

Povezanost V600E mutacije gena BRAF s kliničkim i patohistološkim obilježjima agresivnosti papilarnog karcinoma štitnjače

Klasić, Franko

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:106749>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Franko Klasić

**Povezanost V600E mutacije gena *BRAF* s
kliničkim i patohistološkim obilježjima
agresivnosti papilarnog karcinoma štitnjače**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Franko Klasić

**Association of V600E mutations in *BRAF*
gene with aggressive clinical and
pathohistological features of papillary
thyroid carcinoma**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Za provođenje istraživanja korištena je oprema nabavljena kroz infrastrukturni znanstveni projekt „Modernizacija i proširenje znanstveno-istraživačke djelatnosti Kliničkog zavoda za kemiju pri KBC Sestre milosrdnice“ (KK.01.1.1.02-0014) Europskoga fonda za regionalni razvoj.

Ovaj rad je izrađen u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu pod mentorstvom Izv. prof. dr. sc. Ivana Šamije, te komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

POSVETA

Mojem bratu Maxu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Povezanost V600E mutacije gena *BRAF* s kliničkim i patohistološkim obilježjima agresivnosti papilarnog karcinoma štitnjače

Franko Klasić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Pojavnost papilarnog karcinoma štitnjače (PKŠ) u zadnjim desetljećima se povećava. Otkrivanje molekularnih biljega povezanih s agresivnošću i lošijom prognozom bolesti mogli bi pomoći u liječenju bolesnika s PKŠ. Mutacija *BRAF* V600E najčešća je mutacija detektirana u PKŠ i čini više od 95% svih mutacija u genu *BRAF*. Prisutnost ove mutacije rezultira konstitutivnom aktivnošću Braf kinaze koja dovodi do stalne aktivacije MAPK signalnog puta. Istraživanja do sada pokazuju različite rezultate vezano za prognostičku vrijednost detektirane mutacije *BRAF* V600E i njene povezanosti s patohistološkim obilježjima PKŠ. Cilj rada bio je odrediti prisutnost mutacije *BRAF* V600E u uzorcima PKŠ (n=263) pacijenata te ispitati povezanost između prisutnosti mutacije i patohistoloških obilježja tumora. Prema dobivenim rezultatima pokazano je kako ne postoji statistički značajna povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF* V600E i stupnja proširenosti bolesti i ispitivanih patohistoloških obilježja. Statistički značajna povezanost pronađena je između stupnja proširenosti bolesti i promjera tumora ($p < 0,001$) i između starije životne dobi pacijenata i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E ($p < 0,001$).

Ključne riječi: tumor, onkogen, prognoza, metastaze
(58 stranica, 12 slika, 12 tablica, 106 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivan Šamija
Komentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc.

Izv. prof. dr. sc. (prije imena nastavnika navesti njihove titule)

Prof. dr. sc.

Rad prihvaćen: (navesti datum sjednice Povjerenstva za diplomske radove na kojoj je rad prihvaćen)

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Association of V600E mutations in *BRAF* gene with aggressive clinical and pathohistological features of papillary thyroid carcinoma

Franko Klasić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The incidence of papillary thyroid cancer (PTC) is increasing in the last decades. Detection of the molecular markers associated with poor prognosis of the disease can help patients with PTC. *BRAF* V600E is the most common mutation detected in PTC patients and accounts for more than 95% of mutations in *BRAF* gene. This mutation results in constitutive activation of Braf kinase and constitutively activated MAPK signaling pathway. Studies show conflicting results regarding the prognostic value of the *BRAF* V600E mutation and its association with disease dissemination and pathohistological features of the PTC. The aim of this study was to detect mutation *BRAF* V600E in patients (N=263) with PTC and to examine the association between the presence of the mutation and the pathohistological features of the tumor. Based on the results, it was shown that there is no statistically significant association between the presence of the *BRAF* V600E mutation and the degree of disease dissemination and the examined pathohistological features. A statistically significant association was found between the disease dissemination and tumor diameter ($p < 0.001$) and between older age of patients and the presence of *BRAF* V600E mutation ($p < 0.001$).

Keywords: tumor, oncogene, prognosis, metastases
(58 pages, 12 figures, 12 tables, 106 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. Ivan Šamija, PhD
Co-mentor: prof. Nada Oršolić, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. , PhD
Assoc. Prof. , PhD
Prof. , PhD

Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Karcinomi štitnjače.....	1
1.1.1. Faktori rizika i etiologija bolesti.....	2
1.1.2. Patohistološka obilježja papilarnog karcinoma štitnjače.....	3
1.1.3. Dijagnostika i liječenje papilarnog karcinoma štitnjače.....	4
1.2. Genske promjene u raku.....	6
1.2.1. Signalni put RAS/RAF/MAPK	7
1.2.1.1. Struktura i funkcija signalnog puta Ras-Raf-MEK-ERK.....	7
1.2.1.2. Signalni put Ras-Raf-MEK-ERK u karcinogenezi.....	11
1.2.1.2.1. Ras-Raf-MEK-ERK signalni put u karcinogenezi raka štitnjače.....	13
1.2.1.2.2. Mutacije <i>BRAF</i> u papilarnom karcinomu štitnjače.....	15
1.2.1.2.3. Klinički i prognostički značaj <i>BRAF</i> V600E mutacije.....	17
2. Cilj istraživanja	20
3. Materijali i metode	21
3.1. Ispitanici.....	21
3.2. Priprema tumorskog tkiva štitnjače.....	22
3.3. Izolacija dna.....	22
3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	24
3.5. Analiza rezultata reakcije qPCR.....	25
3.6. Statističke metode.....	26
4. Rezultati	27
4.1. Karakteristike bolesnika.....	27
4.2. Povezanost stupnja proširenosti bolesti i prisutnosti mutacije <i>BRAF</i> V600E.....	29
4.3. Povezanost prisutnosti mutacije <i>BRAF</i> V600E sa spolom i dobi bolesnika.....	31
4.4. Povezanost patohistoloških obilježja tumora i prisutnosti mutacije <i>BRAF</i> V600E.....	33
5. Rasprava	40
6. Zaključak	45
7. Literatura	46
8. Životopis	58

1. Uvod

1.1. Karcinomi štitnjače

Karcinomi štitnjače najčešći su maligni tumori endokrinog sustava (Zheng i sur. 2013). Karcinomi štitnjače sve su češći te je njihova učestalost porasla u posljednjih 30 godina za gotovo 300%. Tumori štitnjače disproporcionalno se češće javljaju kod žena te je omjer oboljelih žena u odnosu na muškarce 3:1 (Seib i Sosa 2019). Također, tumori štitnjače su najčešći tumori adolescenata i populacije mlađe od 40 godina u SAD-u (Boucai i sur. 2024). Iako su tumori štitnjače sve češći, prognoza je za većinu pacijenata jako dobra i očekivani životni vijek nakon uspješnog liječenja pacijenata se ne smanjuje u odnosu na ostatak populacije (Shank i sur. 2022). Postotak preživljenja gledajući sve tipove tumora štitnjače 5 godina nakon postavljanja dijagnoze iznosi 98,1%, no kada se radi o lokaliziranom tumoru koji nije metastazirao ta brojka raste na čak 99,9% dok petogodišnje preživljenje kod metastaziralog tumora pada na 55,5% (Seib i Sosa 2019). Papilarni karcinom štitnjače (PKŠ) najčešći je tip karcinoma štitnjače (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Prepoznavanje i određivanje podtipa karcinoma štitnjače bitno je za određivanje terapijskog pristupa i daljnju prognozu. Najčešći tipovi karcinomi štitnjače su: papilarni, folikularni, medularni i anaplastični karcinom štitnjače. U dobro diferencirane karcinome štitnjače ubrajamo folikularni i PKŠ, ovi tipovi tumora štitnjače ujedno su i najčešći i čine gotovo 90% svih dijagnosticiranih tipova tumora štitnjače (Bhattacharya i sur. 2023). Puno rjeđi tipovi karcinoma štitnjače koji se pojavljuju su oni agresivniji, to su anaplastični karcinom štitnjače (koji čini oko 1% dijagnosticiranih slučajeva) koji ubrajamo u slabo diferencirane karcinome štitnjače koji se razvija iz diferenciranog karcinoma štitnjače nakupljanjem mutacija u tumoru. Iako je pojavnost ovog tipa tumora štitnjače niska, od ovog tipa tumora umire gotovo 19,9% pacijenata od ukupnog broja umrlih pacijenata od raka štitnjače. Također, relativno rijedak tip koji se pojavljuje i čini otprilike 4% svih dijagnoza je medularni karcinom štitnjače koji se razvija iz parafolikularnih stanica C (Boucai i sur. 2024). Razumijevanje fiziologije bolesti važno je za pravovremeno dijagnosticiranje i liječenje, a kao faktori rizika prepoznati su povećana izloženost ionizirajućem zračenju, autoimune bolesti, obiteljski i nasljedni tipovi tumora štitnjače te genske mutacije koje dovode do prekomjerne aktivacije signalnog puta mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK), poput mutacija u genima *RET*, *RAS* i *BRAF* (Bogović Crnčić i sur. 2020).

1.1.1. Faktori rizika i etiologija bolesti

Iako većinu bolesnika očekuje jako dobra prognoza, važno je identificirati faktore rizika za razvoj tumora štitnjače kako bi se moglo raditi na prevenciji. Tijekom godina došlo je do porasta u broju novodijagnosticiranih slučajeva (Lim i sur. 2017) no smrtnost kod pacijenata oboljelih od raka štitnjače polako opada. Ovaj fenomen može se pripisati sve ranijem i češćem otkrivanju bolesti, čak i onih oblika koji ne bi izazvali opasnu kliničku sliku, moguće zbog čestih ultrazvučnih pregleda štitnjače i preventivnih pregleda (Li i sur. 2020). Također, prisutnost čvorova u štitnjači je zabilježenu u 30-50% populacije u starijoj životnoj dobi, te je također čest pronalazak malignih čvorova tijekom pregleda i dijagnostike drugih bolesti (Liu i sur. 2017).

Izloženost ionizirajućem zračenju jedan je od najvećih faktora rizika za razvoj raka štitnjače. Zbog položaja štitnjače na prednjoj strani vrata zračenje može uzrokovati lomove DNA molekule i uzrokovati mutacije u stanicama što je direktno povezano s nastankom bilo kojeg tipa raka. Također, štitnjača je specifično radiosenzitivna u mlađoj životnoj dobi te je dokazano kako nakon akutne izloženosti zračenju, poput izloženosti nakon katastrofe u nuklearnoj elektrani u Černobilu, dolazi do povećane pojavnosti raka štitnjače u djece. Također, akutna izloženost u dobi prije 20 godine života dovodi do povećanog rizika za razvoj tumora štitnjače koji traje čak 50 godina nakon izloženosti (Liu i sur. 2017). Dijagnostički ili medicinski postupci koji koriste ionizirajuće zračenje ili radioaktivne tvari također mogu utjecati na razvoj raka štitnjače (Han i Kim 2018). Tumori štitnjače koji nastaju kao posljedica izloženosti zračenju imaju specifične promjene koje uključuju nekoliko kromosomskih aberacija koje su karakteristične i za druge tumore uzrokovane zračenjem, no takvi tumori rijetko imaju točkaste mutacije u genu *BRAF* i *RAS*, koje su često prisutne u tumorima štitnjače (Bogović Crnčić i sur. 2020).

Autoimune bolesti također pogađaju sve veći broj populacije, a pojavnost Hashimotovog tireoiditisa i Gravesove bolesti, autoimunih bolesti koje specifično pogađaju štitnjaču, u posljednjim desetljećima je narasla. Nekoliko mehanizama u patogenezi autoimunih bolesti štitnjače povezano je s razvojem tumora. Povišene razine tiroidnog stimulirajućeg hormona (TSH) kod pacijenata s hipotireozom mogu stimulirati prekomjernu proliferaciju epitelnih stanica. Autoimuni tireoiditis karakterizira lučenje brojnih proupalnih citokina i povećanje oksidativnog stresa u stanicama što je također povezano s karcinogenezom (Liu i sur. 2017). Iako neka

istraživanja ne pokazuju direktnu poveznicu između postojanja povećanog rizika za razvoj PKŠ-a ukoliko osoba ima Hashimotov tireoiditis, postoje sličnosti u citologiji stanica i profilu imunobiljega kod ovih stanja (Bogović Crnčić i sur. 2020).

Pretilost i povećani indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*) povezani su s brojnim patologijama. Pretile osobe imaju povećan rizik za razvoj malignih bolesti u odnosu na osobe normalne tjelesne mase. Povećani rizik za razvoj PKŠ-a kod osoba s povišenim BMI dokazan je samo kod muškaraca, drugih poveznica nema (Bogović Crnčić i sur. 2020). Mehanizmi koji bi mogli povezivati nastanak raka štitnjače s pretilošću uključuju inzulinsku rezistenciju i povećane koncentracije TSH (Liu i sur. 2017).

1.1.2. Patohistološka obilježja papilarnog karcinoma štitnjače

Većinu pacijenata s PKŠ očekuje dobra prognoza, jer je tijek bolesti uglavnom usporeniji te se metastaze rijetko pojavljuju dalje od regionalnih limfnih čvorova. S obzirom da ovaj podtip bolesti čini čak 80% svih slučajeva karcinoma štitnjače, pokušava se pronaći biljege koji bi mogli ukazati na to koji će pacijenti razviti teži, agresivniji oblik bolesti. Iako su takvi pacijenti relativno rijetki, do sada postoje različiti podaci o tome koji genski ili patohistološki biljega mogu predvidjeti tijek i stadij bolesti (Metovic i sur. 2023). S obzirom na postojanje velikog broja podtipova PKŠ, njih oko 15, pet podtipova se izdvajaju kao najagresivniji, a to su visokostanični podtip, solidni podtip, difuzni sklerozirajući podtip, podtip cilindričnih stanica i hobnail podtip (Coca-Pelaz i sur. 2020). Ovi podtipovi su karakterizirani kao agresivniji na temelju povezanosti s pojavom metastaza, recidivom bolesti i ekstratiroidnom invazijom (Hu i sur. 2021).

Izgled i obilježja papilarnog karcinoma dosta variraju. Papilarni karcinom štitnjače nastaje iz folikularnih stanica štitnjače (Radu i sur. 2015). Tumorske stanice najčešće poprimaju kockasti ili izduženi oblik, jezgre su također promijenjene a karakterizira ih veći volumen i ovalni oblik s manje gustim kromatinom (LiVolsi 2011). Tumori su najčešće čvrsti, bijele boje te inkapsulirani (Hu i sur. 2021). U tumorskom tkivu može biti prisutna kalcifikacija, a veličina primarnog tumora najčešće varira od čega je prosječna veličina tumora 2-3 cm u promjeru (Limaie i sur. 2024). Također, podvarijante su karakterizirane na temelju specifičnih uzoraka rasta stanica, promjena u stromi i tipu stanica (Shin 2017). Papilarni mikrokarcinomi također se sve češće otkrivaju. U mikrokarcinome ubrajamo tumore koji su u svom promjenu manji od 1 cm (Sugitani i sur. 2010).

Također, takvi mikrokarcinomi su najčešće neagresivni te ne pokazuju tendenciju metastaziranja i invazije (Walczyk i sur. 2014) te se pokušavaju spriječiti nepotrebni kirurški postupci u liječenju mikrokarcinoma koji ne predstavljaju prijetnju za zdravlje, već se pokušava staviti naglasak na praćenje pacijenta i njegove kliničke slike te interveniranje ukoliko postoji indikacija (Krajewska i sur. 2020). Morfološki vidljive promjene u stanicama papilarnog karcinoma štitnjače uključuju nastanak papilarnih struktura i promjene u jezgri. Nastale papile te njihova struktura i sastav mogu biti različitog izgleda (Limaiem i sur. 2024). Također česta je prisutnost cisti različitih veličina. Prisutnost regionalnih metastaza u području vrata je česta pojava zabilježena u oko 50% pacijenata, dok je prisutnost udaljenih metastaza izvan područja regije vrata dosta rijetka i zabilježena je u oko 5-7% slučajeva papilarnog karcinoma (LiVolsi 2011).

