustina) korelira sa tumorskim ponašanjem. U mnogim humanim tumorima, uključujući tumore dojke, mokraćne bešike, želuca, i štitaste žlezde, pokazano je da je povećana angiogeneza povezana sa razvojem metastaza (251), lošijom prognozom (252), i kraćim preživljavanjem (253, 254).

Uloga angiogeneze i limfangioeneze u kancerima štitaste žlezde nije u potpunosti razjašnjena. Obrasci tumorskog ponašanja i metastatskog širenja variraju shodno tipu tumora. Na primer, papilarni karcinom štitaste žlezde ima sklonost da metastazira u regionalne limfne noduse, dok folikularni karcinom štitaste žlezde obično metastazira hematogeno. Nije u potpunosti istraženo da li razlike u angiogenom i limfangiogenom fenotipu utiču na puteve tumorskog metastaziranja ili određuju agresivnije ponašanje.

U studiji Garcia i saradnika (2006) je pokazano da je mikrovaskularna gustina veća u normalnom tkivu štitaste žlezde i u uzorcima papilarnog mikrokarcinoma nego u benignim i malignim proliferativnim lezijama štitaste žlezde. Folikularni tumori (adenom i karcinom) su imali najniže vrednosti limfovaskularne gustine, a papilarne neoplazme (karcinom i mikrokarcinom), medularni karcinom i toksične multinodularne strume su pokazivali veće vrednosti limfovaskularne gustine. U usporedbi sa papilarnim karcinomima i incidentalno otkrivenim mikropapilarnim karcinomima, folikularni adenomi su imali statistički značajno niže vrednosti mikrovaskularne gustine.

U suprotnosti sa uobičajenim karcinomima, ali slično sa drugim endokrinim neoplazmama, poput tumora hipofize i adrenokortikalnih tumora, mikrovaskularna gustina je redukovana u nekim proliferativnim lezijama u usporedbi sa normalnim tkivom štitaste žlezde. Ekspresija vaskularno-endotelnog faktora rasta - A (VEGF-A) je ushodno regulisana u tiroidnim karcinomima u poređenju sa normalnim tkivom štitaste žlezde (255).

Nasuprot nalazima gore spomenute grupe (N Garcia et al), procenom angiogeneze korišćenjem F8, kao endotelnog markera, i kvantifikacijom mikrovaskularne gustine u zonama sa najviše krvnih sudova u 128 papilarnih tiroidnih karcinoma, druga grupa je demonstrirala trostruko povećanje u tumorskoj prokrvljenosti u poređenju sa normalnim tkivom štitaste žlezde (173).

Opšta intratumorska mikrovaskularna gustina, u našoj studiji, je bila statistički značajno veća u malignim tumorima u odnosu na benigne lezije, sa najvećim prosečnim vrednostima mikrovaskularne gustine u papilarnom karcinomu, a najnižim vrednostima u koloidnom adenomu. Takođe, pokazane su značajno više vrednosti mikrovaskularne gustine u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u odnosu na folikularni adenom, kao i u karcinomu Hirtleovih ćelija u odnosu na adenom Hirtleovih ćelija. Nisu nađene značajne razlike u mikrovaskularnoj gustini između folikularne varijante papilarnog karcinoma i folikularnog karcinoma, kao ni između folikularnog adenoma i folikularnog karcinoma.

U studiji Celano i saradnika (2013), upotrebom CD31 kao endotelnog markera, je pokazana značajno veća mikrovaskularna gustina unutar toksičnih adenoma, u poređenju sa okolnim neizmenjenim tkivom štitaste žlezde. S druge strane, unutar toksičnih adenoma su gotovo u potpunosti nedostajali limfni sudovi, sa značajno smanjenom limfovaskularnom gustinom u usporedbi sa okolnim neizmenjenim tkivom štitaste žlezde (256).

U studiji TA Giorgadze i saradnika (2005), poređenjem vrednosti opšte intratumoralne mikrovaskularne gustine između grupa sa folikularnom varijantom papilarnog karcinoma, folikularnim karcinomom i folikularnim adenomom, nije nađena statistički značajna razlika (257).

U studiji Lee S i saradnika (2012), korišćenjem CD31, nisu nađene značajne razlike u mikrovaskularnoj gustini između tiroidne nodularne hipeplazije, papilarnog karcinoma štitaste žlezde sa limfonodalnim metastazama, i papilarnog karcinoma bez limfonodalnih metastaza (258).

U drugoj studiji, upotrebom CD31 i CD34 kao endotelnih markera, nađeno je da prosečne opšte mikrovaskularne gustine u malignim i benignim oboljenjima štitaste žlezde nisu značajno različite (259).

U jednoj od studija je pokazano da je mikrovaskularna gustina povećana u zonama sa solidnim obrascem i naglašenim ćelijskim pleomorfizmom unutar mikroinvazivnih folikularnih karcinoma, u poređenju sa folikularnim adenomima (260), ali neke studije su, pre iznenađujuće, pokazale da je redukovana mikrovaskularna gustina povezana sa slabijom diferencijacijom (261), lošijom prognozom i smanjenim preživljavanjem (173).

U jednoj od studija je pokazano da su rekurentni papilarni i folikularni tiroidni karcinomi imali značajno manje vrednosti opšte intratumoralne mikrovaskularne gustine u odnosu na folikularne adenome. Visoke vrednosti peritumoralne limfovaskularne gustine su nađene u rekurentnim papilarnim karcinomima. Jedan od zaključaka ove studije je bio i taj da visoka vaskularna gustina može biti marker za manje agresivne tumore, dok su visoke vrednosti peritumoralne limfovaskularne gustine marker za više agresivne i rekurenciji sklone tumore štitaste žlezde (262).

Nasuprot iznesenom, dve druge studije su demonstrirale povećan rizik za rekurenciju i kraće bez-bolesti preživljavanje u više prokrvljenim papilarnim tiroidnim karcinomima (263, 264).

Nalaz da viša stope vaskularizacije u mikroinvazivnom folikularnom karcinomu, naročito u blizini kapsule ili unutar tumora u zoni proboja kapsule, je u saglasnosti sa hipotezom da vaskularizacija može imati ulogu u širenju folikularnog tumora štitaste žlezde (260).

Različite grupe su koristile različite tehnike za kvantifikaciju mikrovaskularne gustine, koristeći različite endotelne markere (npr. F8, CD31, CD34) kao i različite pristupe, poput procene broja krvnih sudova u najgušćim zonama ("hot spots"), dok drugi to nisu. Specifičnost naše studije se ogleda u činjenici da je korišćena metoda tkivnog mikroniza, sa selekcijom intratumoralnih zona neposredno ispod kapsule, ili na invazivnom frontu, bez prethodnog osvrta na eventualne zone visoke mikrovaskularne gustine, čime se objektivno smanjuje pristrastnost u odnosu na izbor same zone u odnosu na entitete. Ova heterogenost u metodologiji mogla bi da objasni neke od oprečnih rezultata između navedenih studija i naše studije.

Jedan od bitnih nalaza naše studije koji proističe iz naše studije, je i precizno određivanje odsečnih vrednosti mikrovaskularne gustine, koje u dijagnostičkom algoritmu predstavljaju bitnu alatku za diskriminaciju benignih od malignih lezija porekla folikularnih ćelija. Kombinovanom upotrebom ovih vrednosti sa ekspresijom već proverenih markera, poput CD56, dobijaju se dosta visoke vrednosti za specifičnost koje idu čak do 97% za malignitet, što u dijagnostičkom smislu daje priličnu sigurnost patologu za postavljenje dijagnoze maligniteta u nejasnim slučajevima.

Tumorski indukovana limfangiogeneza je važan korak za limfogeno metastaziranje. Novoformirani limfatički sudovi su komponovani od jednog reda ćelija. Odsustvo bazalne membrane, čvrstih spojeva između ćelija, veliki broj potencijalnih lakuna (međućelijskih zjapova), su sve doprinoseći faktori za ulazak ćelija u limfatičke sudove. Limfangiogeneza i rezultujuća povećana limfatička mikrovaskularna gustina doprinose invaziji tumorskih ćelija u regionalne limfne noduse kroz limfatičke kapilare, i posledično pojavi limfogenih metastaza.

U studiji Gong L. i saradnika (2012) je pokazano da je limfatička mikrovaskularna gustina značajno veća u papilarnom karcinomu u odnosu na papilarnu hiperplaziju štitaste žlezde, kao i u papilarnom karcinomu sa limfogenim metastazama u odnosu na papilarni karcinom bez limfogenih metastaza(265).

U drugim studijama (266, 267) je nađeno da je intratumorska limfatička gustina veća u papilarnom karcinomu u odnosu na folikularni adenom, i veća u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u odnosu na folikularni adenom i folikularni karcinom (257).

Jedno interesantno zapaženje iz studije Giorgadze i saradnika (2005) je postojanje ostrvaca sa povećanim brojem limfatika, a koja se mogu identifikovati u zonama intraglandularnog širenja tumora daleko od glavne tumorske mase, i koja su jasno demarkirana u odnosu na netumorski parenhim štitaste žlezde koji je u potpunosti lišen limfatika (257).

U benignim i malignim folikularnim neoplazmama, limfatički sudovi si bili lokalizovani na periferiji lezije, u blizini ili unutar kapsule, i obično su bili odsutni unutar samog tumora, dok je u drugim histološkim grupama distribucija bila više dispergovana unutar uzorka (npr. medularni karcinom). Limfangiogeneza i ekspresija VEGF-C su povećani u papilarnom karcinomu koji je sklon da daje limfogene metastaze, i ovo bi mogao biti važan mehanizam koji objašnjava različito metastatsko ponašanje između papilarnog karcinoma i folikularnog karcinoma (266).

U jednoj od studija je pokazano da je limfovaskularna gustina, određena korišćenjem D2-40, statistički značajno veća u papilarnim karcinomima sa limfonodalnim metastazama u odnosu na papilarne karcinome bez limfonodalnih metastaza i tiroidne nodularne hiperplazije. Takođe, u ovoj studiji je korišćenjem multivarijantne analize

pokazano, da su ekspresija VEGF-C i ekstratiroidna tumorska propagacija nezavisni prediktori za limfonodalne metastaze (268).

U sličnoj studiji je pokazano da su peritumoralna i intratumoralna limfovaskularna gustina veće u grupi papilarnih carcinoma štitaste žlezde sa limfonodalnim metastazama u odnosu na grupu papilarnih carcinoma bez limfonodalnih metastaza. Takođe, u ovoj studiji je pokazano da veće vrednosti intratumoralne limfovaskularne gustine jako koreliraju sa prisustvom cervikalnih nodalnih metastaza, čineći intratumoralnu gustinu važnim pokazateljom tumorske agresivnosti (269).

Neki autori su prijavili jaku povezanost između povećane intratumoralne limfovaskularne gustine u papilarnom karcinomu štitaste žlezde i muškog pola, multifokalnosti oboljenja, invazivnosti i pojave metastaza (270, 271), što je pak u suprotnosti sa rezultatima drugih grupa koje nisu našle bilo kakvu povezanost između intratumoralne limfovaskularne gustine unutar papilarnog karcinoma i gore navedenih karakteristika (266,267).

U studiji Eloy i saradnika (2011) (272) u čak 92% slučajeva inkapsulirane folikularne varijante papilarnog karcinoma nije uočen ni jedan intratumorski D2-40 pozitivan limfni sud. Većina slučajeva (77%) infiltrativne folikularne varijante papilarnog karcinoma je imala intratumorske D2-40 pozitivne limfatičke sudove. Srednje vrednosti intratumoralne limfatičke mikrovaskularne gustine su bile statistički značajno više u klasičnom papilarnom karcinomu i infiltrativnoj folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma, u odnosu na inkapsuliranu folikularnu varijantu papilarnog karcinoma. Srednje vrednosti intratumoralne limfatičke mikrovaskularne gustine su značajno veće u papilarnim tumorima sa ekstratiroidnim širenjem, limfovaskularnom invazijom i limfonodalnim metastazama, u odnosu na one koji ne pokazuju navedene osobine.

D2-40 pozitivni limfni sudovi su češće bili locirani na periferiji tumora, naročito na invazivnom frontu infiltrativnih tumora, u odnosu na centralne delove tumora gde su retki.

Ostaje da se razjasni, da li odsustvo intratumoralnih D2-40 pozitivnih limfnih sudova u većini inkapsuliranih - folikularne varijante papilarnih carcinoma, kao i u većini tumora sa folikularnim obrascem, odražava nizak kapacitet limfangioneze kao prvog koraka tumorigeneze, ili je posledica njihovog nestanka, („mehanizam urušavanja”),

sekundarno zbog povećanog intratumoralnog pritiska, koji se javlja tokom razvoja inkapsuliranih tumora (272, 273).

U studiji Giorgadze i saradnika (2005) (257), nije pokazana razlika u vrednostima peritumoralne limfatičke mikrovaskularne gustine između papilarnog karcinoma, folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma, kao ni razlike između peri- i intratumoralne gustine za navedene entitete, dok su u studiji Garcia i saradnika (2010) (267) vrednosti peritumoralne limfovaskularne gustine uvek veće u odnosu na intratumoralne za navedene entitete. Dalje, u poslednje navedenoj studiji (Garcia et al 2010), pokazane su veće vrednosti intra-, i peritumoralne limfatičke mikrovaskularne gustine u folikularnom karcinomu u odnosu na folikularni adenom, kao i veće vrednosti peritumoralne limfatičke mikrovaskularne gustine u folikularnom karcinomu u odnosu na papilarni karcinom.

Chung i saradnici (2012), koristeći podoplanin kao marker za limfatike, nalaze da je peritumoralna limfatička mikrovaskularna gustina značajno veća u odnosu na intratumoralnu limfatičku gustinu u papilarnom mikrokarcinomu štitaste žlezde. Pacijenti sa visokom peritumoralnom limfatičkom mikrovaskularnom gustinom ($>8/x200$ polju uveličanja) imaju značajno veću stopu metastaza u vratu u odnosu na pacijente sa nižom limfatičkom mikrovaskularnom gustinom ($<8/x200$ polju uveličanja). Dalje, ova grupa nalazi da je peritumoralna limfatička mikrovaskularna gustina jedini značajan prediktor limfonodalnog metastaziranja (274).

Selekcija zona za tkivni mikroniz je učinjena uvidom u literaturne podatke (266, 272), iz kojih proizilazi da je gustina limfnih sudova najveća na periferiji tumora, bilo da je u pitanju supkapsularna regija ili invazivni front. Shodno navedenom, rezultati naše studije su donekle iznenađuju, jer čak u 66% slučajeva nije identifikovan ni jedan limfni sud. Ovaj rezultat donekle može da se uporedi sa rezultatima studije Eloy i saradnika (2011) (272). Dalje, pokazano je da ne postoji značajna razlika u limfovaskularnoj gustini između benignih i malignih lezija, kao ni između papilarnog karcinoma, folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma.

Rezultati, i posledično zaključci, su posledica ograničenja ove studije: tkivni mikroniz, selekcija polja za tkivni mikroniz bez prethodnog uvida u limfovaskularne gustine na celom preseku lezije, i odsustvo komparabilnih peritumoralnih polja integrisanih u tkivni mikroniz. Najbitniji zaključak, uzimajući u obzir ograničenja studije, je da se

limfovaskularna gustina ne može koristiti kao alatka u dijagnostičkom algoritmu za diferencijalnu dijagnozu nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija.

6. ZAKLJUČCI

Zaključci našeg istraživanja o značaju ekspresije markera neoangiogeneze u patohistološkoj dijagnozi nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija, su sledeći:

- Raspodela benignih i malignih lezija kod muškaraca i žena je slična (Pearson Chi-Square; $p=0.134$)
- Ne postoji značajna razlika u veličini benignih i malignih lezija ($p=0,719$).
- Prosečna starost pacijenata u grupi benignih lezija ($53,34\pm 13,42$) je viša nego u grupi sa malignim lezijama ($49,38\pm 14,33$), a uočena razlika je na granici statističke značajnosti ($p=0,051$).
- CITOKERATIN 19 (CK19)
 - Maligne lezije imaju višu ekspresiju CK19 u odnosu na benigne lezije ($p=.000$).
 - Ekspresija CK19 je viša u papilarnom karcinomu štitaste žlezde u odnosu na folikularni karcinom ($p=.000$), i u odnosu na folikularni adenom ($p=.000$).
 - CK19 je značajno više eksprimiran u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u usporedbi sa folikularnim karcinomom ($p=.004$), i u poređenju sa folikularnim adenom ($p=.000$).
 - Razlike u ekspresiji CK19 između folikularnih karcinoma i folikularnih adenoma nisu značajne ($p=1.00$).
 - Razlike u ekspresiji CK19 između adenoma Hirtleovih ćelija i karcinoma Hirtleovih ćelija nisu značajne ($p=.894$).
 - Senzitivnost i specifičnost CK19 za maligno u klasifikaciji lezija na benigne i maligne je 75% i 71% , respektivno, za lezije u kojima je više od 9,5% tumorskih ćelija pozitivno na CK19.
 - CK19 može da pomogne u dijagnostici papilarnog karcinoma, ali se moraju uzeti u obzir intenzitet i distribucija ekspresije unutar tumora.
 - Intenzivna imunoreaktivnost na CK19 uz izostanak kriterijuma za PTC, treba da alarmira na mogućnost postojanja maligniteta.
 - Zbog relativno niske specifičnosti ovog markera , preporučuje se upotreba ovog markera u kombinaciji sa drugim markerima.

- HBME-1
 - Maligne lezije imaju višu ekspresiju HBME-1 u odnosu na benigne lezije (p=.000).
 - Papilarni karcinom štitaste žlezde eksprimira više HBME-1 u odnosu na folikularni karcinom i folikularni adenom (p=.000, za oba poređenja).
 - Folikularna varijanta papilarnog karcinoma eksprimira više HBME-1 u odnosu na folikularni karcinom i folikularni adenom (p=.009; p=.000, respektivno).
 - Ne postoji razlika u ekspresiji HBME-1 između folikularnog adenoma i folikularnog karcinoma štitaste žlezde (p=1.00), kao ni između adenoma Hirtleovih ćelija i karcinoma Hirtleovih ćelija (p=.176)
 - Senzitivnost i specifičnost HBME-1 za maligno u klasifikaciji lezija na benigne i maligne je 75% i 82% , respektivno, za lezije u kojima je više od 7,5% tumorskih ćelija pozitivno na HBME-1.
 - HBME-1 je pouzdan marker za dijagnozu maligniteta štitaste žlezde.
 - Najizraženija ekspresija u grupi folikularnih lezija je prisutna u papilarnim karcinoma. Kombinovana ko-ekspresija ovog markera i CK19 je visoko specifična za papilarni karcinom u diferencijalnoj dijagnozi sa folikularnim adenomom.
- GALECTIN-3
 - Ekspresija Galectin-3 je viša u malignim u odnosu na benigne lezije (p=.000).
 - Ekspresija Galectin-3 je viša u papilarnom karcinomu štitaste žlezde, i folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma , u odnosu na folikularni adenom (p=.000; p=.001 , respektivno).
 - Ekspresija Galectin-3 je viša u folikularnom karcinomu u odnosu na folikularni adenom (p=0.043).
 - Ekspresija Galectin 3 je viša u karcinomu Hirtleovih ćelija u odnosu na ekspresiju u adenomu Hirtleovih ćelija (p=.041).