1.1.3. Dijagnostika i liječenje papilarnog karcinoma štitnjače

Broj novodijagnosticiranih pacijenata u nekim državama doživio je velik porast u posljednja tri desetljeća. Smatra se kako povećani broj preventivnih pregleda dovodi do velikog broja novootkrivenih slučajeva od kojih neki ne predstavljaju rizik za zdravlje pacijenta što dovodi do pretjeranog dijagnosticiranja. Tako je rak štitnjače postao najčešće dijagnosticirani tip raka u Južnoj Koreji (Ahn i sur. 2014). Također većina novodijagnosticiranih tumora koji su u svojem promjeru manji od 1 cm ne utječu na kvalitetu života, zdravlje, niti očekivanu duljinu života (Jensen i sur. 2020). Ovakav porast u broju novootkrivenih slučajeva može se također povezati s povećanim korištenjem ultrazvučnih pregleda i biopsija (Haugen i sur. 2016).

Aspiracija tankom iglom najčešće predstavlja jednu od prvih metoda koja se koristi u postavljanju dijagnoze PKŠ. Uzorak dobiven ovim tipom biopsije sadrži stanice koje se zatim analiziraju kako bi se dokazalo postojanje maligno transformiranih stanica (Limaiem i sur. 2024). Ovaj oblik dijagnostike smatra se najpreciznijim za postavljanje dijagnoze, ali je za postavljanje ispravne dijagnoze nužna stručnost citopatologa koji pregledava uzorke (Park i sur. 2020). Dijagnoza PKŠ se primarno postavlja na temelju morfologije jezgara koje su dobivene biopsijom (Limaiem i sur. 2024). Također, preporuča se da svi čvorovi pronađeni na štitnjači drugim dijagnostičkim metodama veći od 1 cm budu pregledani citološki, uzimanjem uzoraka aspiracijom tankom iglom kako bi se utvrdila malignost čvora (Haugen i sur. 2016). Ukoliko se biopsijom utvrdi da je suspektni čvor maligni određuje se daljnji tijek liječenja ukoliko je potrebno, a

negativni rezultati dobiveni aspiracijom važni su kako ne bi došlo do nepotrebne potpune ili djelomične tireoidektomije (Feldkamp i sur. 2016).

Kada je riječ o PKŠ i tehnikama oslikavanja, klinički se najčešće koristi ultrazvučna dijagnostika, ali se mogu koristiti i druge tehnike poput magnetske rezonance, kompjuterizirane tomografije (CT, engl. *computed tomography*) i pozitronske emisijske tomografije (PET/CT, engl. *positron emission computed tomography*). Također, ultrazvučna dijagnostika bitna je za pravilno obavljanje aspiracije tankom iglom (Limaiem i sur. 2024). Za otkrivanje promjena u štitnjači primarno se koristi ultrazvučna dijagnostika. Također kod prisutnosti limfadenopatije cervikalnih limfnih čvorova ultrazvučna dijagnostika nužna je za određivanje daljnjih dijagnostičkih postupaka (Schmidbauer i sur. 2017). Ultrazvuk je jednostavna i brza metoda koja ne koristi štetno ionizirajuće zračenje (Wong i Ahuja 2005). Zbog svog neinvazivnog karaktera ultrazvuk se koristi i za aktivno praćenje pacijenata s mikrokarcinomima tijekom vremena kako bi se pratila progresija i potencijalni rast tumora (Ghai i sur. 2021). Ultrazvučno je moguće i odrediti brojne karakteristike bitne kao kriteriji za postavljanje dijagnoze poput veličine lezije, ehogenosti, prisutnost kalcifikacije, pravilnosti rubova lezije i njene vaskularizacije (Feldkamp i sur. 2016).

Dijagnostička metoda koja se koristi radi određivanje stupnja proširenosti bolesti ili njenog povratak je scintigrafija štitnjače. Scintigrafija je tehnika oslikavanje u nuklearnoj medicini koja se bazira na unosu i akumulaciji radioaktivnog izotopa tehnicija (^{99m}Tc) ili joda (^{131}I) u stanicama štitnjače. Stanice štitnjače na svojoj površini eksprimiraju Na/I simporter koji dovodi do nakupljanja radioaktivnih izotopa u samoj stanici. Također ova metoda za razliku od drugih pruža uvid u fiziološko stanje segmenata štitnjače i stanica (Intenzo i sur. 2012). Ova metoda ima važnu ulogu i u postoperativnom praćenje pacijenata i detektiranju udaljenih metastaza u tijelu i kirurški neotklonjenih dijelova štitnjače (Campenni i sur. 2010).

Liječenje se primarno temelji na kirurškom uklanjanju štitnjače, bilo potpunom ili djelomičnom. Odluka o tireoidektomiji donesi se na temelju karakteristika bolesti poput veličine tumora, prisutnosti metastaza, prisutnosti ekstratireoidne invazije, smještaja tumora i drugih (Cabanillas i sur. 2015). Ukoliko je tumor unifoklan i u promjeru manji od 4cm bez ekstratireoidne invazije i metastaza u limfnim čvorovima preporuča se djelomično tireoidektomija, dok je za tumore veće od 4 cm preporuka potpuna tireoidektomija. Nakon uklanjanja štitnjače pacijenti ostaju na doživotnoj hormonskoj terapiji (Limaiem i sur. 2024). Također, za otkrivene

mikrokarcinome preporuča se praćenje pacijenata kroz određeni vremenski period i interveniranje ukoliko dođe do rasta ili druge indikacije (Feldkamp i sur. 2016). Terapijski pristup uključuje i ablativnu terapiju radioaktivnim izotopom joda ^{131}I . Terapija se koristi kako bi se uništio ostatak tkiva štitnjače ili tumora nakon tireoidektomije (Kloos 2005). Radioaktivni jod može se koristiti i za uništavanje metastatskog tkiva tumora štitnjače i oslikavanje radi pronalaska metastaza (Cabanillas i sur. 2015). Ovaj oblik terapije najčešće se započinje od 4 do 6 tjedana nakon tireoidektomije te je prikaldan za pacijente čiji je tumor veći od 2 cm u promjeru te su prisutne udaljene metastaze ili metastaze u limfnim čvorovima, pacijent je stariji od 45 godina ili je prisutna ekstratireoidna invazija. Također, ovaj tip liječenja indiciran je u pacijenata čiji je tumor manji od 2 cm, ali su prisutne udaljene metastaze (Limaiem i sur. 2024). Iako je liječenje PKŠ dosta uspješno, naglasak se stavlja na procjeni koristi i štete od liječenja te praćenju pacijenata i započinjanje terapije tek kada je to potrebno i kada korist nadvlada potencijalne rizike liječenja.

1.2. Genske promjene u raku

Mutacije i kromosomske promjene glavni su pokretač transformacije zdravih stanica u stanice raka. Molekularna tipizacija i otkrivanje specifičnih mutacija za određeni tip raka može imati značajnu ulogu u razumijevanju patofiziologije bolesti i imati veliku ulogu u otkrivanju ciljanih terapijskih pristupa (Abdullah i sur. 2019). Brojna istraživanja na razini genoma pružaju uvid u unutarstanične procese, gene i mutacije koje su povezane s malignom transformacijom stanica (Kebebew i sur. 2007). Nekoliko promjena na razini DNA je uključeno u nastanak raka štitnjače, najčešće su prisutne točkaste mutacije u ključnim genima te rearanžmani kromosoma odgovorni za nastanak fuzijskih proteina. Aktivirajuće mutacije igraju važnu ulogu u nastanku i progresiji raka. Većina karcinoma štitnjače je sporadična i nastaju kao posljedica nakupljanja mutacija u stanicama tijekom života. Također, većina genetskih promjena koje se javljaju u raku štitnjače su nenasljedne odnosno somatske mutacije (Hlozek i sur. 2022).

Signalni putevi unutar stanica imaju važnu ulogu u kontroli staničnih procesa poput diferencijacije, rasta i preživljavanja, ali reguliraju i gotovo sve druge stanične procese (Tang i Xue 2017). Razvoj raka uključuje nakupljanje nekoliko promjena na razini genoma i epigenoma koje pokreću promijenjene stanične procese i očituju se kao nastanak tumorskih stanica (Lea i sur. 2007). Upravo promijene u evolucijski značajnim staničnim signalnim putevima poput MAPK

puteva mogu dovesti do nastanka patoloških stanja, pa tako i raka. Također, promijene u signalnim putevima uključene su i procese koje tumorima omogućuju preživljenje i izbjegavanje imunosnog odgovora, ali i otpornost na lijekove korištene u liječenju raka (Tang i Xue 2017).

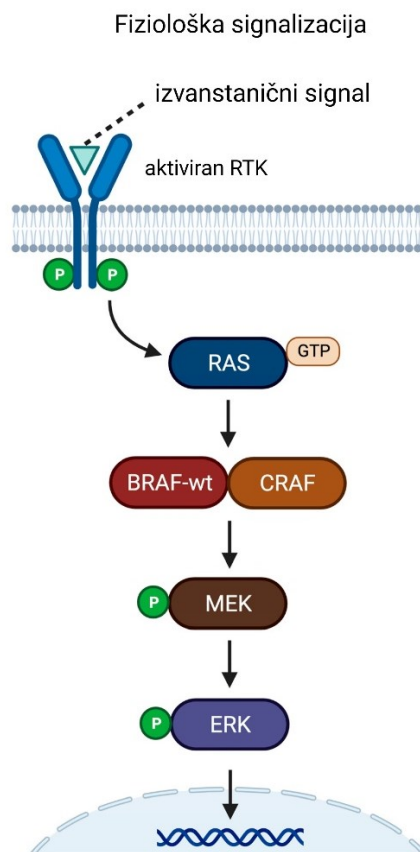
1.2.1. Signalni put RAS/RAF/MAPK

Eukariotske stanice koriste evolucijski visokokonzervirane signalne puteve koji uključuju mitogenima aktivirane proteinske kinaze (MAPK) za regulaciju brojnih staničnih procesa poput transkripcije gena, preživljavanja, diferencijacije, mitoze i metabolizma (Cargenllo i Roux 2011). U porodicu MAPK ubraja se oko 20 proteinskih kinaza. MAPK signalni putovi mogu se podijeliti u 4 glavna puta s obzirom na aktivaciju svakog signalnog puta od strane vanjskog podražaja koji aktivira svoj specifični membranski receptor. To su izvanstaničnim signalom regulirane kinaze (ERK, engl. *extracellular signal-regulated kinases*), c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), p38 i ERK5 (Tang i Xue 2017). Stanični signalni putevi koji uključuju MAPK sudjeluju u amplifikaciji i provođenju signala kako bi došlo do specifičnog odgovora stanice na vanjski podražaj (Zhang i Liu 2002).

1.2.1.1. Struktura i funkcija signalnog puta Ras-Raf-MEK-ERK

S obzirom na dosadašnja saznanja ERK je jedna od najbolje opisanih molekula MAPK, a signalni put Ras-Raf-MEK-ERK jedan je od najbolje opisanih signalnih puteva koji uključuju MAPK molekule (Zhang i Liu 2002). Aktivacija ovog signalnog puta može biti pokrenuta preko brojnih molekula ili fizioloških promjena, uključujući različite faktore rasta poput epidermalnog faktora rasta (EGF, engl. *epidermal growth factor*), trombocitnog faktora rasta (PDGF, engl. *platelet-derived growth factor*) i faktora rasta živaca (NGF, engl. *nerve growth factor*), citokine, promijene u organizaciji mikrotubula i promjene u osmotskoj ravnoteži u stanici (Cargenllo i Roux 2011). Ovaj signalni put također se može aktivirati preko receptora spregnutih s G-proteinima, gdje se smatra kako stimulacija receptora spregnutih s G-proteinima može dovesti do fosforilacije tirozina na unutarstaničnom djelu tirozin kinaznog receptora (npr. receptora za neki faktor rasta) i tako dovesti do aktivacije signalnog puta Ras-Raf-MEK-ERK (Zhang i Liu 2002).

Prijenos signala sastoji se od nekoliko koraka. Uključuje aktivatorski protein, MAPK kinazu kinaze (MAPKKK), MAPK kinazu (MAPKK) i MAPK. U Ras-Raf-MEK-ERK signalnom putu Ras djeluje kao aktivatorski protein, Raf djeluje kao MAPKKK, MEK djeluje kao MAPKK a ERK kao MAPK (Guo i sur. 2020). Za aktivaciju signalnog puta mora doći do vezanja liganda na transmembranski tirozin kinazni receptor nakon čega dolazi do njihove dimerizacije, aktivacije i autofosforilacije tirozina u unutarstaničnom djelu receptora (Slika 1). Takva promjena omogućava vezanje proteina koja sadrže Src homolognu regiju 2 (SH2) ili fosfotirozin vezujuću domenu (PTB, engl. *phosphotyrosine-binding domain*) na unutarstanične fosforilirane tirozinske ostatke tirozin kinaznih receptora (Cargenllo i Roux 2011). Na to se mjesto direktno veže konektorska molekula Grb2 (engl. *growth factor receptor-binding protein 2*) sa svojom centralnom SH2 domenom, koje se zatim povezuje sa SOS (engl. *son of sevenless*) molekulom preko svoje Src homologne regije 3 (SH3) domene te zajedno tvore kompleks receptor-Grb2-SOS. (Guo i sur. 2020). Također, povezivanje Grb2 proteina za aktivirani tirozin kinazni receptor dovodi do nakupljanja GAB1 i CBL (engl. *Casitas B-lineage Lymphoma*) proteina. Ovi proteini imaju ulogu u povezivanju različitih molekula poput PI3K (engl. *phosphoinositide 3-kinase*) što dovodi do međusobnih interakcija različitih signalnih puteva. Nastanak kompleksa receptor-Grb2-SOS ključan je za daljnju aktivaciju Ras proteina (Pudewell i sur. 2021).



Slika 1. Shematski prikaz signalnog puta Ras-Ras-MEK-ERK. Shema prikazuje vezanje liganda na receptor koji ima tirozin kinaznu funkciju. Signal se prenosi s receptora na Ras proteine pa sve do ERK kinaza koje zatim mogu migrirati u jezgu i fosforilirati supstrate poput transkripcijski faktora i utjecati na ekspresiju gena (Preuzeto i prilagođeno prema Liu i Xie 2023).

Ljudski genom sadrži tri gena koji kodiraju Ras proteine, a to su *KRAS*, *NRAS* i *HRAS*. *NRAS* i *KRAS* kodiraju po jedan protein dok modifikacijom RNA molekule gena *KRAS* mogu nastati dva različita proteina KRAS4A i KRAS4B, što ukupno daje 4 različita proteina (Hobbs i sur. 2016). Ras protein je po svojoj funkciji mali G-protein koji je ponajviše lokaliziran uz staničnu membranu (Prior i Hancock 2012). Ras protein se u citoplazmi pojavljuje u neaktivnom obliku kao protein na koji je vezana molekula GDP, a nastali kompleks receptor-Grb2-SOS, s aktivnim SOS potiče zamjenu GDP-a GTP-om što omogućuje aktivaciju Ras proteina i njegovu direktnu interakciju s slijedećim faktorom u kaskadi, Raf proteinom (Cargenllo i Roux 2011). Aktivnost Ras proteina na koji je vezana molekula GTP dokida se pomoću GTP-aznih aktivirajućih proteina koji hidrolizom GTP-a u GDP dovode do inaktivacije proteina Ras (Hobbs i sur. 2016).

Nekoliko mehanizama je poznato koji omogućuju povezivanje i stabilizaciju proteina Ras-Raf. Galektin 1 se u obliku homodimera veže na kompleks HRas-Braf i stabilizira aktivirani Ras s vezanim GTP-om, galektin 3 selektivno veže KRasB4 izoformu proteina i dovodi do grupiranja i pojačanog provođenja signala. SHOC2 protein dovodi do povezivanja aktiviranih proteina Ras i Raf, a SHOC2 u heterotrimernom kompleksu zajedno s proteinima PP1 (engl. *protein phosphatase 1*) i N-Ras dovodi do defosforilacije CR2 (engl. *conserved region 2*) domene neaktivnog Raf proteina (Pudewell i sur. 2021). Enzimatsku aktivnost Raf-a ne omogućuje interakcija Raf-a s aktiviranim Ras-om direktno, nego do aktiviranja dolazi zbog promijene lokalizacije samog proteina unutar stanice. Citoplazmatski Raf se premješta i smješta uz staničnu membranu što je ključan korak u aktivaciji Raf kinaze. Prvo dolazi do povezivanja Ras vezujuće domene (RBD, engl. *Ras-binding domain*) proteina Raf i RAS proteina, no za potpunu aktivaciju Raf-a potrebna je interakcija domene RBD i cisteinom bogate domene (CRD, engl. *cistein rich domain*) proteina Raf i s Ras-om ali i s fosfatidil serinom u staničnoj membrani (Terell i Morrison 2019).