- Razlike u ekspresiji Galectin 3 između papilarnog karcinoma štitaste žlezde, kao i njegove folikularne varijante u usporedbi sa folikularnim karcinomom štitaste žlezde nisu značajne ($p=0.197$; $p=1.000$).
- Senzitivnost i specifičnost Galectin -3 za maligno u klasifikaciji lezija na benigne i maligne je 89% i 65% , respektivno, za lezije u kojima je više od 7,5% tumorskih ćelija pozitivno na Galectin 3.
- Galectin 3 je marker čija je ekspresija u svim malignim histološkim entitetima značajno veća u odnosu na benigne histološke paralele.
- Zbog niske specifičnosti Galectin 3 za malignitet, preporučuje se upotreba ovog markera u kombinaciji sa drugim markerima.
- CD56
 - Ekspresija CD56 je niža u malignim u odnosu na benigne lezije ($p=.000$).
 - Ekspresija CD56 je značajno manja u papilarnom karcinomu štitaste žlezde u poređenju sa folikularnim karcinomom i folikularnim adenomom štitaste žlezde ($p=.006$; $p=.000$; respektivno) .
 - U direktnoj usporedbi, ekspresija CD56 je značajno niža u folikularnom karcinomu u odnosu na folikularni adenom štitaste žlezde ($p=0.028$).
 - Ekspresija CD56 je značajno niža u folikularnoj varijanti papilarnog karcinoma u poređenju sa ekspresijom CD56 u folikularnom adenomu ($p=.000$).
 - Razlike u ekspresiji CD56 između folikularne varijante papilarnog karcinoma štitaste žlezde u usporedbi sa folikularnim karcinomom štitaste žlezde ($p=0.282$), kao i između adenoma Hirtleovih ćelija i karcinoma Hirtleovih ćelija ($p=.450$), nisu značajne.
 - Senzitivnost i specifičnost CD56 za maligno u klasifikaciji lezija na benigne i maligne je 58% i 92%, respektivno, za lezije u kojima je manje od 12.5% tumorskih ćelija pozitivno na CD56.
- DIJAGNOSTIČKA VALJANOST KOMBINACIJA MARKERA
 - Najveću vrednost senzitivnosti za malignitet ima kombinacija markera CK19/Galectin-3 (68.3%).
 - Najviše vrednosti specifičnosti za malignitet ima kombinacija CD56/HBME-1 (98.7%).

- Specifičnost za malignitet ne raste uvođenjem trećeg ili četvrtog markera pored dva navedena (CD56/HBME-1).
- Najoptimalniji odnos senzitivnosti i specifičnosti za maligne lezije pokazuje kombinacija Galectin-3/HBME-1 (64.8%, 92.4%, respektivo)
- CK19/Galectin-3 je kombinacija sa najpovoljnijim odnosom senzitivnosti i specifičnosti za papilarni karcinom u odnosu na folikularni adenom (70.1%, 96.3%, respektivo)
- U diferencijalno dijagnostičkom pogledu, gubitak ekspresije CD56 ima 100% specifičnost za folikularni karcinom u poređenju sa folikularnim adenomom.
- **MIKROVASKULARNA GUSTINA**
 - Prosečna vrednost broja krvnih sudova po milimetru kvadratnom u malignim lezijama je veća od prosečne vrednosti broja krvnih sudova po milimetru kvadratnom u benignim lezijama (p=.000).
 - Folikularna varijanta papilarnog carcinoma ima veću mikrovaskularnu gustinu u odnosu na folikularni adenom (p=.003).
 - Razlike u mikrovaskularnoj gustini između folikularnog adenoma i folikularnog carcinoma (p=.403), i folikularnog carcinoma i folikularne varijante papilarnog carcinoma (p=.834) nisu statistički značajne.
 - Karcinomom Hirtleovih ćelija ima veću mikrovaskularnu gustinu u odnosu na adenom Hirtleovih ćelija (p=.028).
 - Ukoliko lezija ima više od 177 krvnih sudova po milimetru kvadratnom preseka tumora, senzitivnost i specifičnost za malignitet su 71,31% i 73,42%, respektivno.
- **DIJAGNOSTIČKA VALJANOST KOMBINACIJE MIKROVASKULARNE GUSTINE KAO DIJAGNOSTIČKOG TESTA I DRUGIH MARKERA**
 - Uzimajući vrednosti mikrovaskularne gustine jednake ili veće od 177 ks/mm² kao pozitivnog testa, ako se ovaj test iskombinuje sa nekim od sledećih pozitivnih testova CD56, CK19, Galectin 3, HBME-1, dobija se da je test sa najvećom senzitivnosti za malignitet CD31-Galectin 3 (66%), a test sa najvećom specifičnosti za malignitet CD31-CD56 (97.47%).

- LIMFOVASKULARNA GUSTINA

- Limfatici su odsutni u najvećem broju tkivnih preseka (66% slučajeva), a u ostatku pregledanog materijala je prisutan veoma mali broj limfnih sudova po preseku (4-5 ls/mm²).
- Limfni sudovi su u 71% slučajeva veliki, nepravilnih ivica, zjapećeg lumena (otvoreni). U 29% slučajeva limfni sudovi su manji, reprezentovani sa nekoliko ćelija, ili linearni, sa neuočljivim ili fokalno otvorenim diskontinuiranim lumenom (linearni).
- Razlika u limfovaskularnoj gustini između benignih i malignih lezija nije statistički značajna.
- Razlike u gustini limfovaskularne mreže između papilarnog karcinoma, folikularnog karcinoma i folikularnog adenoma nisu značajne (p=0.690).
- Razlike u gustini limfovaskularne mreže između adenoma Hirtleovih ćelija i karcinom Hirtleovih ćelija nisu značajne (p=.709).
- Određivanje limfovaskularne gustine na uzorcima dobijenim sa invazivnog fronta , ili iz subkapsularne regije, integrisanim u tkivni mikroniz, nije od značaja u diferencijalnoj dijagnozi nodularnih lezija porekla folikularnih ćelija štitaste žlezde.

7. REFERENCE

- 1 Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med.* 2004;351:1764-1771
- 2 Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med.* 1994 Aug 22;154(16):1838-40
- 3 Gharib H, Papini E. Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007 Sep;36(3):707-35
- 4 Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med.* 1993 Feb 15;118(4):282-9.
- 5 Campanella P, Ianni F, Rota CA, Corsello SM, Pontecorvi A. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2014 Apr 10;170(5):R203-11.
- 6 Russ G, Leboulleux S, Leenhardt L, Hegedüs L. Thyroid Incidentalomas: Epidemiology, Risk Stratification with Ultrasound and Workup. *Eur Thyroid J* 2014;3:154-163
- 7 Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014
- 8 Nikola Slijepčević, V. Živaljević, I. Paunović, A. Diklić, S. Živković Perišić, D. Miljuš, A. Grgurević, S. Sipetić. Incidencija karcinoma štitaste žlezde u Srbiji posle 1999. godine. *Medicinski glasnik.* 2014, 19(52):61.
- 9 Baloch ZW, Livolsi VA. In: Mills SE ed. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology.* 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2009: 493-494.
- 10 Murray D. In: Kovacs KaA S, ed. *The thyroid gland.* Malden, MA: Blackwell Science, 1998:295-380.
- 11 Zampi G, Carcangiu ML, Rosai J: Thyroid tumor pathology. Proceedings of an international workshop, San Miniato, Italy, October 1984. *Semin Diagn Pathol* 1985; 2:87-146.(eds)

- 12 Shlossberg AH, Jacobson JC, Ibbertson HK: Serum thyroglobulin in the diagnosis and management of thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 1979; 10:17-27
- 13 Mizukami Y, Michigishi T, Nonomura A, Yokoyama K, Noguchi M, Hashimoto T, Nakamura S, Ishizaki T. Autonomously functioning (hot) nodule of the thyroid gland. A clinical and histopathologic study of 17 cases. *Am J Clin Pathol*. 1994;101(1):29-35
- 14 Harach HR, Sánchez SS, Williams ED. Pathology of the autonomously functioning (hot) thyroid nodule. *Ann Diagn Pathol*. 2002 Feb;6(1):10-9.
- 15 Thomas GA, Williams D, Williams ED. The clonal origin of thyroid nodules and adenomas. *Am J Pathol*. 1989 Jan;134(1):141-7
- 16 Namba H, Matsuo K, Fagin JA. Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors. *J Clin Invest*. 1990 Jul;86(1):120-5.
- 17 Volante M, Papotti M. A practical diagnostic approach to solid/trabecular nodules in the thyroid. *Endocr Pathol*. 2008 Summer;19(2):75-81.
- 18 Sapino A, Cassoni P, Papotti M, Bussolati G. Muscular cushions of the vessel wall at the periphery of thyroid nodules. *Mod Pathol*. 1999 Sep;12(9):879-84.
- 19 LiVolsi VA. *Surgical pathology of the thyroid*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1990
- 20 Mai KT, Landry DC, Thomas J, Burns BF, Commons AS, Yazdi HM, Odell PF. Follicular adenoma with papillary architecture: a lesion mimicking papillary thyroid carcinoma. *Histopathology*. 2001 Jul;39(1):25-32.
- 21 Cohen MB, Miller TR, Beckstead JH. Enzyme histochemistry and thyroid neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 1986;85(6):668-73
- 22 Miettinen M, Virtanen I. Expression of laminin in thyroid gland and thyroid tumors: an immunohistologic study. *Int J Cancer*. 1984 Jul 15;34(1):27-30.
- 23 Hazard JB, Kenyon R. Atypical adenoma of the thyroid. *Arch Pathol* 1954;58:554-63.
- 24 Gnepp DR, Ogorzalek JM, Heffess CS. Fat-containing lesions of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol*. 1989 Jul;13(7):605-12
- 25 Visonà A, Pea M, Bozzola L, Stracca-Pansa V, Meli S. Follicular adenoma of the thyroid gland with extensive chondroid metaplasia. *Histopathology*. 1991 ;18(3):278-9