U stanicama čovjeka postoje tri gena koja kodiraju proteine iz porodice Raf; *ARAF*, *BARF* i *CRAF*. Iako su sva tri proteina dosta slična svojom strukturom njihova mogućnost aktivacije MEK-a i ekspresija u tkivima se dosta razlikuju (Dhillon i sur. 2007). Raf proteini su po svojoj funkciji serin/treonin kinaze i igraju važnu ulogu u kontroli stanične proliferacije. Tri izoforme proteina dijele evolucijski očuvani N- terminalni kraj s domenama RBD i CRD te C- terminalnu kinaznu domenu. Nakupljanjem Raf kinaza uz staničnu membranu dolazi do dimerizacije kinaznih domena Raf proteina i njihove potpune aktivacije (Zhang i sur. 2021). Raf proteini mogu stvarati homodimere ili heterodimere s drugim kinazama iz porodice Raf, te je pokazano kako heterodimeri B-Raf/C-Raf imaju najveću katalitičku aktivnost te se najčešće pojavljuju u signalizaciji u koju je uključen i Ras protein (Terell i Morrison 2019). Tako aktivirani Raf ima mogućnost fosforilacije sljedećeg proteina u nizu odnosno MEK. Od tri izoforme proteina Raf, A-Raf ima najslabiju kinaznu aktivnost dok B-Raf pokazuje najснаžniju kinaznu aktivnost te ujedno i najveću stopu mutacija (Guo i sur. 2020). Nakon prenošenja signala inaktivacija kinaze Raf nužna je kako bi se izbjegla karcinogeneza u stanici. Taj proces najčešće se odvija defosforilacijom aktivnog mjesta kinaze Raf pomoću protein fosfataze 5 (PP5, engl. *protein phosphatase 5*). Također postoji i mogućnost autofosforilacije kinaze Raf gdje dolazi do njene inaktivacije. Mehanizam negativne povratne sprege također je uključen u inaktivaciju kinaze Raf. Kinaze MEK nakon aktivacije fosforiliraju kinaze Raf i dovode do promjena u interakciji proteina Raf i Ras i ometaju ključnu

dimerizaciju kinaza Raf što posljedično dokida njihovu funkciju i onemogućuje daljnji prijenos signala u stanici (Terrell i Morrison 2019).

Aktivirana kinaza Raf ima sposobnost vezanja i fosforilacije serinskih ostataka proteina MEK1 i MEK2, što dovodi do njihove aktivacije. MEK1/2 su dvojno specifične kinaze koje imaju centralnu ulogu u staničnoj signalizaciji te sudjeluju u različitim fiziološkim procesima unutar stanice. Imaju mogućnost fosforilacije i tirozinskih i treoninskih ostataka što ih čini ključnim u brojnim staničnim putevima. Aktivirani MEK1/2 stupaju u direktnu interakciju sa sljedećim proteinom u signalnom putu, odnosno ERK-om. Svojom N- terminalnom regijom kataliziraju fosforilaciju tirozina i treonina u regijama ERK proteina i aktiviraju ih. Inaktivirani ERK nalazi se u citoplazmi, no nakon aktivacije koja uključuje fosforilaciju od strane MEK1/2 proteina i homolognu dimerizaciju, ERK odlazi u jezgru gdje vrši svoju funkciju (Guo i sur. 2020).

ERK1/2 imaju sposobnost fosforiliranja velikog broja supstrata bilo u citoplazmi ili jezgri (Song i sur. 2023). Proteini ERK imaju bitnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije te su bitni za prelazak stanice iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Također, djeluju na brojne transkripcijske faktore u jezgri poput Elk-1. Stabilizacijom proteina c-Fos fosforilacijom, pomažu kod povezivanja transkripcijskih faktora c-Fos i c-Jun kako bi nastao transkripcijski kompleks AP-1 bitan za poticanje ekspresije ciklina D1 koji potiče prijelaz iz faze G1 u S fazu staničnog ciklusa (Cargenllo i Roux 2011). Upravo zbog ključne uloge pozitivnog regulatora progresije kroz stanični ciklus, nekontrolirana ERK aktivacija često je prisutna u brojnim patološkim stanjima koja uključuju nekontroliranu proliferaciju stanica (Tang i Xue 2017). Naizgled linearan slijed aktivacije ovog signalnog puta može se činiti jednostavnim, no taj je proces u stanicama puno složeniji. Amplifikacija signala događa se na način da svaka molekula aktivira veći broj molekula koje se nalaza nizvodno od nje. Također, različiti putevi inhibicije i interakcije s drugim signalnim putevima čine signalizaciju kompleksnom (Rocca i sur. 2022).

1.2.1.2. Signalni put Ras-Raf-MEK-ERK u karcinogenezi

Konstitutivna aktivacija molekula MAPK je karakteristika brojnih patoloških stanja, te igra ulogu u razvoju brojnih malignih bolesti (Schubert i sur. 2023). Aktivirajuće mutacije u genima koji kodiraju proteine koji sudjeluju u putu MAPK imaju snažan utjecaj na promjenu stanične signalizacije i razvoj tumora. MAPK putevi ima bitnu ulogu u brojnim staničnim procesima poput

stanične signalizacije, regulacije ekspresije gena, stanične proliferacije i diferencijacije te apoptoze (Hlozek i sur. 2022). Signalni put Ras-Raf-MEK-ERK prenosi izvanstanične signale koji stižu do stanice u obliku hormona, citokina ili faktora rasta do jezgre stanice preko aktivacije signalne kaskade (Tang i Lee 2010). Ras-Raf-MEK-ERK signalni put nužan je za pravilno funkcioniranje stanica, a mutacije u proteinima tog puta često su zabilježene u raznim tumorima. Mutacije u genu *RAS* prisutne su u 33% svih tumora dok su mutacije u genu *RAF* prisutne u gotovo 8% svih tumora (Song i sur. 2023).

Mutacije u komponentama ovog signalnog puta zabilježene su u različitim tipovima i velikom broju tumora. Genske promjene *RAS*, *RAF*, *MEK* i *ERK* gena mogu se podijeliti u dvije kategorije: aktivacijske i amplifikacijske mutacije. Aktivacijske dovode do konstitutivne aktivacije nekog od proteina i time stalne stimulacije ERK-a koji se nalazi na dnu kaskade. Amplifikacijske mutacije dovode do amplifikacije i pojačanog prijenosa signala, a to su mutacije u genu *RAS* ili mutacije koje izazivaju hiperaktivaciju receptorske tirozin kinaze (RTK) (Rocca i sur. 2022). Mutacije i promjene u regulaciji signalnih puteva ERK/MAPK do sada su opisane u različitim tumorima poput tumora jajnika, debelog crijeva, dojke, pluća, štitnjače, melanoma i drugih.

Mehanizmi kojim mutacije uzrokuju progresiju tumora su primarno poticanje proliferacije i antiapoptotički učinak. Signalni put Ras-Raf-MEK-ERK ima ulogu u inhibiciji i kočenju apoptoze stanica tumora u hipoksičnim uvjetima. Također, konstitutivna aktivnost ovog signalnog puta dovodi do inhibicije kaspaze-9, fosforilacijom na poziciji Thr125, koja ima značajnu ulogu u izvršenju stanične smrti (Bahar i sur. 2023). Djelovanjem na različite transkripcijske faktor poput MYC i E2F, Ras-Raf-MEK-ERK signalni put sudjeluje u regulaciji ekspresije ciklina i ciklin ovisnih kinaza koje imaju direktan utjecaj na progresiju staničnog ciklusa (Malumbres i sur. 2000). Također, signalizacija Ras-Raf-MEK-ERK signalnog puta uključena je u metastaziranje i angiogenezu tumorskih stanica. Kod karcinoma jajnika pokazano je da aktivacija ovog signalnog puta uzrokuje pojačanu ekspresiju matriks metaloproteinaze MMP-7 i uzrokuje aktivaciju proteina p70S6K koji potiče aktivaciju molekula koje direktno djeluju na angiogenezu, poput HIF-1 α i vaskularno endotelnog faktora rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) (Bahar i sur. 2023). Terapijski pristup koji uključuje ciljanje molekula uključenih u signalni put Ras-Raf-MEK-ERK mora biti specifičan. Bitno je identificirati specifičnu mutaciju ili promjenu u signalnom putu, poznavati njen patološki učinak te poznavati utjecaj korištenih lijekova na signalni put. Često

korišteni inhibitori signalnog puta paradoksalno mogu dovesti do aktivacije i neželjenog učinka (Rocca i sur. 2022).

Izbjegavanje imunskog sustava i tumorski mikrookoliš koji promovira rast tumora ključni su za preživljavanje tumorskih stanica. Mutacije u genu *KRAS* mogu modulirati mikrookoliš i tumoru pridružene stanice te i na taj način utjecati na progresiju tumora. Dolazi do lučenje različitih citokina, kemokina i faktora rasta koji direktno utječe na sposobnost tumorskih stanica da izbjegnu imunski odgovor i smanjuju sposobnost predočavanja antigena što dovodi do smanjene aktivacije limfocita T (Avery i sur. 2022). Kras može preko različitih efekatora djelovati proupalno i protuupalno. Istraživanja pokazuju kako Kras može aktivirati transkripcijski faktor NF- κ B koji potiče ekspresiju interleukina 1, interleukina 6, tumorskog faktora nekroze (TNF- α), inducibilne dušik oksid sintaze, koji djeluju proupalno. Također, Kras može pokrenuti ekspresiju interleukina 10, transformirajućeg čimbenik rasta beta (TGF- β , engl. *transforming growth factor beta*) i faktora stimulacije granulocitno–makrofagnih kolonija (GM-CSF, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) koji održavaju tumorski mikrookoliš u imunosupresivnom stanju, što govori o dvojnoj ulozi mutacija *KRAS* u modulaciji tumorskog mikrookoliša (Pereira i sur. 2022).

1.2.1.2.1. Ras-Raf-MEK-ERK signalni put u karcinogenezi raka štitnjače

Mutacije u nekoliko gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u MAPK putevima povezani su sa rakom štitnjače. Primarno radi se o mutacijama u genima *RAS*, *RAF*, *MEK* i *ERK* čiji produkti sudjeluju u signalizaciji (Schubert i sur. 2023). Mutacije u ovim genima zabilježene su u brojnim tumorima te je otkriveno kakao najčešće dolazi do mutacije u samo jednom od ovih gena, čiji produkt sudjeluje u signalnom putu, što sugerira da je dovoljna mutacija u samo jednom elementu signalnog puta kako bi došlo do maligne transformacije stanice (Tang i Lee 2010).

Osim spomenutih mutacija u genima čiji proteini sudjeluju u signalnom putu Ras-Raf-MEK-ERK može doći i do nastanka fuzijskog gena *RET/PTC* koji nastaje kao posljedica rearanžmana kromosoma, a ova mutacija se pojavljuje u oko 12% PKŠ (Knippler i sur. 2019). Protoonkogen *RET* kodira za transmembranski tirozin kinazni receptor i specifično je eksprimiran u tkivima koja potječu iz neuralnog nabora, uključujući i parafolikularne stanice C štitnjače, ali nije eksprimiran u folikularnim stanicama štitnjače (Romei i Elisei 2012). Protoonkogen *RET* kodira protein koji ima funkciju transmembranskog tirozin kinaznog receptora koji ima ulogu u

staničnoj diferencijaciji, preživljavanju i rastu (Hlozek i sur. 2022) Prilikom rearanžmana kromosoma dolazi do fuzije gena *RET* s drugim heterolognim genom. To dovodi do ekspresije kimeričnog gena koji se naziva RET/PTC i nastanka proteina koji konstitutivno dimeriziraju što uzrokuje njihovu neprestanu aktivaciju i prijenos signala (Fagin 2005). Također, ovom genskom fuzijom gen *RET* dolazi pod promotor i transkripcijsku kontrolu fuzijskog gena partnera (Santoro i Carlomagno 2013). Kada je protein RET aktivan on veže SH2 i SH3 regije molekule GRB2 koja veže SOS i dolazi do aktivacije RAS proteina i započinje Ras-Raf-MEK-ERK kaskada (Bhattarai i sur. 2022). Ova vrsta rearanžmana učestalija je u tumorima uzrokovanim ionizirajućim zračenjem, pogotovo kod djece s PKŠ (Fagin 2005). Ukoliko je ova mutacija detektirana u pacijenta preporuča se potpuna tireoidektomija. Također točkaste mutacije u genu *RET* povezanu su sa nastankom tumora štitnjače (Hlozek i sur. 2022). Mutacije u genu *RET* česte su kod medularnog karcinoma štitnjače, a mogu biti nasljeđene ili se pojaviti sporadično tijekom života. Određivanje tipa mutacije ima bitno je za određivanje oblika tumora, radi li se o sporadičnom ili obiteljskom tipu raka (Younis 2017).

Proteini koji su kodirani genima *RAS* također sudjeluju u prijenosu signala od receptora do jezgre prvenstveno sudjelujući u signalnom putu AMP-om aktivirane protein kinaze (AMPK, engl. *AMP-activated protein kinase*) i signalnom putu PI3K-AKT (Hlozek i sur. 2022). Geni iz porodice *RAS*, poput gena *HRAS*, *KRAS* i *NRAS* često su mutirani u tumorima štitnjače te se najčešće povezuju sa progresijom tumora i prelaskom iz benignog u maligni tumor. Također, ove mutacije su najčešće prisutne u slabo diferenciranim karcinomima i anaplastičnom karcinomu štitnjače (Abdullah i sur. 2019). Mutacije u genima *RAS* druge su najčešće mutacije detektirane u biopsijama štitnjače nakon mutacija u genu *BRAF* (Hlozek i sur. 2022). Istraživanja na animalnim modelima pokazuju da mutacije u genima *RAS* vjerojatno nisu dovoljne samostalno pokrenuti nastanak PKŠ zbog svojeg niskog onkogenog potencijala, no mutacije u tim genima mogu nositi predispoziciju za razvitak raka (Marotta i sur. 2021). Prognostički, mutacije u genu *RAS* povezuju se s boljom prognozom u odnosu na mutacije u genu *BRAF* i promotoru gena *TERT* koje su povezane s agresivnijim oblikom bolesti (Xang 2016).

Promjene na razini MEK1/2 također mogu utjecati na razvoj karcinoma štitnjače. Pokazano je kako se mutacije u genu *MEK1* pojavljuju samostalno, ne u kombinaciji sa drugim pokretačkim (driver) mutacijama u raku štitnjače. Mutacije i delecije u pojedinim regijama gena *MEK1* mogu

dovesti do promjena u strukturi proteina koje dovode do konstitutivne aktivnosti kinaze MEK1 (Borelli i sur. 2019).

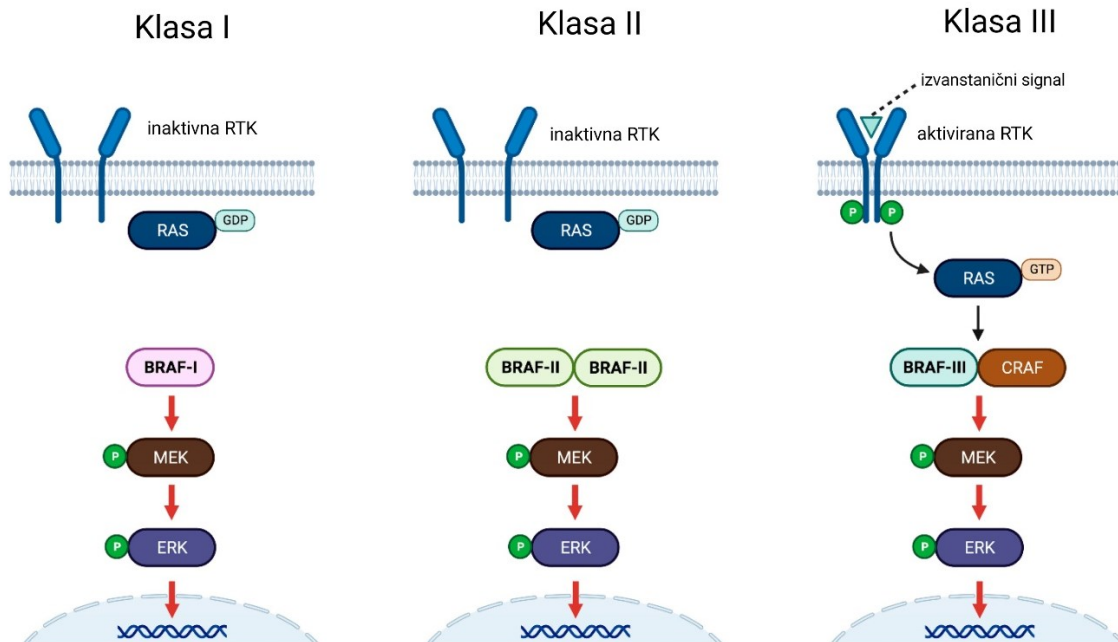
Najčešće detektirane mutacije u PKŠ su u genima *RAF*. Ljudski genom sadrži tri izoforme ovog gena *ARAF*, *BRAF* i *CRAF* (Fagin 2005). Upravo je specifična mutacija u genu *BRAF*, mutacija V600E gdje dolazi do zamjene aminokiseline valin u glutamat u kodonu 600, u nekim istraživanjima povezana sa lošijom prognozom i agresivnijim podtipom PKŠ. Pojavnost ove mutacije u tumoru je povezana s malignim fenotipom tumora, te se ova mutacija javlja u oko 30-70% PKŠ (Hlozek i sur. 2022). Mutacije u genima *ARAF* i *CRAF* puno su rjeđe u odnosu na mutacije u genu *BRAF*. Opisane su fuzije gena *CRAF* koje dovode do RAS neovisne dimerizacije C-Raf proteina i kinazne aktivnosti (Yaeger i Corcoran 2019). Također, mutacije u genima *RAF* detektirane su i kod brojnih drugih vrsta raka poput melanoma, kolorektalnog karcinoma, glioma, raka pluća, jetre, jajnika i drugih (Tufano i sur. 2012).

1.2.1.2.2. Mutacije *BRAF* u papilarnom karcinomu štitnjače

Gen *BRAF* nalazi se na kromosomu 7, i najjači je aktivator puta MEK-ERK od svihe gena iz porodice *RAF*. Zbog velike pojavnosti u PKŠ mutacije u ovom genu intenzivno su istraživane radi otkrivanja njihovog kliničkog i patofiziološkog značaja (Tufano i sur. 2012). Kinaza B-Raf građena je od nekoliko ključnih visokokonzerviranih domena (CR, engl. *conserved region*), CR1, CR2 i domene CR3. Domena CR1 sadrži Ras- vezujuću domenu te cisteinom bogatu domenu koja sadrži dva atoma cinka (Smiech i sur. 2020). Domena CR2 je cisteinom i serinom bogata domena koja ima vezujuća mjesta za 14-3-3 proteine koji kada su vezani za regiju CR2 održavaju B-Raf u inhibiranom i inaktivnom stanju blokiranjem nastanka dimera ključnih za aktivaciju kinazne aktivnosti B-Raf (Park i sur. 2019). Regija C3 je ključna za aktivnost kinaze B-Raf, nalazi se na C-terminalnom kraju i sadrži kinaznu domenu koja je regulirana fosforilacijom (Smiech i sur. 2020). Mutacije povezane s razvitkom tumora javljaju se u genu *BRAF* u dvije regije, fosfat vezujućoj petlji u kojoj se javlja manje od 1% mutacija ovog gena te mutacije u kinaznom aktivirajućem segmentu, koji uključuje najčešću mutaciju gena *BRAF* u svim tumorima, mutaciju V600E (Kiel i sur. 2016). Druge mutacije u genu *BRAF* koje ne uključuju valin u kodonu 600 mogu imati različiti utjecaj na aktivnost proteina. Takve mutacije mogu izazvati ili smanjenje ili

povećanje kinazne aktivnosti proteina B-Raf i time različito utjecati na aktivaciju signalnog puta MEK-ERK.

Mutacije u genu *BRAF* možemo podijeliti u tri kategorije (Slika 2.). Prvu klasu čine mutacije u genu *BRAF* koje stvaraju protein koji je aktivan neovisno Ras-u i može vršiti svoju kinaznu aktivnost kao monomer (Smiech i sur. 2020). U ovu skupinu mutacija ubrajamo mutacije V600, pa tako i mutaciju V600E. Druga klasa su mutacije koje čine kinazu Raf Ras neovisnom, ali za njihovu aktivaciju je nužna dimerizacija. Također za dimerizaciju tih proteina nije potrebna aktivacija monomera kinazom Ras. U drugu kategoriju ubrajamo različite točkaste mutacije poput mutacija K601E, L597Q i G469A. Treću klasu čine mutacije koje stvaraju proteine koji su Ras ovisni, samostalno nemaju kinaznu aktivnost te je nužna njihova dimerizacija sa proteinima Raf divljeg tipa. Tako nastaju heterodimeri Raf koji uključuju mutirani protein i protein divljeg tipa. Takve mutacije omogućavaju jače vezanje B-raf-a za Ras (Yaeger i Corcoran 2019).

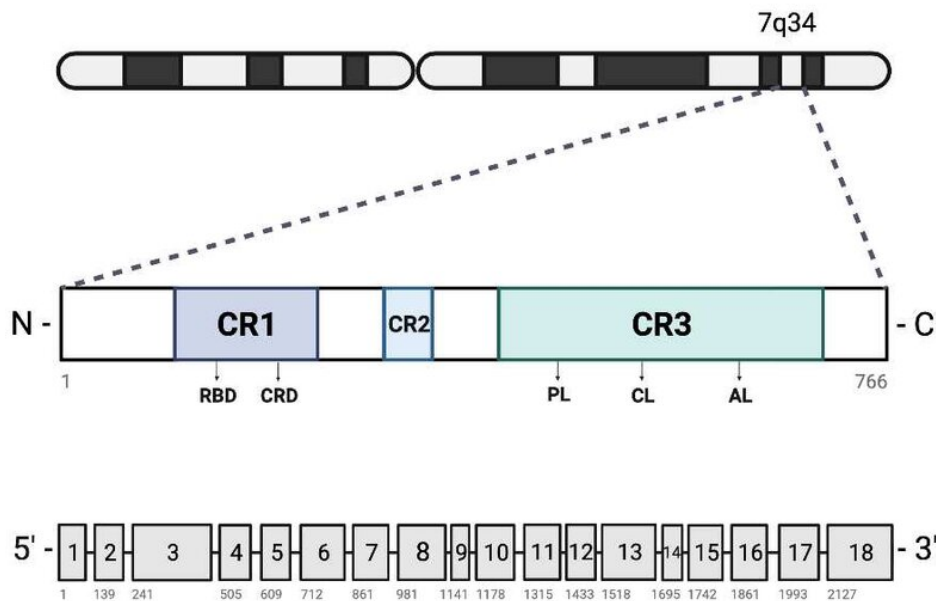


Slika 2. Shematski prikaz tri klase mutacija koje se pojavljuju u genu *BRAF*. Prvu kategoriju čine mutacije u kodonu 600, mutirani protein je konstitutivno aktivna kinaza koja je aktivna neovisno o Ras proteinu. Drugu kategoriju čine mutacije koje omogućavaju konstitutivnu kinaznu aktivnost

proteina BRAF neovisno o proteinu Ras no potrebna je dimerizacija proteina Braf kako bi postali aktivni. Treća kategorija su mutacije kojima nastaje protein Braf ovisan o proteinu Ras, te je za njegovu aktivaciju nužna dimerizacija sa nekim od proteina Raf divljeg tipa (preuzeto i prilagođeno prema Liu i Xie 2023).

1.2.1.2.3. Klinički i prognostički značaj BRAF V600E mutacije

Mutacija V600E u genu *BRAF* je točkasta mutacija koja uzrokuje zamjenu timina adeninom na nukleotidnoj poziciji 1799 u kodonu 600 u egzonu 15 (Slika 3.) i odgovorna je za zamjenu aminokiseline valin glutamatom (Tufano i sur. 2012). Ova mutacija dovodi do konstitutivne aktivacije proteina B-Raf čime se utječe na aktivaciju signalnog puta MEK-ERK. Mutacija V600E u genu *BRAF* je najčešća mutacija detektirana u PKŠ. Dosadašnja istraživanja ne pokazuju jasnu povezanost mutacije *BRAF* V600E s agresivnošću PKŠ. Neka istraživanja govore kako je ova mutacija povezana sa gorom prognozom i ishodom bolesti, dok druga govore kako ta povezanost ne postoji. Također, otkrivene mutacije u promotorskoj regiji gena *TERT*, mutacije C228T i C250T u kombinaciji s mutacijom *BRAF* V600E povezane su s agresivnijim tipom karcinoma (Colombo i sur. 2018). Istraživanja pokazuju kako je prisutnost mutacije V600E povezana s povećanom ekspresijom određenih molekula poput matriks metaloproteinaza MMP-2/3/9/13. Prisutnost mutacije V600E i konstitutivna aktivacija proteina B-raf povezana je i sa smanjenjem ekspresije pojedinih tumorsupresorskih gena poput inhibitora metalopeptidaze 3 (TIMP3), natrij-vezanog monokarboksilatnog transportera 1 (SLC5A8) i b2 receptora retinoične kiseline (RARb2) (Crsipo i sur. 2019). Lupi i suradnici (2007) pokazali su kako postoji korelacija između prisutnosti mutacije *BRAF* V600E u PKŠ i agresivnijeg tipa bolesti (invazivniji rast, ektratireoidna invazija, prisutnost metastaza u limfnim čvorovima) (Lupi i sur. 2007). Također, Silver i suradnici (2021) su pokazali kako je mutacija *BRAF* V600E povezana s agresivnijim oblikom PKŠ i papilarnog mikrokarcinoma štitnjače (Silver i sur. 2021). Henke i suradnici (2015) su pokazali kako postoji povezanost između mutacije V600E i pojedinih kliničkih i patoloških obilježja, no zaključili si kako ne postoji povezanost između mutacije i preživljenja bez povrata bolesti (RFS, *engl. recurrence-free survival*) i preživljenja specifičnog za bolest (DSS, *engl. disease-specific survival*) (Henke i sur. 2015).



Slika 3. Shematski prikaz lokacije gena *BRAF* na kromosomu 7. Na shemi je prikazan broj aminokiselina (768) koje čine protein BRAF, također su označene visokokonezrvirane regije gena *BRAF* CR1, CR2 i CR3. Unutar domene CR1 i CR3 prikazane su i funkcionalne domene proteina BRAF; RBD, CRD, PL, CL i AL. Također prikazan je broj egzona 1-18 koji čine gen *BRAF* (preuzeto i prilagođeno prema Roa i sur. 2024).

Detekcija mutacije *BRAF* V600E u pacijenata s papilarnim karcinomom štitnjače može imati klinički značaj. Pacijenti s mutiranim genom *BRAF* mogu primiti specifičnu terapiju u obliku inhibitora BRAF (Aprile i sur. 2023). Neki pacijenti koji nisu kandidati za konvencionalne pristupe liječenju ili nemaju koristi od njih, a njihovi tumori su pozitivni na mutaciju u genu *BRAF*, mogu imati koristi od korištenja malih molekula koje djeluju kao Raf inhibitori. Takvi lijekovi su vemurafenib i dabrafenib koji djeluju kao inhibitori kinaze BRAF V600E na način da se kompetitivno vežu za vezno mjesto ATP-a i tako inhibiraju sudjelovanje mutiranog proteina B-raf u signalnom putu Ras-Raf-MEK-ERK. Ovakvi lijekovi koriste se za liječenje *BRAF* V600E pozitivnih tumora štitnjače, kolorektalnog karcinoma i melanoma (Cabanillas i sur. 2015).

Falchook i suradnici (2015) su pokazali kako korištenje selektivnog inhibitora BRAF-a dabrafeniba u dobro diferenciranim karcinomima štitnjače dovodi do smanjenja tumora za minimalno 10% u 64% pacijenata (Falchook i sur. 2015). Također, tumori koji imaju V600E mutaciju slabije odgovaraju na terapiju radiaktivnim jodom ^{131}I jer ta mutacija utječe na metabolizam joda u stanicama tumora i time uzrokuje smanjeno nakupljanje joda u stanicama (Crispo i sur. 2019).

2. Cilj istraživanja

Hipoteza je da postoji povezanost između prisutnosti *BRAF* V600E mutacije u papilarnom karcinomu štitnjače i stupnja raširenosti bolesti te patohistoloških obilježja papilarnog karcinoma štitnjače. Cilj rada jest istražiti povezanost mutacije u genu *BRAF* s prognozom i agresivnošću papilarnog karcinoma štitnjače. Dodatni specifični ciljevi su:

1. Odrediti prisutnost V600E mutacije u genu *BRAF* u bolesnika s papilarnim karcinomom štitnjače.
2. Odrediti povezanost V600E mutacije u genu *BRAF* sa stupnjem proširenosti papilarnog karcinoma štitnjače.
3. Odrediti povezanost V600E mutacije u genu *BRAF* sa kliničkim i patohistološkim obilježjima agresivnosti papilarnog karcinoma štitnjače (veličina tumora, proboj kapsule štitnjače, angioinvazija, diseminacija u štitnjači, dob i spol).

3. Materijali i metode

3.1. Ispitanici

Istraživanje je koncipirano kao retrospektivno kohortno istraživanje i uključuje 263 pacijenata. Istraživanje je provedeno u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Pacijenti koji su uključeni u istraživanje prošli su kroz redovnu obradu u bolničkoj ambulanti. Liječenje svih pacijenata uključivalo je totalno tireoidektomiju, kirurški uklonjeni uzorci bili su dostupni u obliku patohistoloških preparata tkiva uklopljenog u parafin. U svrhu detekcije mutacije u genu *BRAF* korišteni su pohranjeni uzorci tkiva primarnog tumora. Također, u sklopu istraživanja preuzeta je sva dostupna medicinska dokumentacija o pacijentima koja je napravljena za vrijeme njihovog liječenja i u sklopu onkološke obrade. Pacijenti su birani na temelju nekoliko kriterija, morali su biti stariji od 18 pri uključivanju u istraživanje te je u sklopu liječenja trebala biti provedena potpuna tireoidektomija. Pacijenti čiji uzorci nisu bili odgovarajuće patohistološke kvalitete ili su bolovali od još neke maligne bolesti nisu uključivani u istraživanje.

Istraživanje je provedeno uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice te uz informirani pristanak uključenih pacijenata. Nakon zaprimanja pristanaka pacijenata prikupljeni su uzorci njihovih primarnih tumora PKŠ koji su uklopljeni u parafinske blokove. Svi uzorci su obrađeni u skladu s dobrom kliničkom praksom te je radi zaštite osobnih podataka svakom pacijentu dodijeljena jedinstvena šifra po kojoj se uzorak vodio do kraja istraživanja.

Radi prikupljanja podataka pregledani su patohistološki nalazi i klinički podaci kako bi se prikupili podaci o pacijentu koji uključuju spol, dob i odabrane patohistološke karakteristike tumora. Odabrane karakteristike bile su: veličina primarnog tumora, proboj kapsule štitnjače, ekstraintireoidna ekstenzija tumora, diseminacija tumora unutar štitnjače, prisutnost metastaza u vratnim limfnim čvorovima i prisutnost udaljenih metastaza.

Svi patohistološki uzorci obrađeni su i pregledani od strane patologa u Kliničkom zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak" Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice.

Nakon prikupljanja podataka pacijenti su podijeljeni u tri skupine:

1. Prva skupina obuhvaća pacijente kojima prilikom primarne postoperativne onkološke obrade nije dokazana prisutnost metastaza PKŠ. Broj pacijenata u prvoj skupini je 125.
2. Druga skupina obuhvaća pacijente kojima je prilikom primarne postoperativne onkološke obrade dokazana prisutnost metastaza PKŠ u regionalnim limfnim čvorovima. Broj pacijenata u drugoj skupini je 95.
3. Treća skupina obuhvaća pacijente kojima je prilikom primarne postoperativne onkološke obrade dokazana prisutnost udaljenih metastaza PKŠ u tijelu. Broj pacijenata u trećoj skupini je 43.