- 26 Magro G, Benkova K, Michal M. Meningioma-like tumor of the thyroid: a previously undescribed variant of follicular adenoma. *Virchows Arch.* 2005 ;446(6):677-9
- 27 Koren R, Bernheim J, Schachter P, Schwartz A, Siegel A, Gal R: Black thyroid adenoma: clinical, histochemical, and ultrastructural features. *AIMM* 2000; 8:80-84.
- 28 Rothenberg HJ, Goellner JR, Carney JA: Prevalence and incidence of cytoplasmic yellow bodies in thyroid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:715-717
- 29 Gaffney RL, Carney JA, Sebo TJ, Erickson LA, Volante M, Papotti M, et al. Galectin-3 expression in hyalinizing trabecular tumors of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(4):494-8.
- 30 Katoh R, Jasani B, Williams ED: Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid. A report of three cases with immunohistochemical and ultrastructural studies. *Histopathology* 1989; 15:211-224
- 31 Del Sordo R, Sidoni A: MIB-1 cell membrane reactivity: a finding that should be interpreted carefully. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16:568
- 32 Galgano T, Mills SE, Stelow EB: Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid revisited: a histologic and immunohistochemical study of thyroid lesions with prominent trabecular architecture and sclerosis. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1269-1273.
- 33 Chan JK, Tse CCH, Chiu HS: Hyalinizing trabecular adenoma-like lesion in multinodular goitre. *Histopathology* 1990; 16:611-614
- 34 McCluggage WG, Sloan JM: Hyalinizing trabecular carcinoma of thyroid gland. *Histopathology* 1996; 28:357-362.
- 35 Salvatore G, Chiappetta G, Nikiforov YE, Decaussin-Petrucci M, Fusco A, Carney JA, Santoro M: Molecular profile of hyalinizing trabecular tumours of the thyroid: high prevalence of RET/PTC rearrangements and absence of B-raf and N-ras point mutations. *Eur J Cancer* 2005; 41:816-821
- 36 Li M, Rosai J, Carcangiu ML: Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid. A distinct tumor type or a pattern of growth? Evaluation of 28 cases [abstract]. *Mod Pathol* 1995; 8:54.

- 37 Cheung CC, Boerner SL, MacMillan CM, Ramyar L, Asa SL: Hyalinizing trabecular tumor of the thyroid: a variant of papillary carcinoma proved by molecular genetics. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:1622-1626
- 38 Carney JA, Ryan J, Goellner JR: Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 1987; 11:583-591
- 39 Carney JA, Hirokawa M, Lloyd RV, Papotti M, Sebo TJ: Hyalinizing trabecular tumors of the thyroid gland are almost all benign. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:1877-1889;
- 40 Nosé V, Volante M, Papotti M: Hyalinizing trabecular tumor of the thyroid: an update. *Endocr Pathol* 2008; 19:1-8.
- 41 Schlumberger MJ: Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1998; 338:297-306.
- 42 Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J: Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 1985; 55:805-828
- 43 Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J: Papillary thyroid carcinoma. A study of its many morphologic expressions and clinical correlates. *Pathol Annu* 1985; 20(Pt 1):1-44
- 44 Baloch ZW, LiVolsi VA: Etiology and significance of the 'optically clear nucleus. *Endo Pathol* 2002; 13:289-299.
- 45 Johannessen JV, Gould VE, Jao W: The fine structure of human thyroid cancer. *Hum Pathol* 1978; 9:385-400.
- 46
- Rezk S, Brynes RK, Nelson V, Thein M, Patwardhan N, Fischer A, Khan A: beta-catenin expression in thyroid follicular lesions: potential role in nuclear envelope changes in papillary carcinomas. *Endocr Pathol* 2004; 15:329-337
- 47 Batistatou A, Scopa CD: Pathogenesis and diagnostic significance of nuclear grooves in thyroid and other sites. *Int J Surg Pathol* 2009; 17:107-110
- 48 Kondo T, Nakazawa T, Murata S, Katoh R: Stromal elastosis in papillary thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 2005; 36:474-479;

- 49 Lee TK, Myers RT, Marshall RB, Bond MG, Kardon B: The significance of mitotic rate. A retrospective study of 127 thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 1985; 16:1042-1046.
- 50 Hunt JL, Barnes EL: Non-tumor-associated psammoma bodies in the thyroid. *Am J Clin Pathol* 2003; 119:90-94..
- 51 Vergilio JA, Baloch ZW, LiVolsi VA: Spindle cell metaplasia of the thyroid arising in association with papillary carcinoma and follicular adenoma. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:199-204.
- 52 Schröder S, Schwarz W, Rehpenning W, Loning T, Bocker W: Dendritic/Langerhans cells and prognosis in patients with papillary thyroid carcinomas. Immunocytochemical study of 106 thyroid neoplasms correlated to follow-up data. *Am J Clin Pathol* 1988; 89:295-300
- 53 Guiter GE, DeLellis RA: Multinucleate giant cells in papillary thyroid carcinoma. A morphologic and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:765-768
- 54 Katoh R, Sasaki J, Kurihara H, Suzuki K, Iida Y, Kawaoi A: Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. *Cancer* 1992; 70:1585-1590.
- 55 Beesley MF, McLaren KM: Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology* 2002; 41:236-243,
- 56 Bejarano PA, Nikiforov YE, Swenson ES, Biddinger PW: Thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in thyroid neoplasms. *AIMM* 2000; 8:189-194;
- 57 Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M, Ghossein R: Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol* 2008; 21:192-200;
- 58 Nishimura R, Yokose T, Mukai K: S-100 protein is a differentiation marker in thyroid carcinoma of follicular cell origin: an immunohistochemical study. *Pathol Int* 1997; 47:673-679;

- 59 Miettinen M, Kärkkäinen P: Differential reactivity of HBME-1 and CD15 antibodies in benign and malignant thyroid tumours. Preferential reactivity with malignant tumours. *Virchows Arch* 1996; 429:213-219.
- 60 Erickson LA, Yousef OM, Jin L, Lohse CM, Pankratz VS, Lloyd RV: p27kip1 expression distinguishes papillary hyperplasia in Graves' disease from papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2000; 13:1014-1019
- 61 Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ: Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 2002; 41:357-362
- 62 Nasr MR, Mukhopadhyay S, Zhang S, Katzenstein A-L: Immunohistochemical markers in diagnosis of papillary thyroid carcinoma: utility of HBME1 combined with CK19 immunostaining. *Mod Pathol* 2006; 19:1631-1637.
- 63 Klinck GH, Winship T: Occult sclerosing carcinoma of the thyroid. *Cancer* 1955; 8:701-706
- 64 Iida F, Sugeno A, Muramatsu A: Clinical and pathologic properties of small differentiated carcinomas of the thyroid gland. *World J Surg* 1991; 15:511-515
- 65
Hunt JL, LiVolsi VA, Baloch ZW, Barnes EL, Swalsky PA, Niehouse L, Finkels tein SD: Microscopic papillary thyroid carcinoma compared with clinical carcinomas by loss of heterozygosity mutational profile. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:159-166.
- 66 Yamamoto Y, Maeda T, Izumi K, Otsuka H: Occult papillary carcinoma of the thyroid. A study of 408 autopsy cases. *Cancer* 1990; 65:1173-1179
- 67 Ha ID, Grant CS, van Heerden JA, Goellner JR, Ebersold JR, Bergstralh EJ: Papillary thyroid microcarcinoma. A study of 535 cases observed in a 50-year period. *Surgery* 1992; 112:1139-1146
- 68 Williams ED: Guest editorial. Two proposals regarding the terminology of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 2000; 8:181-183.
- 69 Rosai J, LiVolsi AV, Sobrinho-Simões M, Williams ED: Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. *Int J Surg Pathol* 2003; 11:249-251
- 70 Evans HL: Encapsulated papillary neoplasms of the thyroid. A study of 14 cases followed for a minimum of 10 years. *Am J Surg Pathol* 1987; 11:592-597

- 71 Zidan J, Karen D, Stein M, Rosenblatt E, Basher W, Kuten A: Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 2003; 97:1181-1185
- 72 Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, Caudill CM, Lloyd RV: Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:1478-1484.
- 73
Lugli A, Terracciano LM, Oberholzer M, Bubendorf L, Tornillo L: Macrofollicular variant of papillary carcinoma of the thyroid: a histologic, cytologic, and immunohistochemical study of 3 cases and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:54-58
- 74 Ivanova R, Soares P, Castro P, Sobrinho-Simões M: Diffuse (or multinodular) follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of ten cases of an aggressive form of differentiated thyroid carcinoma. *Virchows Arch* 2002; 440:418-424
- 75 Baloch ZW, Livolsi VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol*. 2002 Jan;117(1):143-50
- 76 Baloch ZW, LiVolsi VA. Follicular-patterned afflictions of the thyroid gland: reappraisal of the most discussed entity in endocrine pathology. *Endocr Pathol*. 2014 Mar;25(1):12-20
- 77 Elsheikh TM, Asa SL, Chan JK, DeLellis RA, Heffess CS, LiVolsi VA, Wenig BM. Interobserver and intraobserver variation among experts in the diagnosis of thyroid follicular lesions with borderline nuclear features of papillary carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2008 Nov;130(5):736-44
- 78 Thompson LDR, Wieneke JA, Heffess CS: Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 22 cases. *Endocr Pathol* 2005; 16:331-348
- 79 Carcangiu ML, Bianchi S: Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. Clinicopathologic study of 15 cases. *Am J Surg Pathol* 1989; 13:1041-1049
- 80 Berho M, Suster S: The oncocytic variant of papillary carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 15 cases. *Hum Pathol* 1997; 28:47-53
- 81 Baloch ZW, LaVolsi VA: Warthin-like papillary carcinoma of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:1192-1195.