3.2. Priprema tumorskog tkiva štitnjače

Za analizu prisutnosti mutacije *BRAF* V600E korišteni su uzorci tumorskog tkiva uklopljeni u parafinske blokove. Uklapanje tkiva je uključivalo fiksaciju u 10% puferiranoj otopini formalina, zatim dehidriranje uzoraka u rastućim koncentracijama alkohola te uklapanje u parafinski blok. Za biranja reprezentativnih uzoraka pregledani su svi arhivirani parafinski blokovi pacijenata te je odabran onaj koji sadrži primarni tumor s najvećim promjerom. Iz odabranog parafinskog bloka napravljeni su na mikrotomu rezovi debljine 5 μ m koji su pohranjeni u polipropilenske epruvete radi izolacije DNA.

3.3. Izolacija dna

Tumorsku DNA izolirao sam korištenjem komercijalno dostupnog seta pod nazivom QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Navedeni set namijenjen je za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafin.

Najprije sam izveo protokol deparafiniziranja tkiva koji započinje dodavanjem 1 mL ksilola u polipropilensku epruvetu zapremnine 1,5 mL koja sadrži rezove parafinskog bloka s tumorskim tkivom. Ksilol je otapalo korišteno za uklanjanje parafina iz uzoraka tumorskog tkiva. Zatim sam epruveta snažno vorteksiro 10 sekundi, inkubirao 5 minuta na sobnoj temperaturi te sam nakon toga centrifugirao brzinom 1400 rpm u centrifugi Eppendorf 5415C u trajanju od 2 minute na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem sam dobio supernatant koji je uklonjen, a u epruvetu sam

dodao 1 mL otopine 96%-tnog etanola. Etanol sam koristio kako bi se iz uzorka uklonili svi ostaci ksilola. Epruvetu sam zatim centrifugirao u centrifugi Eppendorf 5415C 2 minute brzinom 1400 rpm na sobnoj temperaturi. Zatim sam iz epruveta ponovno uklonio sav supernatant, a otvorene epruvete s talogom sam stavio u termomikser Eppendorf Thermomixer Comfort gdje su bile inkubirane 15 minuta na 37 °C kako bi sav etanol ispario. Nakon inkubacije sam u epruvetu dodao 180 µL pufera za lizu (ATL pufer) te 20 µL proteinaze K. Proteinazu K sam koristio kako bi se razgradili neželjeni proteini u samom uzorku čime se povećava prinos izolirane DNA. Takve uzorke sam inkubirao na temperaturi od 56 °C 1 sat u Eppendorf Thermomixer Comfort uređaju. Zatim je u istom uređaju uslijedila inkubacija uzoraka na temperaturi od 90 °C. Inkubacija na visokoj temperaturi osigurava razaranje križno povezane DNA u uzorku do čega dolazi prilikom fiksacije tkiva u formalinu. Zatim sam u epruvetu dodao 2 µL RNaze A koncentracije 100 mg/mL, te je slijedila inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minute. RNazu sam dodao radi uklanjanja RNA molekula iz uzoraka, čime se povećava čistoća izolirane genomske DNA. Zatim sam epruvetu snažno vorteksirao te sam u nju dodano 200 µL 96 %-tnog etanola. Nakon još jednog snažnog centrifugiranja dobiveni lizat u epruveti sam prebacio na kolone QIAamp MinElute, a ispod kolone stavio čistu polipropilensku epruvetu. Nakon dodatka lizata na kolonu, epruveta s kolonom sam centrifugirao 1 minutu na 6000 G pri sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415C. Prolaskom lizata kroz kolonu eluat sam sakupljao u čistu epruvetu. Prikupljeni eluat sam bacio te sam kolonu stavio na čistu epruvetu, postupak centrifugiranja s istim postavkama sam ponovio uz dodatak 500 µL pufera za ispiranje (AW 1). Nakon centrifugiranja, prikupljeni eluat sam ponovno bacio i ponovno sam kolonu postavio na čistu epruvetu. Uslijedilo je još jedno centrifugiranje na istim postavkama, uz dodatak 500 µL drugog pufera za ispiranje (AW 2). Ponovno sam bacio eluat, kolona sam premjestio u čistu epruvetu te sam odradio centrifugiranje pri 16000 G u trajanju od 3 minute što je osiguralo potpuno uklanjanje pufera s kolone. Kolonu sam zatim stavio u čistu epruvetu zapremnine 1,5 mL, u kolonu sam dodao 80 µL pufera ATE te sam inkubirao epruvetu 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je uslijedilo posljednje centrifugiranje u trajanju od 1 minute pri 16000 G. ATE pufer dodao sam radi otapanja DNA koja je prethodno bila vezana na kolonu. Centrifugiranjem i prolaskom pufera kroz kolonu isprao sam DNA s kolone tako da se DNA nalazi u eluatu u epruveti. Izdvojenu DNA pohranio sam na -80 °C.

Kvalitetu i koncentraciju dobivene DNA odredio sam na uređaju spektrofotometru marke DeNovix DS-11 FX+ (DeNovix Inc., Wilmington DE, SAD) mjerenjem apsorbancije na valnoj

duljini 260 nm što je zabilježeno kao vrijednost A260 i valnoj duljini 280 nm što je zabilježeno kao vrijednost A280. Nakon izmjerene apsorbancije, računao sam omjer dobivenih vrijednosti A260/280 koji govori o kvaliteti DNA u uzorku. Uzorci čiji je omjer vrijednosti A260/280 iznosio $\geq 1,7$ bili su odgovarajuće kvalitete te sam ih pohranio radi provođenja daljnjih analiza. Kao slijepu probu kod mjerenja na nanospektrofotometru koristio sam pufer ATE u kojem je bila otopljena pohranjena DNA.

3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Prisutnost mutacije V600E u genu *BRAF* testirao sam lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*). Za detekciju mutacije koristio sam set reagensa za detekciju *BRAF* V600E TaqMan® Mutation Detection Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i set reagenasa koji detektira gene *BRAF* sa i bez V600E mutacije, TaqMan® Mutation Detection Reference Assay (Applied Biosystems). Za izvođenje qPCR metode koristio sam uređaj 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems).

Prije početka analize uzoraka qPCR-om koncentracije DNA razrijedio sam do radne koncentracije koja iznosi 6,25 µg/mL. Za analizu svakog uzorka koristio sam dvije reakcijske smjese raspoređene u dvije jažice na pločici MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) namijenjenoj za izvedbu qPCR reakcije.

Prva reakcijska smjesa sadrži 10 µL TaqMan® Genotyping Master Mix-a (Applied Biosystems), 4 µL DNA koncentracije 6,25 µg/mL, 2 µL TaqMan® Mutation Detection Assay i 4 µL deionizirane vode. TaqMan® Mutation Detection Assay sadrži alel specifičnu početnicu koja se vežu na slijed DNA gdje se nalazi tražena mutacija V600E, MGB oligonukleotidni blokator koji blokira nespecifično vezanje početnice na divlji tip alela, lokus specifičnu početnicu i lokus specifičnu TaqMan® probu koja ima vezanu FAM™ boju na 5' kraju, a na 3' prigušivač (engl. *quencher*). Ukoliko mutacija postoji i došlo je do komplementarnog vezanja početnice na regiju DNA s mutacijom, dolazi do elongacije i polimeraza stiže do TaqMan® probe, 5' nukleazna aktivnost polimeraze cijepa probu i time dolazi do odvajanja FAM™ boje od prigušivača i emitiranja fluorescencije čiji intenzitet u svakom ciklusu umnažanja bilježi uređaj za qPCR 7500 Real-time PCR System.

Druga reakcijska smjesa sadrži 10 μL TaqMan® Genotyping Master Mix-a (Applied Biosystems), 4 μL DNA koncentracije 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 2 μL TaqMan® Mutation Assay Reference Assay-a i 4 μL deionizirane vode. TaqMan® Mutation Assay Reference Assay sadrži neobilježene specifične početnice koje omeđuju regiju gena *BRAF* bez mutacije, i specifičnu TaqMan® probu koja na 5' kraju imaju vezanu fluorescentnu FAMTM boju a na 3' prigušivač. Početnica se veže na DNA regiju koja ne zahvaća mutaciju, dolazi do elongacije i polimeraza stiže do TaqMan® probe, 5' nukleazna aktivnost polimeraze cijepa probu i time dolazi do udaljavanja FAMTM fluorescentne boje od prigušivača i intenzitet fluorescencije bilježi uređaj 7500 Real-time PCR System u svakom ciklusu umnažanja.

Ukupni volumen obje reakcijske smjese je 20 μL . U otopini TaqMan® Genotyping Master Mix nalazi se AmpliTaq Gold® DNA, smjesa deoksinukleotida bez dUTP-a, ROX pasivna referentna boja i pufer koji omogućava odvijanje PCR reakcije u optimalnim uvjetima. Za svaki uzorak postavio sam dvije različite reakcijske smjese:

Uz uzorke pacijenata u svakoj reakciji koristio sam i analizirao odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole. Pozitivna kontrola bila je uzorak za koji je poznato da nosi mutaciju *BRAF* V600E, negativna kontrola bila je uzorak za koji je poznato da nema prisutnu mutaciju *BRAF* V600E.

Nakon pripreme reakcijskih smjesa pločicu sam u potpunosti prekrrio optičkom ljepljivom folijom kako ne bi došlo do isparavanja uzorka pri višim temperaturama reakcije. Tako pripremljenu pločicu stavio sam u 7500 Real-time PCR System uređaj. Uvjeti reakcije PCR bili su: 10 minuta preddenaturacije DNA na 95 °C, 5 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi na 92 °C za denaturaciju DNA i 1 minute na 58 °C za vezanje početnica i proba i elongaciju DNA, 40 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi na 92 °C za denaturaciju DNA i 1 minute na 60 °C za vezanje početnica i proba i elongaciju DNA.

3.5. Analiza rezultata reakcije qPCR

Po završetku lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu pregledao sam krivulje umnažanja i usporedio vrijednosti graničnog ciklusa (C_T , engl. *threshold cycle*) (prag (*threshold*) je podešen na 0,2) reakcija koje su u reakcijskoj smjesi sadržavale Mutation Detection Assay i

reakcija koje su sadržavale Reference Assay. Uspoređivao sam dvije reakcije u kojima se nalazio isti uzorak DNA.

Za određivanje postojanja mutacije u svakom uzorku izračunao sam ΔC_T na sljedeći način.

$$\Delta C_T = C_T (\textit{Mutation Detection Assay}) - C_T (\textit{Reference Assay})$$

Ukoliko je dobivena ΔC_T vrijednost imala vrijednost veću od 9,96 zaključio sam kako je uzorak negativan na mutaciju *BRAF* V600E. Ukoliko je dobivena ΔC_T vrijednost manja ili jednaka vrijednosti 9,96 zaključio sam da je mutacija *BRAF* V600E prisutna u uzorku. Vrijednost ΔC_T od 9,96 odgovara 0,1% mutiranih *BRAF* alela u uzorku što je granica osjetljivosti metode. Ukoliko za uzorak nije detektirana krivulja umnažanja u reakciji s Mutation Detection Assay-om, a u reakciji s Reference Assay-om je C_T vrijednost bila viša od 30, uzorak sam proglasio neadekvatnim i određivanje prisutnosti mutacije *BRAF* V600E neuspješnim. Prije analize qPCR rezultata uzoraka od pacijenata provjerio sam da pozitivna i negativna kontrola postavljene u istoj reakciji imaju odgovarajuće rezultate.

3.6. Statističke metode

Povezanost proširenosti bolesti i prisutnosti mutacije V600E u genu *BRAF* analizirana je χ^2 -testom. Povezanost patohistoloških obilježja i prisutnost mutacije *BRAF* V600E testirani su pomoću χ^2 -testa ili Mann-whitney U testa, zavisno o vrsti varijable. Za analizu povezanosti veličine tumora sa proširenošću bolesti korišten je Kruskal-Wallis test i Dunn-ov post-hoc test. Razina značajnosti postavljena je na vrijednost $p=0,05$. Za statističku obradu podataka i grafički prikaz rezultata korišten je program GraphPada Prism 10.

4. Rezultati

4.1. Karakteristike bolesnika

U analizu je bilo uključeno 263 pacijenata podijeljenih u tri skupine. Pojedine statističke analize nisu mogle biti napravljene na svakom od pacijenata zbog nedostatka pojedinih kliničkih podataka te su s toga pacijenti za koje nedostaju pojedini podaci izbačeni iz pojedinih analiza. U tablici je prikazana razdioba pacijenata s obzirom na dob i spol te patohistološke karakteristike poput prisutnosti mutacije *BRAF* V600E, proširenosti bolesti (prisutnost metastaza), proboja kapsule štitnjače, diseminaciji unutar štitnjače i prisutnosti angioinvazije (Tablica 1.).

Od 263 pacijenata uključenih u istraživanje muškarca je 97 (36,9%), a žena 166 (63,1%). Od 263 uključena pacijenta minimalna dob pacijenta pri postavljanju dijagnoze bila je 13 godina, najveća 80 godina, srednja vrijednost dobi pacijenata bila je 47,11 godina, medijan je iznosio 47 godina, a standardna devijacija 16,40 godina (Tablica 2.). Pacijenata bez metastaza bilo je 125 (47,5%), pacijenata s lokalnim metastaza bilo je 95 (36,1%), a pacijenata s udaljenim metastazama je 43 (16,3%) od ukupno 263 pacijenata. Probijanje kapsule štitnjače od strane tumora je zabilježeno u 68 (27,1%), a nije zabilježeno u 183 (72,9%) od ukupno 251 bolesnika za koje su postojali podaci. Podaci o diseminaciji tumora unutar štitnjače bili su dostupni za 242 pacijenata, u 90 (37,2%) pacijenata je diseminacija unutar štitnjače zabilježena, dok u 152 (62,8%) nije bila prisutna. Ekstratireoidna invazija zabilježena je u 179 (74,3%) pacijenata, a nije zabilježena u 62 (25,7%) pacijenata od ukupno 241 pacijenata za koje su postojali podaci.

Tablica 1. Tablični prikaz spola, dobi i patohistoloških karakteristika PKŠ pacijenata.

Karakteristika pacijenta		Broj pacijenata	Postotak %
Spol N=263	muškarci	97	36,9
	žene	166	63,1
Starost pri dijagnozi N=263	<55	169	64,3
	≥55	94	35,7
Stadij bolesti pri dijagnozi N=263	bez metastaza	125	47,5
	lokalne metastaze	95	36,1
	udaljene metastaze	43	16,3
Proboj kapsule štitnjače N=251	da	68	27,1
	ne	183	72,9
Diseminacija unutar štitnjače N=242	da	90	37,2
	ne	152	62,8
Ekstratireoidna ekstenzija N=241	da	179	74,3
	ne	62	25,7

Tablica 2. Prikaz razdiobe pacijenata s obzirom na dob.

Dob (godine)							
N	Aritmetička sredina	SD	Medijan	Min.	Maks.	Q1	Q3
263	47,1	16,4	47	13	80	34	62

Detekcija mutacije nije uspjela za uzorke od 7 pacijenata. Mutacija *BRAF* V600E je detektiran u 154 (60,2%) od ukupno 256 pacijenata kod kojih je analiza mutacije *BRAF* bila uspješna (Tablica 3.).

Tablica 3. Razdioba pacijenata s obzirom na prisutnost ili odsutnost mutacije *BRAF* V600E.