- 82 LiVolsi VA. Papillary carcinoma tall cell variant (TCV): a review. *Endocr Pathol*. 2010 Mar;21(1):12-5.
- 83 Ozaki O, Ito K, Mimura T, Sugino K, Hosoda Y: Papillary carcinoma of the thyroid: tall-cell variant with extensive lymphocyte infiltration. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:695-698
- 84 Ostrowski ML, Merino MJ: Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: a reassessment and immunohistochemical study with comparison to the usual type of papillary carcinoma of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:964-974
- 85 Gaertner EM, Davidson M, Wenig BM: The columnar cell variant of thyroid papillary carcinoma. Case report and discussion of an unusually aggressive thyroid papillary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1995; 19:940-947
- 86 Hirokawa M, Shimizu M, Fukuya T, Manabe T, Sonoo H: Columnar cell carcinoma of the thyroid: MIB-1 immunoreactivity as a prognostic factor. *Endocr Pathol* 1998; 9:31-34
- 87 Chen JH, Faquin WC, Lloyd RV, Nose V: Columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic, molecular and immunophenotypic study of nine cases with a review of the literature. *Mod Pathol* 2011; 24(5):739-49
- 88 Kameyama K, Mukai M, Takami H, Ito K: Cribriform–morular variant of papillary thyroid carcinoma: ultrastructural study and somatic/germline mutation analysis of the APC gene. *Ultrastruct Pathol* 2004; 28:97-102
- 89 Lovitch SB, Faquin W, Nose V: Cribriform–morular variant of thyroid carcinoma: distinct immunohistochemical profile from other papillary thyroid carcinoma variants. *Lab Invest* 2009; 89(Suppl.1):117A
- 90 Michal M, Chlumska A, Fakan F: Papillary carcinoma of the thyroid with exuberant nodule fasciitis-like stroma. *Histopathology* 1992; 21:577-579
- 91
Tang W, Kakudo K, Nakamura Y, Nakamura M, Mori I, Morita S, Miyauchi A: Parathyroid gland involvement by papillary carcinoma of the thyroid gland. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:1511-1514
- 92 Angeles-Angeles A, Chable-Montero F, Martinez-Benitez B, Albores-Saavedra J: Unusual metastases of papillary thyroid carcinoma: report of 2 cases. *Ann Diagn Pathol* 2009; 13:189-196

Pucci A, Suppo M, Lucchesi G, Celeste A, Viberti L, Pellerito R, Papotti M: Papillary thyroid carcinoma presenting as a solitary soft tissue arm metastasis in an elderly hyperthyroid patient. Case report and review of the literature. *Virchows Arch* 2006; 448:857-861

94 DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH: Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:414-424

95 Vini L, Hyer SL, Marshall J, A'Hern R, Harmer C: Long-term results in elderly patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 2003; 97:2736-2742

96 Boerner SL, Asa SL. *Biopsy Interpretation of the Thyroid*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010

97 Franssila KO, Ackerman LV, Brown CL, Hedinger CE: Follicular carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 1985; 2:101-122.

98 Giusiano-Courcambeck S, Denizot A, Secq V, De Micco C, Garcia S: Pure spindle cell follicular carcinoma of the thyroid. *Thyroid* 2008; 18:1023-1025

99 Cameselle-Teijeiro J, Pardal F, Eloy C, Ruiz-Ponte C, Celestino R, Castro P, Soares P, Sobrinho-Simões M: Follicular thyroid carcinoma with an unusual glomeruloid pattern of growth. *Hum Pathol* 2008; 39:1540-1547.

100 Kendall CH, Sanderson PR, Cope J, Talbot IC: Follicular thyroid tumours. A study of laminin and type IV collagen in basement membrane and endothelium. *J Clin Pathol* 1985; 38:1100-1105

101 Cho Mar K, Eimoto T, Nagaya S, Tateyama H: Cell proliferation marker MCM2, but not Ki67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid. *Histopathology* 2006; 48:801-807

102 Cho Mar K, Eimoto T, Tateyama H, Arai Y, Fujiyoshi Y, Hamaguchi M: Expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant follicular thyroid lesions. *Histopathology* 2006; 48:286-294

103 Chebib I, Opher E, Richardson ME: Vascular and capsular pseudoinvasion in thyroid neoplasms. *Int J Surg Pathol* 2009; 17:449-451

- 104 Fonseca E, Soares P, Cardoso-Oliveira M, Sobrinho-Simões M: Diagnostic criteria in well-differentiated thyroid carcinomas. *Endocr Pathol* 2006; 17:109-117
- 105 Heffess CS, Thompson LD: Minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *Endocr Pathol* 2001; 12:417-422
- 106 Thompson LD, Wieneke JA, Paal E, Frommelt RA, Adair CF, Heffess CS: A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature. *Cancer* 2001, 91(3):505–524.
- 107 Rosai J: Handling of thyroid follicular patterned lesions. *Endocr Pathol* 2005; 16:279-284
- 108
Tickoo SK, Pittas AG, Adler M, Fazzari M, Larson S, Robbins RJ, Rosai J: Bone metastases from thyroid carcinoma: a histopathologic study with clinical correlates. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:1440-1447
- 109 Quinn TR, Duncan LM, Zembowicz A, Faquin WC: Cutaneous metastases of follicular thyroid carcinoma: a report of four cases and a review of the literature. *Am J Dermatopathol* 2005; 27:306-312
- 110 Lang W, Choritz H, Hundeshagen H: Risk factors in follicular thyroid carcinomas. A retrospective follow-up study covering a 14-year period with emphasis on morphological findings. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:246-255
- 111 Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Hürthle cell tumours of the thyroid: a review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch.* 2000;437:107–115
- 112 Montone KT, Baloch ZW, LiVolsi VA. The thyroid Hürthle (oncocytic) cell and its associated pathologic conditions: a surgical pathology and cytopathology review. *Arch Pathol Lab Med.* 2008 Aug;132(8):1241-50
- 113 Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors. *Am J Pathol.* 2002;160:1857–1865
- 114
Santeusanio G, D'Alfonso V, Iafrate E, Colantoni A, Liberati F, Giusto SL, Gow

- n AM: Antibodies to cytokeratin 14 specifically identify oncocytes (Hürthle cells) in thyroid lesions and tumors. *Appl Immunohistochem* 1997; 5:223-228
- 115 Saull SC, Kimmelman CP. Hürthle cell tumors of the thyroid gland. *OtolaryngolHead Neck Surg*. 1985;93:58–62
- 116 Carcangiu ML. Hürthle cell carcinoma: clinic-pathological and biological aspects. *Tumori*. 2003;89:529–532.
- 117 Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal TZ, et al. Histopathological changes in thyroid tissue after fine needle aspiration biopsy. *Pathol Res Pract*. 2007;203:641–645
- 118 Bronner M, LiVolsi VA. Oxyphilic (Askenasy/Hürthle cell) tumors of the thyroid: microscopic features predict biologic behavior. *Surg Pathol*. 1988;1:137–1
- 119 Ghossein RA, Hiltzik DH, Carlson DL, et al. Prognostic factors of recurrence in encapsulated Hürthle cell carcinoma of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 50 cases. *Cancer*. 2006;106:1669–1676.
- 120 Watson RG, Brennan MD, Goellner JR, van Heerden JA, McConahey WM, Taylor WF. Invasive Hürthle cell carcinoma of the thyroid: natural history and management. *Mayo Clin Proc*. 1984;59:851–855.
- 121 Bhaije F, Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2011;22:126–33
- 122 Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu A, 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;63:1454–1457
- 123 Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12: 245–262.
- 124 Nikiforova MN Kimura ET, Gandhi M, 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;88:5399–5404
- 125 Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3603–3610.

- 126 Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Moneforte-Munoz H, Fagan JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants in radiation induced and sporadic papillary thyroid cancers in children. *Cancer Res* 1997;57:1690–1694
- 127 Ezzat S, Zheng L, Kolenda, et al. Prevalence of activating ras mutation in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid* 1996;6:409–416
- 128 Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):2318-26
- 129 Yip L, Nikiforova MN, Carty SE, et al. Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation. *Surgery* 2009;146:1215–1223
- 130 Lin KL, Wang O, Zhang X, et al. The BRAF mutation is predictive of aggressive clinicopathological characteristics in papillary thyroid microcarcinoma *Ann Surg Oncol* 2010;17:3294–3300
- 131 Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na^vI-targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:257–269
- 132 Soares P, Sobrinho-Simoes M. Cancer: small papillary thyroid cancers—is BRAF of prognostic value? *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:9–10.
- 133 Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS and RET/PTC mutation specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogen* 2005;24:6646–6656
- 134 Rivera M, Ricarte-Filho J, Knauf, et al. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. *Modern Pathology* 2010;23:1191–1200
- 135 Apel RL, Ezzat S, Bapat BV, et al. Clonality of thyroid nodules in sporadic goiter. *Diagn Mol Pathol.* 1995;4:113-121.

- 136 Kwaspen FH, Smedts FM, Broos A, Bulten H, Debie WM, Ramaekers FC. Reproducible and highly sensitive detection of the broad spectrum epithelial marker keratin 19 in routine cancer diagnosis. *Histopathology*. 1997;31(6):503–16
- 137 Jain R, Fischer S, Serra S, Chetty R. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(1):9–15
- 138 Zhu X, Sun T, Lu H, Zhou X, Lu Y, Cai X, Zhu X. Diagnostic significance of CK19, RET, galectin-3 and HBME-1 expression for papillary thyroid carcinoma. *J Clin Pathol*. 2010;63(9):786–9
- 139 de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira F, Assumpcao LVM, Matze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, Cytokeratin 19 and Galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*. 2005;47:391–401
- 140 Sethi K, Sarkar S, Das S, Mohanty B, Mandal M. Biomarkers for the diagnosis of thyroid cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2010;8(4): 341–52
- 141 Barut F, OnakKandemir N, Bektas S, Bahadir B, Keser S, Ozdamar SO. Universal markers of thyroid malignancies: galectin-3, HBME-1, and cytokeratin-19. *Endocr Pathol*. 2010;21(2):80–9
- 142 Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, Leffler H, Liu F-T, Lotan R, Mercurio AM, Monsigny M, Pillai S, Poirer F, Raz A, Rigby PWJ, Rini JM, Wang: Galectins: a family of animal betagalactoside-binding lectins. *Cell* 1994, 76:597–598
- 143 Liu FT, Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5:29–41
- 144 Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R (1995) Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 147:815–822
- 145 Takenaka Y, Fukumori T, Raz A: Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* 2004, 19:543–549
- 146 Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brule F: Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 2004, 23:7527–7536

- 147 Chiu CG, Strugnell SS, Griffith OL, Jones SJ, Gown AM, Walker B, Nabi IR, Wiseman SM. Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. *Am J Pathol.* 2010 ;176(5):2067-81
- 148 Casey MB, Lohse CM, Lloyd RV. Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3 and HBME-1. *Endocr Pathol.* 2003;14:55-60
- 149 Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, et al. Application of an immunodiagnostic method for improving pre-operative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet.* 2001;357:1644-1650
- 150 Sack MJ, Astengo-Osuna C, Lin BT, et al. HBME-1 immunostaining in thyroid fine needle aspirations: A useful marker in the diagnosis of carcinoma. *Mod Pathol.* 1997;10:668-674
- 151 Miettinen M, Karkkainen P. Differential HBME-1 reactivity in benign vs. malignant thyroid tissue is helpful in the diagnosis of thyroid tumors. [abstract] *Mod Pathol.* 1996;5:50A
- 152 Mase T, Funahashi H, Koshikawa T, Imai T, Nara Y, Tanaka Y, et al. HBME-1 immunostaining in thyroid tumors especially in follicular neoplasm. *Endocr J.* 2003;50(2):173-7.
- 153 Choi YL, Kim MK, Suh JW, Han J, Kim JH, Yang JH, et al. Immunoeexpression of HBME-1, high molecular weight cytokeratin, cytokeratin 19, thyroid transcription factor-1, and E-cadherin in thyroid carcinomas. *J Korean Med Sci.* 2005;20(5):853-9
- 154 El Demellawy D, Nasr AL, Babay S, Alowami S. Diagnostic utility of CD56 immunohistochemistry in papillary carcinoma of the thyroid. *Pathol Res Pract* 2009;205:303-9
- 155 Mokhtari M, Eftekhari M, Tahririan R. Absent CD56 expression in papillary thyroid carcinoma: A finding of potential diagnostic value in problematic cases of thyroid pathology. *J Res Med Sci.* 2013;18(12):1046-50
- 156 Huerta S, Srivatsan ES, Venkatesan N, Peters J, Moatamed F, Renner S, et al. Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. *Surgery.* 2001;130:834-43

- 157 Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli M, Sperti C, Roveroni G, et al. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res.* 1997;17:1227–30
- 158 Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol.* 2001;3:650–7
- 159 Scarpino S, Di Napoli A, Melotti F, Talerico C, Cancrini A, Ruco L. Papillary carcinoma of the thyroid: low expression of NCAM (CD56) is associated with downregulation of VEGF-D production by tumour cells. *J Pathol.* 2007;212(4):411-9
- 160 Kim JH, Kim YH, Han JH, Lee KB, Sheen SS, Lee J. Silencing of homeobox B9 is associated with down-regulation of CD56 and extrathyroidal extension of tumor in papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43:1221–8
- 161 Adair TH, Montani JP. *Angiogenesis.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53242>
- 162 Mc Donald DM, Choyke PL (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9:713–725
- 163 Baluk P, Hashizume H, Mc Donald DM (2005) Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15:102–111
- 164 Giatromanolaki A, Sivridis E, Minopoulos Get al (2002) Differential assessment of vascular survival ability and tumor angiogenic activity in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 8:1185–1191
- 165 Nagy JA, Chang SH, Shih SC et al (2010) Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36:321–331
- 166 Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB et al (2004) Pathology: cancer cells compress intratumoral vessels. *Nature* 427:695
- 167 Fukumura D, Duda DG, Munn LL et al (2010) Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation* 17:206–225
- 168 Hung CJ, Ginzinger DG, Zarnegar R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3694–3699

- 169 Turner HE, Harris AL, Melmed S, et al. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 2003;24:600–632
- 170 Kilicarslan AB, Ogun M, Arici C, et al. Clinical importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) for papillary thyroid carcinomas. *APMIS* 2003; 111:439–443
- 171 Klein M, Picard E, Vignaud JM, et al. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol* 1999;161:41–49
- 172 Fellmer PT, Sato K, Tanaka R, et al. Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Surgery* 1999;126:1056–1061
- 173 Akslen LA, Livolsi VA 2000 Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance. *Hum Pathol* 31:439–442
- 174 Goldenberg JD, Portugal LG, Wenig BL, et al. Well-differentiated thyroid carcinomas: p53 mutation status and microvessel density. *Head Neck* 1998;20: 152–158
- 175 Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol*. 2005;18(11):1490-7.
- 176 Garcia EA, Simões K, Wakamatsu A, Ressio RA, Alves VAF, Longatto-Filho A, Camargo RS. Lymphatic vessel density and VEGF-C expression are significantly different among benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol*. 2010; 21:101–107
- 177 Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10(1):1–6
- 178 Conway C, Dobson L, O’Grady A, Kay E, Costello S, O’Shea D. Virtual microscopy as an enabler of automated/quantitative assessment of protein expression in TMAs. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(3):447–63.
- 179 Al Kuraya K, Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for highthroughput molecular pathology. *Ann Saudi Med*. 2004;24(3):169–74
- 180 Bubendorf L. High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *Eur Urol*. 2001;40(2):231–8

- 181 Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003;3(4):421–30
- 182 Hewitt SM. The application of tissue microarrays in the validation of microarray results. *Methods Enzymol.* 2006;410:400–15
- 183 Watanabe A, Cornelison R, Hostetter G. Tissue microarrays: applications in genomic research. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):171–81
- 184 Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol.* 2003;56(4):198–204
- 185 de Jong D, Xie W, Rosenwald A, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications. *J Clin Pathol.* 2009;62(2):128–38
- 186 Fons G, Hasibuan SM, van der Velden J, ten Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium. *J Clin Pathol.* 2007;60(5):500–3
- 187 Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol.* 2008;26(34):5630–7
- 188 DeLellis: Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs, IARC Press, 2004
- 189 Rosai J, Ackerman LV. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 10th ed. Edinburgh ; New York: Mosby; 2011
- 190 Alshenawy HA. Utility of immunohistochemical markers in diagnosis of follicular cell derived thyroid lesions. *Pathol Oncol Res.* 2014 Oct;20(4):819-28
- 191 Nechifor-Boilă A, Cătană R, Loghin A, Radu TG, Borda A. Diagnostic value of HBME-1, CD56, Galectin-3 and Cytokeratin-19 in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumors of uncertain malignant potential. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55
- 192 Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A. HBME-1 expression in follicular tumor of the thyroid: an investigation of whether it can be used as a marker to diagnose follicular carcinoma. *Anticancer Res.* 2005 Jan-Feb;25(1A):179-82
- 193 Papotti M, Rodriguez J, De Pompa R, Bartolazzi A, Rosai J. Galectin-3 and HBME-1 expression in well-differentiated thyroid tumors with follicular architecture of uncertain malignant potential. *Mod Pathol.* 2005 Apr;18(4):541-6