Karakteristika pacijenta		Broj pacijenata	Postotak %
Prisutnost mutacije <i>BRAF</i> V600E N=256	da	154	60,2
	ne	102	39,8

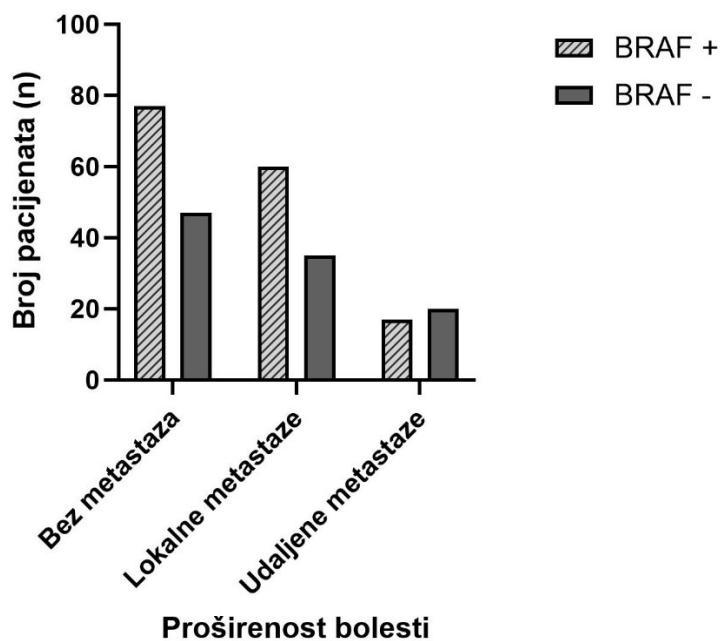
4.2. Povezanost stupnja proširenosti bolesti i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E

Pacijenti su podijeljeni u tri skupine s obzirom na prisutnost metastaza prilikom prve onkološke obrade nakon operacije. Analiza mutacije *BRAF* V600E nije uspjela u uzorcima 7 pacijenata, za te pacijente nije dobiven rezultat o prisutnosti ili odsutnosti mutacije. Od toga, 6 pacijenata pripadalo je skupini pacijenata s udaljenim metastazama dok je 1 pripadao skupini pacijenata bez metastaza. Pacijenata bez metastaza kod kojih je analiza mutacije *BRAF* uspjela je bilo 124, njih 77 (62,1%) imalo je prisutnu mutaciju u uzorku tumora dok ih 47 (37,9%) nije imalo prisutnu mutaciju. Kod 60 (63,2%) pacijenata s lokalnim metastaza detektirana je mutacija, dok kod njih 35 (36,8%) nije, od ukupno 95 pacijenata u toj skupini. U skupini pacijenata s udaljenim metastazama njih 17 (46,0%) imalo je detektiranu mutaciju dok njih 20 (54,0%) nije. Dobiveni rezultati ne ukazuju na statistički značajnu povezanost između stupnja proširenosti bolesti i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E u primarnom tumoru pacijenata ($\chi^2(2, N=256) = 3,669$; $p=0,1597$; Tablica 4., Slika 4.).

Tablica 4. Tablični prikaz raspodjele pacijenata s obzirom na proširenost bolesti i prisutnost mutacije *BRAF* V600E.

Proširenost bolesti	Mutacija <i>BRAF</i> V600E <i>n</i> (%)		
	da	ne	ukupno
bez metastaza	77 (62,10)	47 (37,90)	124
lokalne metastaze	60 (63,16)	35 (36,84)	95
udaljene metastaze	17 (45,95)	20 (54,05)	37
ukupno	154	102	256

$(\chi^2(2, N=256) = 3,669; p=0,1597)$



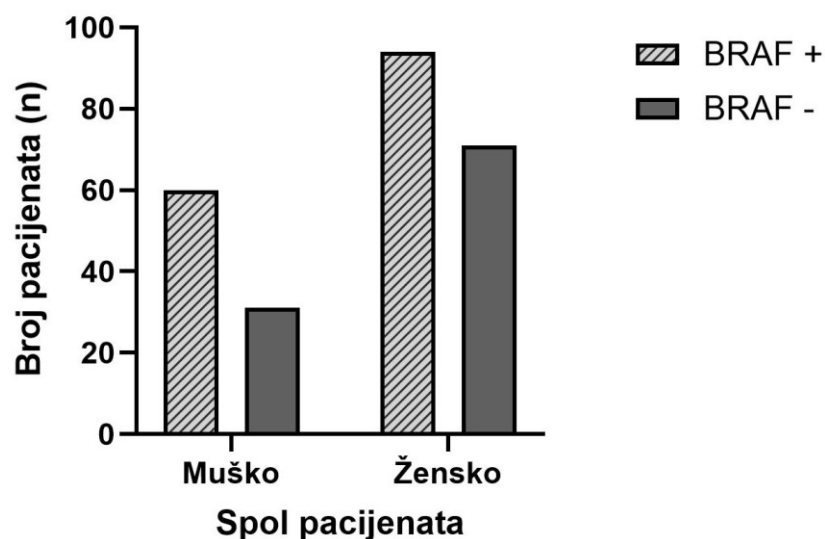
Slika 4. Grafički prikaz brojnosti pacijenata sa (BRAF +) ili bez (BRAF -) detektirane mutacije *BRAF* V600E s obzirom na raširenost bolesti kod pacijenta.

4.3. Povezanost prisutnosti mutacije BRAF V600E sa spolom i dobi bolesnika

Od ukupno 91 muškog pacijenta kod njih 60 (65,93%) je prisutna mutacija, dok kod njih 31 (34,07%) nije dokazana V600E mutacija u genu *BRAF*. Ženskih pacijenata je bilo 165 te je kod njih 94 (56,97%) dokazana prisutnost mutacije, dok kod njih 71 (43,03%) nije dokazana prisutnost mutacije. Statistički značajna povezanost nije pronađena između spola pacijenata i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E ($\chi^2(1, N=285) = 4,732; p=0,1068$ Tablica 5., Slika 5.).

Tablica 5. Tablični prikaz raspodjele bolesnika s obzirom na spol pacijenta i prisutnost mutacije *BRAF* V600E.

Spol	Mutacija <i>BRAF</i> V600E <i>n</i> (%)		
	da	ne	ukupno
muško	60 (65,93)	31 (34,07)	91
žensko	94 (56,97)	71 (43,03)	165
ukupno	154 (60,16)	102 (39,84)	256
$(\chi^2(1, N=256) = 1,966; p=0,1608)$			

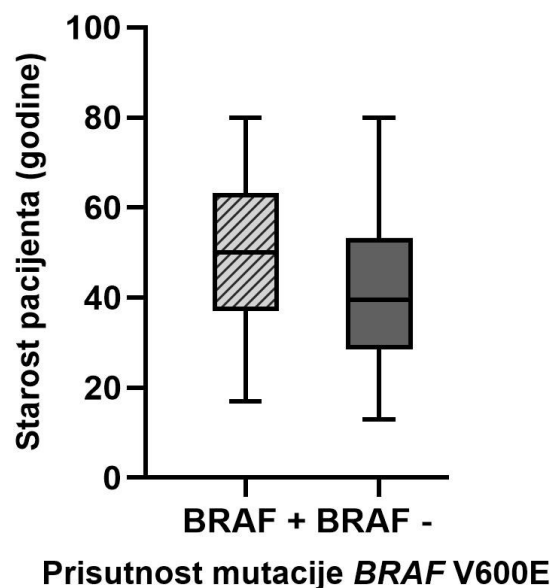


Slika 5. Grafički prikaz brojnosti muških i ženskih pacijenata s obzirom na prisutnost mutacije *BRAF V600E* u primarnom tumoru PKŠ.

Zbog nenormlane razdiobe podataka, za usporedbu dobi pacijenata s potvrđenom mutacijom *BRAF V600E* i dobi pacijenata kod kojih mutacija *BRAF V600E* nije potvrđena korišten je Mann-Whitney U statistički test. Analizom podataka pokazana je statistički značajna povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF V600E* i starije životne dobi pacijenta (Mann-Whitney U test, $U=5453$, $p < 0,001$; Tablica 6., Slika 6.).

Tablica 6. Usporedba dobi pacijenata s potvrđenom mutacijom *BRAF V600E* s dobi pacijenata kod kojih mutacija *BRAF V600E* nije potvrđena.

<i>BRAF V600E</i> mutacija	N	Dob (godine)						
		aritmetička sredina	SD	medijan	min.	maks.	Q1	Q3
prisutna	154	50,38	15,60	50	17	80	37	63,25
nije prisutna	102	41,77	16,18	39,50	13	80	28,50	53,25
Mann-Whitney U test, $U=5453$, $p < 0,0001$								



Slika 6. Grafički prikaz razdiobe dobi pacijenata pri postavljanju dijagnoze s obzirom na odsutnost (BRAf -) ili prisutnost (BRAf +) *BRAF* V600E mutacije u tumoru.

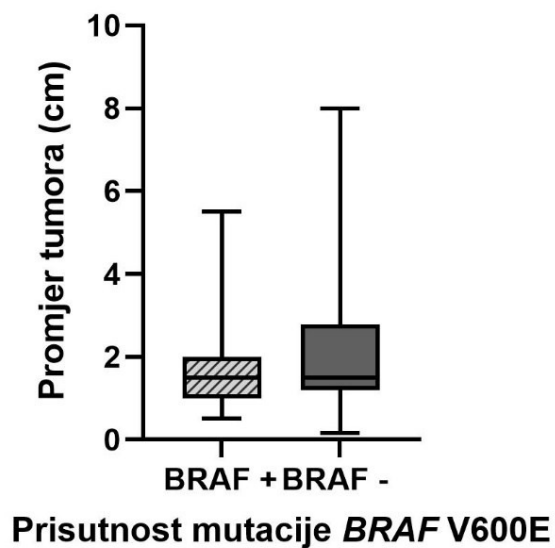
4.4. Povezanost patohistoloških obilježja tumora i prisutnosti mutacije BRAF V600E

Prisutnost angioinvazije za većinu uzoraka nije bila jasno opisana na patohistološkoj razini te zbog tog razloga angioinvazija kao karakteristika nije analizirana.

Veličina tumora zabilježena je u 242 pacijenata te je uspoređena veličina tumora kod *BRAF* V600E pozitivnih i negativnih pacijenata Mann-Whitney U testom. Nakon analize nije dobivena statistički značajna razlika između veličine tumora pacijenata sa mutacijom u odnosu na veličinu tumora pacijenata bez mutacije *BRAF* V600E (Mann-Whitney U test, $U=6189$, $p=0,1227$; Tablica 7, Slika 7.).

Tablica 7. Usporedba veličine tumora pacijenata s potvrđenom mutacijom BRAF V600E s pacijentima kod kojih mutacija BRAF V600E nije potvrđena.

BRA F V600E mutacija	N	Veličina tumora (cm)						
		aritmetička sredina	SD	medijan	min.	maks.	Q1	Q3
<i>prisutna</i>	146	1,807	1,001	1,50	0,50	5,5	1,00	2,00
<i>nije prisutna</i>	96	2,253	1,665	1,50	0,15	8,0	1,20	2,78
Mann-Whitney U test, U=6189, $p=0,1227$								



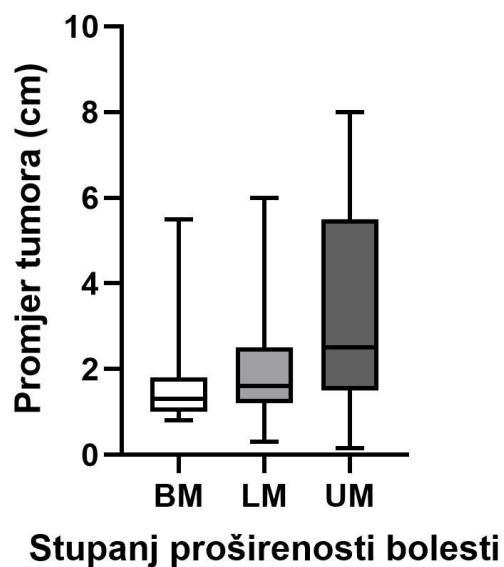
Slika 7. Grafički prikaz veličine tumora pacijenta s obzirom na prisutnost (BRA F +) ili odsutnost (BRA F -) mutacije BRA F V600E u tumoru.

Uspoređivana je veličina tumora pacijenata s obzirom na tri skupine bolesnika (bez metastaza, prisutne regionalne metastaze i udaljene metastaze). S obzirom na raspodjelu podataka korišten je Kruskal-Wallis test i Dunn-ov post-hoc test. Kruskal-Wallis test pokazao je da postoji značajna razlika u veličini tumora među tri grupe bolesnika ($\chi^2(2, N = 209) = 21,82, p < 0.0001$; Tablica 8.).

Dunnov test višestrukih usporedbi dodatno je pokazao da postoji značajna razlika u veličini tumora bolesnika među tri grupe. Srednji rang veličine tumora bio je 104,9 za skupinu bez metastaza, 132,6 za skupinu s regionalnim metastazama i 172,1 za skupinu s udaljenim metastazama. Usporedbe po parovima korištenjem Dunnovog testa pokazale su da su rezultati skupine s udaljenim metastazama značajno različiti od onih skupine bez metastaza ($p < 0,0001$) i skupine s regionalnim metastazama ($p = 0,0143$). Također je uočena statistička značajna razlika između grupe bez metastaza i grupe s regionalnim metastazama ($p = 0,0161$) (Slika 8).

Tablica 8. Usporedba veličine tumora s stupnjem proširenosti bolesti.

Stupanj proširenosti bolesti	N	Promjer tumora (cm)						
		aritmetička sredina	SD	medijan	min.	maks.	Q1	Q3
bez metastaza	121	1,64	0,84	1,3	0,8	5,5	1,00	1,80
lokalne metastazama	91	2,03	1,16	1,6	0,3	6,0	1,20	2,50
udaljene metastaze	37	3,47	2,32	2,5	0,15	8,0	1,50	5,50
$\chi^2(2, N = 209) = 21,82, p < 0,001$								



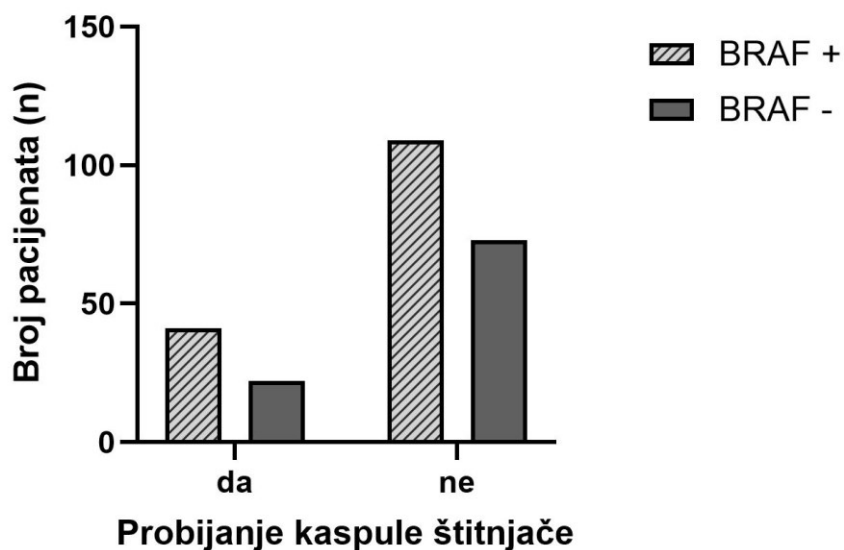
Slika 8. Grafički prikaz veličine tumora pacijenta s obzirom na stupanj proširenosti bolesti. Kratice: skupina BM - pacijenti bez metastaza, skupina LM - pacijente s lokalnim metastazama, skupina UM - pacijente s udaljenim metastazama.

Od ukupno 182 pacijenta kod kojih nije prisutno probijanje kapsule štitnjače njih 109 (59,9%) su imali prisutnu mutaciju, dok njih 73 (40,1%) nije imalo prisutnu mutaciju. Od 63 pacijenata kod kojih nije prisutno probijanje kapsule štitnjače od strane tumora njih 22 (34,9%) nisu imali prisutnu mutaciju, dok je njih 41 (65,1%) imalo prisutnu mutaciju *BRAF* V600E. Probijanje kapsule štitnjače od strane tumora nije povezano s prisutnošću mutacije *BRAF* V600E na razini statističke značajnosti ($\chi^2(1, N=245) = 0,5309$; $p=0,4662$, Tablica 9., Slika 9.).

Tablica 9. Tablični prikaz raspodjele bolesnika s obzirom na probijanje kapsule štitnjače od strane tumora i prisutnost mutacije *BRAF* V600E.

Proboj kapsule	Mutacija <i>BRAF</i> V600E <i>n</i> (%)		
	da	ne	ukupno
da	41 (65,1)	22 (34,9)	63
ne	109 (59,9)	73 (40,1)	182
ukupno	150 (61,2)	95 (38,8)	245

$(\chi^2(1, N=245) = 0,5309; p=0,4662)$



Slika 9. Grafički prikaz broja pacijenata s prisutnim probijanjem kapsule štitnjače i bez prisutnog probijanja kapsule štitnjače u uzorku s obzirom na prisutnost mutacije *BRAF* V600E u primarnom tumoru.