- 194 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3;324(1):1-8
- 195 Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci.* 2007 Winter;37(1):39-48
- 196 Gong L, Chen P, Liu X, Han Y, Zhou Y, Zhang W, Li H, Li C, Xie J. Expressions of D2-40, CK19, galectin-3, VEGF and EGFR in papillary thyroid carcinoma. *Gland Surg.* 2012 May;1(1):25-32
- 197 Barroeta JE, Baloch ZW, Lal P, Pasha TL, Zhang PJ, LiVolsi VA. (2006) Diagnostic value of differential expression of CK19, Galectin-3, HBME-1, ERK, RET, and p16 in benign and malignant follicular-derived lesions of the thyroid: an immunohistochemical tissue microarray analysis. *Endocr Pathol* 17(3):225-34
- 198 Hong Z, Qi JP, Wang YW, Song YJ, Zhang ZY: Hyalinizing trabecular tumor and papillary carcinoma of the thyroid. *Chin Med J (Engl)* 2010, 123:2832–2835
- 199 Park YJ, Kwak SH, Kim DC, Kim H, Choe G, do Park J, Jang HC, Park SH, Cho BY, Park SY: Diagnostic value of galectin-3, HBME-1, cytokeratin 19, high molecular weight cytokeratin, cyclin D1 and p27(kip1) in the differential diagnosis of thyroid nodules. *J Korean Med Sci* 2007, 22:621–628
- 200 Scognamiglio T, Hyjek E, Kao J, Chen YT. Diagnostic usefulness of HBME1, galectin-3, CK19, and CITED1 and evaluation of their expression in encapsulated lesions with questionable features of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(5):700-8.
- 201 Nasr MR, Mukhopadhyay S, Zhang S, Katzenstein AL. Immunohistochemical markers in diagnosis of papillary thyroid carcinoma: Utility of HBME1 combined with CK19 immunostaining. *Mod Pathol.* 2006;19(12):1631-7
- 202 Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la Chapelle A, Kloos RT. (2005) Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 18(1):48-57

- 203 Cameron BR, Berean KW: Cytokeratin subtypes in thyroid tumours: immunohistochemical study with emphasis on the follicular variant of papillary carcinoma. *J Otolaryngol* 2003, 32:319–322
- 204 Liu YY, Morreau H, Kievit J, Romijn JA, Carrasco N, Smit JW. (2008) Combined immunostaining with galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, Hector Battifora mesothelial-1, cytokeratin-19, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , and sodium/iodide symporter antibodies for the differential diagnosis of non-medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 158(3):375-84
- 205 Erkilic S, Aydin A, Kocer NE. Diagnostic utility of cytokeratin 19 expression in multinodular goiter with papillary areas and papillary carcinoma of thyroid. *Endocr Pathol*. 2002;13(3):207-11
- 206 Sahoo S, Hoda SA, Rosai J, DeLellis RA. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution. *Am J Clin Pathol*. 2001;116(5):696-702
- 207 Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2001;14(4):338-42
- 208 Barut F, Onak Kandemir N, Bektas S, Bahadir B, Keser S, Ozdamar SO. (2010) Universal markers of thyroid malignancies: galectin-3, HBME-1, and cytokeratin-19. *Endocr Pathol* 21(2):80-9
- 209 Wiseman SM, Melck A, Masoudi H, Ghaidi F, Goldstein L, Gown A, et al. Molecular phenotyping of thyroid tumors identifies a marker panel for differentiated thyroid cancer diagnosis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(10):2811-26
- 210 Murphy KM, Chen F, Clark DP. Identification of immunohistochemical biomarkers for papillary thyroid carcinoma using gene expression profiling. *Hum Pathol*. 2008;39(3):420-6
- 211 Nakamura N, Erickson LA, Jin L, Kajita S, Zhang H, Qian X, et al. (2006) Immunohistochemical separation of follicular variant of papillary thyroid carcinoma from follicular adenoma. *Endocr Pathol* 17(3):213-23
- 212 Rossi ED, Raffaelli M, Mule A, Miraglia A, Lombardi CP, Vecchio FM, et al. Simultaneous immunohistochemical expression of HBME-1 and galectin-3 differentiates papillary carcinomas from hyperfunctioning lesions of the thyroid. *Histopathology*. 2006;48(7):795-800

- 213 Song Q, Wang D, Lou Y, Li C, Fang C, He X, et al. Diagnostic significance of CK19, TG, Ki67 and galectin-3 expression for papillary thyroid carcinoma in the northeastern region of China. *Diagn Pathol.* 2011;6:126
- 214 Beesley MF, McLaren KM. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology.* 2002;41(3):236-43
- 215 de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira Facuri F, Assumpcao LV, Metze K, Ward LS. (2005) Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*47(4):391-401
- 216 Jang MH, Jung KC, Min HS. The Diagnostic Usefulness of HMGA2, Survivin, CEACAM6, and SFN/14-3-3 delta in Follicular Thyroid Carcinoma. *J Pathol Transl Med.* 2015;49(2):112-7
- 217 Yassin FE. Diagnostic criteria of well differentiated thyroid tumor of uncertain malignant potential; a histomorphological and immunohistochemical appraisal. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2015
- 218 Paunovic I , T. Isic, M. Havelka, S. Tatic, D. Cvejic, S. Savin, Combined immuno-histochemistry for thyroid peroxidase, galectin-3, CK19 and HBME-1 indifferent diagnosis of thyroid tumors, *APMIS* 120 (May (5)) (2012) 368–379
- 219 Abd-El Raouf SM, Ibrahim TR. (2014) Immunohistochemical expression of HBME-1 and galectin-3 in the differential diagnosis of follicular-derived thyroid nodules. *Pathol Res Pract* 210(12):971-8
- 220 Guo Z, Hardin H, Montemayor-Garcia C, Asioli S, Righi A, Maletta F, et al. In Situ Hybridization Analysis of miR-146b-5p and miR-21 in Thyroid Nodules: Diagnostic Implications. *Endocr Pathol.* 2015. [Epub ahead of print]
- 221 Mai KT, Bokhary R, Yazdi HM, Thomas J, Commons AS. Reduced HBME-1 immunoreactivity of papillary thyroid carcinoma and papillary thyroid carcinoma-related neoplastic lesions with Hurthle cell and/or apocrine-like changes. *Histopathology.* 2002;40(2):133-42.
- 222 Liang HS, Zhong YH, Luo ZJ, Huang Y, Lin HD, Luo M, et al. Comparative analysis of protein expression in differentiated thyroid tumours: a multicentre study. *J Int Med Res.* 2009;37(3):927-38.

- 223 Volante M, Bozzalla-Cassione F, DePompa R, Saggiorato E, Bartolazzi A, Orlandi F, et al. (2004) Galectin-3 and HBME-1 expression in oncocytic cell tumors of the thyroid. *Virchows Arch* 445(2):183-8
- 224 Martins L, Matsuo SE, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CU, Kimura ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(10):4806-10.
- 225 Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R, Johnson SJ, Wilson JA, Davies BR, Lennard TW. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 2004; 45: 493-500.
- 226 Inohara H, Segawa T, Miyauchi A, Yoshii T, Nakahara S, Raz A, et al. Cytoplasmic and serum galectin-3 in diagnosis of thyroid malignancies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(3):605-10.
- 227 Aiad HA, Kandil MA, Asaad NY, El-Kased AM, El-Goday SF. Galectin-3 immunostaining in cytological and histopathological diagnosis of thyroid lesions. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2008;20(1):36-46.
- 228 Sapio MR, Guerra A, Posca D, Limone PP, Deandrea M, Motta M, et al. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(4):1089-97.
- 229 Nascimento MC, Bisi H, Alves VA, Longatto-Filho A, Kanamura CT, Medeiros-Neto G. Differential reactivity for galectin-3 in Hurthle cell adenomas and carcinomas. *Endocr Pathol*. 2001;12(3):275-9.
- 230 Galusca B, Dumollard JM, Lassandre S, Niveleau A, Prades JM, Estour B, et al. Global DNA methylation evaluation: potential complementary marker in differential diagnosis of thyroid neoplasia. *Virchows Arch*. 2005;447(1):18-23.
- 231 Nucera C, Mazzon E, Caillou B, Violi MA, Moleti M, Priolo C, et al. Human galectin-3 immunoexpression in thyroid follicular adenomas with cell atypia. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(2):106-12.
- 232 Weber KB, Shroyer KR, Heinz DE, Nawaz S, Said MS, Haugen BR. The use of a combination of galectin-3 and thyroid peroxidase for the diagnosis and prognosis of thyroid cancer. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(4):524-31.

- 233 Torres-Cabala C, Panizo-Santos A, Krutzsch HC, Barazi H, Namba M, Sakaguchi M, et al. Differential expression of S100C in thyroid lesions. *Int J Surg Pathol*. 2004;12(2):107-15.
- 234 Lavra L, Rinaldo C, Ulivieri A, Luciani E, Fidanza P, Giacomelli L, et al. The loss of the p53 activator HIPK2 is responsible for galectin-3 overexpression in well differentiated thyroid carcinomas. *PLoS One*. 2011;6(6):e20665.
- 235 Kovacs RB, Foldes J, Winkler G, Bodo M, Sapi Z. The investigation of galectin-3 in diseases of the thyroid gland. *Eur J Endocrinol*. 2003;149(5):449-53.
- 236 Jakubiak-Wielganowicz M, Kubiak R, Sygut J, Pomorski L, Kordek R. Usefulness of galectin-3 immunohistochemistry in differential diagnosis between thyroid follicular carcinoma and follicular adenoma. *Pol J Pathol*. 2003;54(2):111-5.
- 237 Giannini R, Faviana P, Cavinato T, Elisei R, Pacini F, Berti P, et al. Galectin-3 and oncofetal-fibronectin expression in thyroid neoplasia as assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunochemistry in cytologic and pathologic specimens. *Thyroid*. 2003;13(8):765-70.
- 238 Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology*. 2002;40(1):80-7.
- 239 Manivannan P, Siddaraju N, Jatiya L, Verma SK. Role of pro-angiogenic marker galectin-3 in follicular neoplasms of thyroid. *Indian J Biochem Biophys*. 2012;49(5):392-4.
- 240 El Demellawy D, Nasr AL, Babay S, Alowami S. Diagnostic utility of CD56 immunohistochemistry in papillary carcinoma of the thyroid. *Pathol Res Pract*. 2009;205(5):303-9.
- 241 Park WY, Jeong SM, Lee JH, Kang HJ, Sin DH, Choi KU, et al. Diagnostic value of decreased expression of CD56 protein in papillary carcinoma of the thyroid gland. *Basic and Applied Pathology*. 2009;2:63-8
- 242 Shahebrahimi K, Madani SH, Fazaeli AR, Khazaei S, Kanani M, Keshavarz A. Diagnostic value of CD56 and nm23 markers in papillary thyroid carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013;56(1):2-5