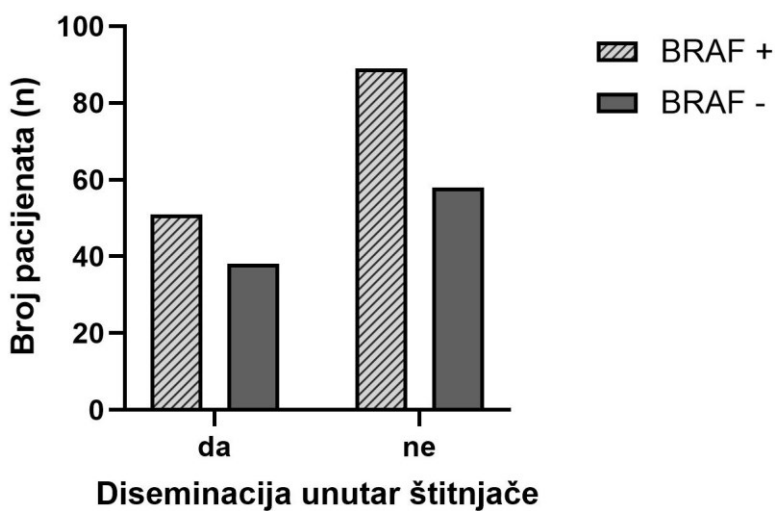
Kod 94 pacijenata prisutna je diseminacija tumora u štitnjaču, njih 52 (55,3%) je imalo prisutnu mutaciju *BRAF* V600E, dok njih 42 (44,7%) nije imalo prisutnu mutaciju. Kod 164 pacijenata nije prisutna diseminacija tumora u štitnjaču, njih 90 (54,9%) je imalo mutaciju, dok njih 74 (45,1%) nije imalo mutaciju *BRAF* V600E. Također, nije dokazana statistički značajna

povezanost između prisutnosti diseminacije tumora u štitnjači i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E ($\chi^2(1, N=236) = 0,2413; p=0,6233$; Tablica 10, Slika 10).

Tablica 10. Tablični prikaz raspodjele bolesnika s obzirom na probijanje kapsule štitnjače od strane tumora i prisutnost *BRAF* V600E mutacije.

Diseminacija unutar štitnjače	Mutacija <i>BRAF</i> V600E <i>n</i> (%)		
	da	ne	ukupno
da	51 (57,3)	38 (42,7)	89
ne	89 (60,5)	58 (39,5)	147
ukupno	140 (59,3)	96 (40,7)	236

$(\chi^2(1, N=236) = 0,2413; p=0,6233)$



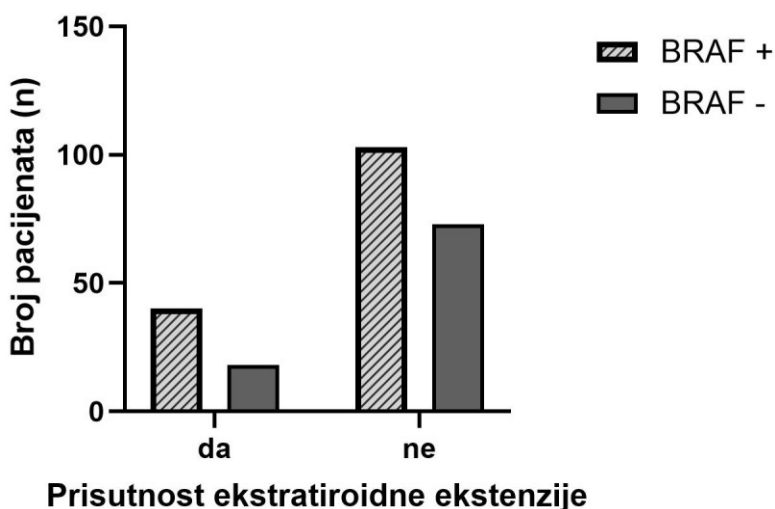
Slika 10. Grafički prikaz broja pacijenata s prisutnom diseminacijom unutar štitnjače i bez diseminacije unutar štitnjače s obzirom na prisutnost mutacije *BRAF* V600E u primarnom tumoru.

Od ukupno 58 uzorka s prisutnom ekstratiroidnom ekstenzijom kod njih 40 (69,0%) je detektirana mutacija, dok kod njih 18 (31,0%) nije. Kod 176 uzoraka nije opisana ekstratiroidna ekstenzija, kod njih 103 (58,5%) je bila prisutna mutacija, dok kod njih 73 (41,5%) mutacija *BRAF* V600E nije bila prisutna. Nije dokazana statistički značajna povezanost između ekstratiroidne ekstenzije i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E ($\chi^2(1, N=234) = 2,002; p=0,1571$; Tablica 12., Slika 12.)

Tablica 12. Tablični prikaz raspodjele pacijenata s obzirom na prisutnost ekstratiroidne ekstenzije i prisutnost mutacije *BRAF* V600E.

Ekstratiroidna ekstenzija	Mutacija <i>BRAF</i> V600E <i>n</i> (%)		
	da	ne	ukupno
da	40 (69,0)	18 (31,0)	58
ne	103 (58,5)	73 (41,5)	176
ukupno	143 (61,1)	91 (38,9)	234

$(\chi^2(1, N=234) = 2,002; p=0,1571)$



Slika 12. Grafički prikaz broja pacijenata s prisutnom ekstratiroidnom ekstenzijom i bez ekstratiroidne ekstenzije s obzirom na prisutnost mutacije *BRAF* V600E u primarnom tumoru.

5. Rasprava

Iako je tijek bolesti većine pacijenata s dijagnosticiranim PKŠ povoljan, pojava udaljenih metastaza može predstavljati terapijski izazov. Pojavnost bolesti u posljednjih je 30 godina porasla u svijetu zbog povećanog broja pregleda i napretka u dijagnostičkim postupcima, dok je smrtnost od raka štitnjače ostala ista, što je posljedica napretka u liječenju i ranog otkrivanja bolesti (Zhao i sur. 2024). Također, često otkrivanje neagresivnih slučajeva mikrookarcinoma u ranijim stadijima može rezultirati nepotrebnim liječenjem koje može činiti više štete nego pružiti koristi pacijentu. Zbog toga se praćenje i liječenje bolesti dosta promijenilo u posljednjih 15 godina, gdje se stavlja naglasak na dugoročno praćenje pacijenata ukoliko dođe do otkrivanja malenih lezija promjera do 10 mm, a biopsija je preporučena tek kada postoji jasan pokazatelj bolesti. Liječenje ili dugogodišnje praćenje pacijenata može predstavljat opterećenje za pacijenta, ali i zdravstveni sustav (Grant i sur. 2015).

Podjela bolesnika prema obilježjima bolesti može biti korisna u otkrivanju potencijalno agresivnijih oblika bolesti. Pacijenti kojima je bolest otkrivena na vrijeme mogu imati veću šansu za preživljenje i izlječenje od bolesti. Jedno od takvih obilježja koje je povezano s agresivnošću PKŠ je prisutnost somatske mutacije *BRAF V600E* u tumoru, koja je u nekim istraživanjima povezana sa većom stopom recidiva bolesti i smrtnošću pacijenata s PKŠ, pogotovo ukoliko se mutacija *BRAF V600E* pojavljuje zajedno s mutacijom u regiji promotora gena *TERT* (Kitahara i sur. 2022).

Pojavnost mutacije *BRAF V600E* u PKŠ u svim dobnim skupinama pacijenata procijenjena je na 36-83% (Kure i sur. 2019). U našem istraživanju postotak pacijenata pozitivnih na mutaciju *BRAF V600E* iznosio je 60,2% (Tablica 3.), što odgovara očekivanom postotku s obzirom na podatke iz drugih istraživanja.

Većinu pacijenata s PKŠ čeka odlična prognoza kada je riječ o izlječenju, no prisutnost metastaza povezana je s lošijim ishodima bolesti. Prisutnost udaljenih metastaza zabilježeno je u 1-4% pacijenata prilikom postavljanja dijagnoze, što je povezano sa smanjenim preživljenjem od 24-76% (Toraih i sur. 2021). U našem istraživanju postotak pacijenata s prisutnim udaljenim metastazama pri postavljanju dijagnoze je 16,3%. Najčešća prisutnost metastaza zabilježena je u plućima, kostima, jetri i mozgu, te je prisutnost metastaza u više organa povezana s većom

smrtnošću u odnosu na prisutnost metastazi u jednom organu (Toraih i sur. 2021). Prisutnost regionalnih metastaza puno je češća i prisutna je u oko 60-70% pacijenata kod postavljanja dijagnoze PKŠ. Prisutnost lokalnih metastaza u limfnim čvorovima vrata povezana je sa recidivom bolesti i povećanom smrtnošću u pacijenata starijih od 45 godina (Suh i sur. 2017). Naše istraživanje je uključivalo 36,1% pacijenata s lokalnim metastazama (Tablica 1.).

Analizom naših rezultata nije dokazana statistički značajna povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF* V600E i stupnja proširenosti bolesti ($p=0,1597$; Tablica 4.). Istraživanja drugih autora pokazuju različite rezultate kada je riječ o povezanosti *BRAF* mutacija i proširenosti bolesti. Xing i suradnici (2005) su pokazali kako je prisutnost mutacije *BRAF* povezana sa lošijim kliničkim i patohistološkim oblikom bolesti te je mutacija *BRAF* povezana s recidivom bolesti. Također, neka istraživanja povezuju prisutnost *BRAF* mutacije i prisutnost udaljenih metastaza kod pacijenata (Kebebew i sur. 2007, Namba i sur. 2003). *BRAF* mutacija je u nekoliko istraživanja na statistički značajnoj razini povezana sa prisutnošću lokalnih (cervikalnih) metastaza u limfnim čvorovima (Kim i sur. 2006, Frasca i sur. 2008). Suprotno tome, Sancisi i suradnici (2012) svojim istraživanjem su pokazali kako prisutnost mutacije *BRAF* V600E nije povezana s prisutnošću udaljenih metastaza PKŠ te kako mutacija nije povezana s negativnim ishodom bolesti, te su pokazali kako dolazi do smanjenja frekvencije mutacije *BRAF* V600E u skupini pacijenta kod kojih su prisutne udaljene metastaze u usporedbi s pacijentima koji su imali mutaciju *BRAF* V600E, ali nisu imali udaljene metastaze. Također, Yan i suradnici (2019) nisu pronašli statistički značajnu povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF* V600E u PKŠ i prisutnosti udaljenih metastaza i ponovne pojave bolesti kod pacijenata. Isto tako, Wikanta i suradnici (2022) nisu pronašli povezanost između mutacije *BRAF* V600E i prisutnosti udaljenih metastaza kod pacijenata.

S obzirom na nekonzistentne podatke iz različitih istraživanja teško je odrediti potpuni utjecaj *BRAF* V600E na širenje tumora i progresiju bolesti. Također, pretpostavlja se kako *BRAF* V600E ne može služiti kao prognostički faktor tijeka bolesti, no detekcija prisutnosti mutacije može biti korisna za planiranje liječenja, određivanje obujma tireoidektomije i također može biti odrednica u odabiru specifičnih oblika liječenja u obliku inhibitora BRAF-a (Yan i sur. 2019).

Dob je jedan od glavnih faktora rizika za razvoj raka te je neizbježan proces koji je povezan sa fiziološkim promjenama i razvitkom brojnih bolesti. Naša istraživanja pokazuju statistički značajnu povezanost starije životne dobi pacijenata i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E ($p < 0,001$;

Tablica 6.). Istraživanja drugih autora također su pokazala kako je prisutnost mutacije *BRAF* V600E učestalija u starijih pacijenata nego u mlađih (Subash i sur. 2020, Sun i sur. 2016). Međutim, ne pokazuju sva istraživanja jednake rezultate. Xing i suradnici (2005) nisu pronašli statistički značajnu povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF* i dobi pacijenata. Shen i suradnici (2018) su dokazali kako rizik od umiranja od PKŠ s porastom starosti kod pacijenata koji su negativni na mutaciju *BRAF* ostaje jednak, no kod *BRAF* pozitivnih pacijenata pokazali su linearnu povezanost s porastom dobi pacijenata i smrtnošću. Cong i suradnici (2024) su također pokazali statistički značajnu povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF* V600E i starije životne dobi pacijenata oboljelih od raka štitnjače. Ova korelacija može biti posljedica nakupljanja somatskih mutacija kod pacijenata starije životne dobi.

Naši podaci ne ukazuju na statistički značajnu povezanost spola i prisutnosti *BRAF* V600E mutacije kod pacijenata ($p=0,1608$; Tablica 5.). Karcinomi štitnjače su oko 3 puta češći u žena nego u muškaraca te se manje agresivni oblici tumora javljaju češće u žena, dok se agresivniji oblici jednako prisutni kod muškaraca i kod žena (Rahbari i sur. 2010). Naše istraživanje uključivalo je 166 (63,1%) žena te 91 (36,9%) muškaraca (omjer 1,8:1; Slika 5.). Rahbari i suradnici (2010) su meta analizom, koja je uključila 12 istraživanja i 1168 pacijenata pokazali da ne postoji statistički značajna povezanost između spola pacijenta i prisutnosti mutacije *BRAF* V600E u PKŠ. Od 12 uključenih istraživanja dva su pokazala statistički značajnu povezanost prisutnosti mutacije *BRAF* V600E i muškog spola, dok ostalih 10 nije pokazivalo statistički značajnu povezanost između spola i prisutnosti mutacije. Iako neki podaci upućuju na češću prisutnost mutacije kod muških pacijenata, drugi podaci ne govore tako i takva povezanost mogla bi biti posljedica češćeg otkrivanja agresivnijeg tipa PKŠ kod muškaraca (Rahbari i sur. 2010).

U sklopu istraživanja analizirana su sljedeća patohistološka obilježja u odnosu na prisutnost *BRAF* V600E mutacije u tumoru: veličina tumora, diseminacija tumora unutar štitnjače i proboj kapsule štitnjače.

Veličina tumora važna je u postavljanju dijagnoze papilarnog karcinoma štitnjače. Tumori koji su u svom promjeru manji ili jednaki 10 mm ubrajaju se u mikrokarcinome te se smatraju izrazito bezopasnim. Često se preporuča praćenje pacijenata ukoliko ne postoje neka od obilježja koja bi zahtijevala početak liječenja prilikom otkrivanja ovakvih lezija. Tumori koji su u svom promjeru veći od 10 mm smatraju se papilarnim karcinomima (Gong i sur. 2018). Unutar

klasifikacije TNM veći promjer tumora, ukoliko ne pokazuje znakove prodiranja u okolna tkiva se ne smatra lošim prognostičkim faktorom (Vianello i sur. 2021). Podaci u našem istraživanju ne pokazuju statistički značajnu povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF* V600E i veličine primarnog tumora ($p=0,1227$; Tablica 7., Slika 7.). Uočena je statistička značajna razlika u veličini tumora između sve tri grupe pacijenata podjeljene s obzirom na stupanj proširenosti bolesti ($p<0,001$; Tablica 8., Slika 8.). Xie i suradnici (2018) nisu pronašli statistički značajnu razliku u prisutnosti mutacije *BRAF* V600E između PKŠ manjih od 10 mm i PKŠ većih od 10 mm. Suprotno tome, Li i suradnici (2012) proveli su meta analizu koja je uključila 4 istraživanja i 2029 pacijenata. Meta analiza je pokazala statistički značajnu povezanost između prisutnosti mutacije *BRAF* V600E i veličine tumora veće od 10 mm.

Postojanje patohistoloških karakteristika proboja kapsule štitnjače, diseminacije unutar štitnjače i ekstratiroidnih ekstenzija nisu na statistički značajnoj razini povezane s prisutnošću mutacije *BRAF* V600E u našem istraživanju ($p=0,4662$ $p=0,6233$ i $p=0,1571$; Tablica 9., Tablica 10. i Tablica 11.). Diseminacija tumora unutar štitnjače je potencijalni put širenja metastaza primarnog tumora PKŠ. Qian i suradnici (2021) pokazali su značajnu povezanost između prisutnosti metastaza u limfnim čvorovima i prisutnosti diseminacije tumora unutar štitnjače u odnosu na tumore u kojima nije bila prisutna intratiroidna diseminacija. Proboj kapsule štitnjače karakterizira probijanje tumorskih stanica u tkivo van štitnjače i postojanje te karakteristike je u nekim istraživanjima povezano s prisutnošću metastaza u limfnim čvorovima (Yang i sur. 2020, Heng i sur. 2020). Također, Sezer i suradnici (2020) su pokazali povezanost prisutnosti *BRAF* V600E mutacije i proboja kapsule štitnjače u papilarnom mikrokarcinomu štitnjače. U našem istraživanju nije pronađena značajna povezanost između prisutnosti probijanja kapsula štitnjače i mutacije V600E u genu *BRAF* V600E.