- 243 Abd El Atti RM, Shash LS. Potential diagnostic utility of CD56 and claudin-1 in papillary thyroid carcinoma and solitary follicular thyroid nodules. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2012;24(4):175-84.
- 244 Mi KS, Jeong WK, Young S J. CD56 and High Molecular Weight Cytokeratin as Diagnostic Markers of Papillary Thyroid Carcinoma. *The Korean Journal of Pathology* 2011;45(5): 477-484
- 245 Ceyran AB, Şenol S, Şimşek BÇ, Sağiroğlu J, Aydın A. Role of cd56 and e-cadherin expression in the differential diagnosis of papillary thyroid carcinoma and suspected follicular-patterned lesions of the thyroid: the prognostic importance of e-cadherin. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(4):3670-80.
- 246 Ma H, Xu S, Yan J, Zhang C, Qin S, Wang X, Li N. The value of tumor markers in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma alone and in combination. *Pol J Pathol.* 2014;65(3):202-9
- 247 Etem H, Özekinci S, Mizrak B, Şentürk S. The Role of CD56, HBME-1, and p63 in Follicular Neoplasms of the Thyroid. *Turk J Pathol.* 2010; 26(3): 238-242.
- 248 Satoh F, Umemura S, Yasuda M, Osamura RY. Neuroendocrine marker expression in thyroid epithelial tumors. *Endocr Pathol.* 2001;12(3):291-9.
- 249 Nechifor-Boila A, Borda A, Sassolas G, Hafdi-Nejjari Z, Borson-Chazot F, Lifante JC, et al. Immunohistochemical markers in the diagnosis of papillary thyroid carcinomas: The promising role of combined immunostaining using HBME-1 and CD56. *Pathol Res Pract.* 2013;209(9):585-92
- 250 Mi KS, Jeong WK, Young S J. CD56 and High Molecular Weight Cytokeratin as Diagnostic Markers of Papillary Thyroid Carcinoma. *The Korean Journal of Pathology* 2011;45(5): 477-484.
- 251 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J 1991 Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1–8
- 252 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G 1992 Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84:1875–1887
- 253 Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW 1995 Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 87:1603–1612.

- 254 Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, Nomura T, Ohkubo S, Yamamoto Y, Yamamoto S. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002 May;8(5):1125-31.
- 255 N Garcia de la Torre, I Buley, J A H Wass, H E Turner. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocrine-Related Cancer* (2006) 13 931–944
- 256 Celano M, Sponziello M, Tallini G, Maggisano V, Bruno R, Dima M, Di Oto E, Redler A, Durante C, Sacco R, Filetti S, Russo D. Increased expression of pro-angiogenic factors and vascularization in thyroid hyperfunctioning adenomas with and without TSH receptor activating mutations. *Endocrine*. 2013 Feb;43(1):147-53.
- 257 Giorgadze TA, Baloch ZW, Pasha T, Zhang PJ, LiVolsi VA (2005) Lymphatic and blood vessel density in the follicular patterned lesions of thyroid. *Mod Pathol* 18:1424–1431.
- 259 Ala'eddin Jebreel, James England, Karen Bedford, Justin Murphy, Laszlo Karsai, Stephen Atkin. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. *Int. J. Exp. Path.* (2007), 88, 271–277
- 260 Segal K, Shpitzer T, Feinmesser M, Stern Y, Feinmesser R 1996 Angiogenesis in follicular tumors of the thyroid. *J Surg Oncol* 63:95–98
- 261 Herrmann G, Schumm-Draeger PM, Muller C, Atai E, Wenzel B, Fabian T, Usadel KH, Hubner K 1994 T lymphocytes, CD68- positive cells and vascularisation in thyroid carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 120:651–656
- 262 Hakala T , Sand J, Kellokumpu-Lehtinen PL, Huhtala H, Leinonen R, Kholová I. Recurrent thyroid cancers have more peritumoural lymphatic vasculature than nonrecurrent thyroid cancers. *Eur J Clin Invest*. 2014 Sep;44(9):825-32
- 263 Ishiwata T, Iino Y, Takei H, Oyama T, Morishita Y 1998 Tumor angiogenesis as an independent prognostic indicator in human papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep* 5:1343–1348; Dhar DK, Kubota H, Kotoh T, Tabara H, Watanabe R, Tachibana M, Kohno H, Nagasue N 1998 Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg* 176:442–447

- 264 Dhar DK, Kubota H, Kotoh T, Tabara H, Watanabe R, Tachibana M, Kohno H, Nagasue N 1998 Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg* 176:442–447
- 265 Lei Gong, Ping Chen, Xianjun Liu, Ying Han, Yanping Zhou, Weidong Zhang, Hong Li, Chuanjia Li, Jiang Xie. Expressions of D2-40, CK19, galectin-3, VEGF and EGFR in papillary thyroid carcinoma. *Gland Surgery* 2012;1(1):25-32
- 266 De la Torre NA, Buley I, Wass JAH, Turner HE (2006) Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behavior. *Endocr Relat Cancer* 13:931–944
- 267 Garcia EA, Simoes K, Wakamatsu A, et al. Lymphatic vessel density and VEGF-C expression are significantly different among benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol* 2010;21: 101-7
- 268 Lee SH, Lee SJ, Jin SM, Lee NH, Kim DH, Chae SW, Sohn JH, Kim WS. Relationships between Lymph Node Metastasis and Expression of CD31, D2-40, and Vascular Endothelial Growth Factors A and C in Papillary Thyroid Cancer. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* Vol. 5, No. 3: 150-155, 2012
- 269 Choi Y, Park KJ, Ryu S, Kim DH, Yun J, Kang DK, Chun M. Papillary thyroid carcinoma involving cervical neck lymph nodes: correlations with lymphangiogenesis and ultrasound features. *Endocr J.* 2012;59(10):941-8.
- 270 Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ (2003) Intratumoural lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otorinol Head Neck Surg* 129:716–719;
- 271 Liang QC, Wei QY, Fan SQ (2006) Expression of VEGF-C and angiogenesis, and lymphangiogenesis in papillary thyroid carcinoma. *Zhong Nan Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 31:414–416, 419
- 272 C. Eloy , J. Santos, P. Soares , M. Sobrinho-Simões. Intratumoural lymph vessel density is related to presence of lymph node metastases and separates encapsulated from infiltrative papillary thyroid carcinoma. *Virchows Arch* (2011) 459:595–605
- 273 Jain RK, Fenton BT (2002) Intratumoural lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* 94:417–421.

274 Chung MK, Kim JH, Ko YH, Son YI. Correlation of lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor with nodal metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. *Head Neck*. 2012 Jun;34(6):846-51.

8. BIOGRAFIJA

- Dr Duško Dunđerović rođen je 1979. godine Sarajevu.
- Medicinski fakultet u Beogradu upisao je školske 1998/99. godine, a diplomirao 2005. godine sa prosečnom ocenom 8.94.
- Obavio je lekarski staž i položio stručni ispit 2006. godine.
- Poslediplomske studije (akademske specijalističke studije iz Citologije, histohemije, elektronske mikroskopije i embriologije) upisao školske 2006/2007. godine i odbranio završni akademski specijalistički rad na temu: „Ćelijski adhezioni proteini i njihov značaj u oboljenjima, sa posebnim osvrtom na aterosklerozu“, u Beogradu 2009. godine, pred komisijom u sastavu: prof. dr Marija Havelka- Đuković, predsednik, prof. dr Svetislav Tatić i prof. dr Vesna Lačković, mentor.
- U zvanje Saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Patologija izabran je 2007. godine u Beogradu (2007.-2009.).
- Doktorske studije – smer molekularna medicina, upisao školske 2008/2009. godine.
- Specijalizaciju iz Patološke anatomije upisao 2008 godine, a specijalistički ispit položio 2012. godine na Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu, pred komisijom u sastavu: Prof. dr Jasmina Marković Lipkovski, predsednik, Prof. dr Svetislav Tatić, Doc. dr Dejan Oprić, sa odličnim uspehom.
- U zvanju Asistenta za užu naučnu oblast Patologija bio u periodu od 2009. do 2015. godine.
- Užu specijalizaciju iz oblasti Klinička patologija upisao 2015. godine.
- Zaključno sa 2015. godinom, ima 8 publikovanih radova u celini koji su objavljeni u časopisima sa recenzijom, od kojih je u jednom prvi autor.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Duško Dunderović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Značaj ekspresije markera neoangiogeneze u patohistološkoj dijagnozi nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Duško Dunderović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Duško Dunderović

Broj upisa _____

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada Značaj c-erbB2 i HER2/neu markera neoangiogeneze u patohistološkoj dijagnostici nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija

Mentor Prof. dr Svetislav Tatić

Potpisani _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Duško Dunderović

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Značaj ekspresije markera neoangiogeneze u patohistološkoj dijagnozi nodularnih lezija štitaste žlezde porekla folikularnih ćelija“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, _____

Potpis doktoranda