Iako je mutirana kinaza B-Raf snažan aktivator signalnog puta Ras-Raf-MEK-ERK do sada nije postavljena jasna korelacija prisutnosti mutacije u genu *BRAF* s agresivnijim fenotipom PKŠ. Mogući razlog tome je da mutacija u genu *BRAF* dovodi do promijenjene signalizacije unutar tumorskih stanica, no nije samostalno dovoljna za progresiju tumora niti za procjenu biološkog ponašanja tumora.

S obzirom na značajni utjecaj na unutarstaničnu signalizaciju, tumori s mutacijom *BRAF* u nekim su istraživanjima povezani sa slabije diferenciranim, agresivnijim biološkim fenotipom i

kliničkim tijekom bolesti, ali i otpornošću na radiojodnu terapiju (Crispo i sur. 2019). Zbog toga otkrivanje pacijenata s prisutnom mutacijom u genu *BRAF* može pružati terapijske prednosti. Male molekule inhibitori kinaza BRAF koriste se za liječenje različitih tipova raka poput melanoma i raka pluća (Cabanillas i sur. 2020). Korištenje inhibitora BRAF-a poput sorafeniba (Nexavar) i lenvatiniba (Lenvima) pruža dobar terapijski pristup proširenim oblicima raka štitnjače koji su rezistentni na klasične oblike terapije poput radiojodne terapije (Crispo i sur. 2019).

6. Zaključak

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti slijedeće:

1. Prisutnost mutacije *BRAF* V600E nije na statistički značajnoj razini povezana s patohistološkim obilježjima agresivnosti papilarnog karcinoma štitnjače (veličina tumora, proboj kapsule štitnjače, diseminacija u štitnjači).
2. Prisutnost mutacije *BRAF* V600E nije statistički značajno povezana sa stupnjem proširenosti bolesti.
3. Prisutnost mutacije *BRAF* V600E zabilježena je u 60,2% pacijenata s papilarnim karcinomom štitnjače. Mutacija je uspješno detektirana u uzorcima primarnog papilarnog karcinoma štitnjače metodom qPCR.
3. Prisutnost mutacije *BRAF* V600E je na statistički značajnoj razini povezana s starijom životnom dobi pacijenata pri postavljanju dijagnoze.
4. Promjer tumora je statistički značajno veći u bolesnika s većim stupnjem proširenosti bolesti.

7. Literatura

Ahn, H. S., Kim, H. J., Welch, H. G. (2014): Korea's thyroid-cancer "epidemic"--screening and overdiagnosis. *The New England journal of medicine* 371(19): 1765–1767.

Akbulut, D., Kuz, E. D., Kursun, N., Dizbay Sak, S. (2021): Capsular Invasion Matters Also in "Papillary Patterned" Tumors: A Study on 121 Cases of Encapsulated Conventional Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocrine pathology* 32(3): 357–367.

Al-Masri, M., Al-Shobaki, T., Al-Najjar, H., Iskanderian, R., Younis, E., Abdallah, N., Tbakhi, A., Haddad, H., Al-Masri, M., Obeid, Z., Jarrar, A. (2021): BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: it's relation to clinical features and oncologic outcomes in a single cancer centre experience. *Endocrine connections* 10(12): 1531–1537.

Aprile, M., Cataldi, S., Perfetto, C., Federico, A., Ciccodicola, A., Costa, V. (2023): Targeting metabolism by B-raf inhibitors and diclofenac restrains the viability of BRAF-mutated thyroid carcinomas with Hif-1 α -mediated glycolytic phenotype. *British journal of cancer* 129(2): 249–265.

Avery, T. Y., Köhler, N., Zeiser, R., Brummer, T., Ruess, D. A. (2022): Onco-immunomodulatory properties of pharmacological interference with RAS-RAF-MEK-ERK pathway hyperactivation. *Frontiers in oncology* 12: 931774.

Bahar, M. E., Kim, H. J., Kim, D. R. (2023): Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal transduction and targeted therapy* 8(1): 455.

Bai, Y., Kakudo, K., Jung, C. K. (2020): Updates in the Pathologic Classification of Thyroid Neoplasms: A Review of the World Health Organization Classification. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)* 35(4): 696–715.

Bhattarai, C., Poudel, P. P., Ghosh, A., Kalthur, S. G. (2022): The RET gene encodes RET protein, which triggers intracellular signaling pathways for enteric neurogenesis, and RET mutation results in Hirschsprung's disease. *AIMS neuroscience* 9(1): 128–149.

Bogović Crnčić, T., Ilić Tomaš, M., Giroto, N., Grbac Ivanković, S. (2020): Risk Factors for Thyroid Cancer: What Do We Know So Far?. *Acta clinica Croatica* 59(Suppl 1): 66–72.

Borrelli, N., Panebianco, F., Condello, V., Barletta, J. A., Kaya, C., Yip, L., Nikiforova, M. N., Nikiforov, Y. E. (2019): Characterization of Activating Mutations of the MEK1 Gene in Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 29(9): 1279–1285.

Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., Kohn, E. C. (2014): The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* 120(22): 3446–3456.

Cabanillas, M. E., Dadu, R., Iyer, P., Wanland, K. B., Busaidy, N. L., Ying, A., Gule-Monroe, M., Wang, J. R., Zafereo, M., Hofmann, M. C. (2020): Acquired Secondary RAS Mutation in BRAFV600E-Mutated Thyroid Cancer Patients Treated with BRAF Inhibitors. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 30(9): 1288–1296.

Cabanillas, M. E., Patel, A., Danysh, B. P., Dadu, R., Kopetz, S., Falchook, G. (2015): BRAF inhibitors: experience in thyroid cancer and general review of toxicity. *Hormones & cancer* 6(1): 21–36.

Campenni, A., Violi, M. A., Ruggeri, R. M., Sindoni, A., Moleti, M., Vermiglio, F., Baldari, S. (2010): Clinical usefulness of 99mTc-MIBI scintigraphy in the postsurgical evaluation of patients with differentiated thyroid cancer. *Nuclear medicine communications* 31(4): 274–279.

Cancer Genome Atlas Research Network (2014): Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 159(3): 676–690.

Cargnello, M., Roux, P. P. (2011): Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75(1): 50–83.

Coca-Pelaz, A., Shah, J. P., Hernandez-Prera, J. C., Ghossein, R. A., Rodrigo, J. P., Hartl, D. M., Olsen, K. D., Shaha, A. R., Zafereo, M., Suarez, C., Nixon, I. J., Randolph, G. W., Mäkitie, A. A., Kowalski, L. P., Vander Poorten, V., Sanabria, A., Guntinas-Lichius, O., Simo, R., Zbären, P., Angelos, P., ... Ferlito, A. (2020): Papillary Thyroid Cancer-Aggressive Variants and Impact on Management: A Narrative Review. *Advances in therapy* 37(7): 3112–3128.

Colombo, C., Muzza, M., Proverbio, M. C., Tosi, D., Soranna, D., Pesenti, C., Rossi, S., Cirello, V., De Leo, S., Fusco, N., Miozzo, M., Bulfamante, G., Vicentini, L., Ferrero, S., Zambon, A., Tabano, S., Fugazzola, L. (2019): Impact of Mutation Density and Heterogeneity on Papillary Thyroid Cancer Clinical Features and Remission Probability. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 29(2): 237–251.

Crispo, F., Notarangelo, T., Pietrafesa, M., Lettini, G., Storto, G., Sgambato, A., Maddalena, F., Landriscina, M. (2019): BRAF Inhibitors in Thyroid Cancer: Clinical Impact, Mechanisms of Resistance and Future Perspectives. *Cancers* 11(9): 1388.

Dankner, M., Rose, A. A. N., Rajkumar, S., Siegel, P. M., Watson, I. R. (2018): Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* 37(24): 3183–3199.

Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W. (2007): MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279–3290.

Falchook, G. S., Millward, M., Hong, D., Naing, A., Piha-Paul, S., Waguespack, S. G., Cabanillas, M. E., Sherman, S. I., Ma, B., Curtis, M., Goodman, V., Kurzrock, R. (2015): BRAF inhibitor dabrafenib in patients with metastatic BRAF-mutant thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 25(1): 71–77.

Feldkamp, J., Führer, D., Luster, M., Musholt, T. J., Spitzweg, C., Schott, M. (2016): Fine Needle Aspiration in the Investigation of Thyroid Nodules. *Deutsches Arzteblatt international* 113(20): 353–359.

Frasca, F., Nucera, C., Pellegriti, G., Gangemi, P., Attard, M., Stella, M., Loda, M., Vella, V., Giordano, C., Trimarchi, F., Mazzon, E., Belfiore, A., Vigneri, R. (2008): BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocrine-related cancer* 15(1): 191–205.

Furuya-Kanamori, L., Bell, K. J. L., Clark, J., Glasziou, P., Doi, S. A. R. (2016): Prevalence of Differentiated Thyroid Cancer in Autopsy Studies Over Six Decades: A Meta-Analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34(30): 3672–3679.

Ghai, S., O'Brien, C., Goldstein, D. P., Sawka, A. M., Canadian Thyroid Cancer Active Surveillance Study Group (2021): Ultrasound in active surveillance for low-risk papillary thyroid cancer: imaging considerations in case selection and disease surveillance. *Insights into imaging* 12(1): 130.

Gong, Y., Li, G., Lei, J., You, J., Jiang, K., Li, Z., Gong, R., Zhu, J. (2018): A favorable tumor size to define papillary thyroid microcarcinoma: an analysis of 1176 consecutive cases. *Cancer management and research* 10: 899–906.

Gonzalez-Gonzalez, R., Bologna-Molina, R., Carreon-Burciaga, R. G., Gómezpalacio-Gastelum, M., Molina-Frechero, N., Salazar-Rodríguez, S. (2011): Papillary thyroid carcinoma: differential diagnosis and prognostic values of its different variants: review of the literature. *ISRN oncology* 2011: 915925.

Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., Hu, L. L. (2020): ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and therapeutic medicine* 19(3): 1997–2007.

Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., Pacini, F., Randolph, G. W., Sawka, A. M., Schlumberger, M., Schuff, K. G., Sherman, S. I., Sosa, J. A., Steward, D. L., Tuttle, R. M., Wartofsky, L. (2016): 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 26(1): 1–133.

Heng, Y., Yang, Z., Zhou, L., Lin, J., Cai, W., Tao, L. (2020): Risk stratification for lateral involvement in papillary thyroid carcinoma patients with central lymph node metastasis. *Endocrine* 68(2): 320–328.

Henke, L. E., Pfeifer, J. D., Ma, C., Perkins, S. M., DeWees, T., El-Mofty, S., Moley, J. F., Nussenbaum, B., Haughey, B. H., Baranski, T. J., Schwarz, J. K., Grigsby, P. W. (2015): BRAF mutation is not predictive of long-term outcome in papillary thyroid carcinoma. *Cancer medicine* 4(6): 791–799.

Hobbs, G. A., Der, C. J., Rossman, K. L. (2016): RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science* 129(7): 1287–1292.

Hu, J., Yuan, I. J., Mirshahidi, S., Simental, A., Lee, S. C., Yuan, X. (2021): Thyroid Carcinoma: Phenotypic Features, Underlying Biology and Potential Relevance for Targeting Therapy. *International journal of molecular sciences* 22(4): 1950.

Intenzo, C. M., Dam, H. Q., Manzone, T. A., Kim, S. M. (2012): Imaging of the thyroid in benign and malignant disease. *Seminars in nuclear medicine* 42(1): 49–61.

Jensen, C. B., Saucke, M. C., Francis, D. O., Voils, C. I., Pitt, S. C. (2020): From Overdiagnosis to Overtreatment of Low-Risk Thyroid Cancer: A Thematic Analysis of Attitudes and Beliefs of Endocrinologists, Surgeons, and Patients. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 30(5): 696–703.

Kebebew, E., Weng, J., Bauer, J., Ranvier, G., Clark, O. H., Duh, Q. Y., Shibru, D., Bastian, B., Griffin, A. (2007): The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of surgery* 246(3): 466–471.

Kiel, C., Benisty, H., Lloréns-Rico, V., Serrano, L. (2016): The yin-yang of kinase activation and unfolding explains the peculiarity of Val600 in the activation segment of BRAF. *eLife* 5: e12814.

Kim, J., Giuliano, A. E., Turner, R. R., Gaffney, R. E., Umetani, N., Kitago, M., Elashoff, D., Hoon, D. S. (2006): Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Annals of surgery* 244(5): 799–804.

Kitahara, C. M., Schneider, A. B. (2022): Epidemiology of Thyroid Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 31(7): 1284–1297.

Kloos R. T. (2005): Papillary thyroid cancer: medical management and follow-up. *Current treatment options in oncology* 6(4): 323–338.

Knippler, C. M., Saji, M., Rajan, N., Porter, K., La Perle, K. M. D., Ringel, M. D. (2019): MAPK- and AKT-activated thyroid cancers are sensitive to group I PAK inhibition. *Endocrine-related cancer* 26(8): 699–712.

Krajewska, J., Kukulska, A., Oczko-Wojciechowska, M., Kotecka-Blicharz, A., Drosik-Rutowicz, K., Haras-Gil, M., Jarzab, B., Handkiewicz-Junak, D. (2020): Early Diagnosis of

Low-Risk Papillary Thyroid Cancer Results Rather in Overtreatment Than a Better Survival. *Frontiers in endocrinology* 11: 571421.

Lea, I. A., Jackson, M. A., Li, X., Bailey, S., Peddada, S. D., Dunnick, J. K. (2007): Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. *Carcinogenesis* 28(9): 1851–1858.

Li, C., Lee, K. C., Schneider, E. B., Zeiger, M. A. (2012): BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97(12): 4559–4570.

Lim, H., Devesa, S. S., Sosa, J. A., Check, D., Kitahara, C. M. (2017): Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA* 317(13): 1338–1348.

Limaiem F., Rehman A., Mazzoni T. (2024): *Papillary Thyroid Carcinoma*. StatPearls Publishing, Treasure Island

Liu, J., Xie, H. (2023): BRAF Non-V600 Mutations in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers* 15(18): 4604.

LiVolsi V. A. (2011): Papillary thyroid carcinoma: an update. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24 Suppl 2, S1–S9.

Lu, G., Chen, L. (2022): Cervical lymph node metastases in papillary thyroid cancer: Preoperative staging with ultrasound and/or computed tomography. *Medicine* 101(9): e28909.

Lupi, C., Giannini, R., Ugolini, C., Proietti, A., Berti, P., Minuto, M., Materazzi, G., Elisei, R., Santoro, M., Miccoli, P., Basolo, F. (2007): Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(11): 4085–4090.

Malumbres, M., Pérez De Castro, I., Hernández, M. I., Jiménez, M., Corral, T., Pellicer, A. (2000): Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Molecular and cellular biology* 20(8): 2915–2925.

Marotta, V., Bifulco, M., Vitale, M. (2021): Significance of RAS Mutations in Thyroid Benign Nodules and Non-Medullary Thyroid Cancer. *Cancers* 13(15): 3785.

Mete, O., Asa, S. L. (2011): Pathological definition and clinical significance of vascular invasion in thyroid carcinomas of follicular epithelial derivation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24(12): 1545–1552.

Metovic, J., Cabutti, F., Osella-Abate, S., Orlando, G., Tampieri, C., Napoli, F., Maletta, F., Daniele, L., Volante, M., Papotti, M. (2023): Clinical and Pathological Features and Gene Expression Profiles of Clinically Aggressive Papillary Thyroid Carcinomas. *Endocrine pathology* 34(3): 298–310.

Nakayama, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Hayashi, H., Miyagi, Y., Wada, N., Rino, Y., Masuda, M., Imada, T. (2007): Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas. *Anticancer research* 27(5B): 3645–3649.

Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, T. I., Ohtsuru, A., Saenko, V. A., Kanematsu, T., Yamashita, S. (2003): Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88(9): 4393–4397.

Park, E., Rawson, S., Li, K., Kim, B. W., Ficarro, S. B., Pino, G. G., Sharif, H., Marto, J. A., Jeon, H., Eck, M. J. (2019): Architecture of autoinhibited and active BRAF-MEK1-14-3-3 complexes. *Nature* 575(7783): 545–550.

Park, K. S., Kim, S. H., Oh, J. H., Kim, S. Y. (2021): Highly accurate diagnosis of papillary thyroid carcinomas based on personalized pathways coupled with machine learning. *Briefings in bioinformatics* 22(4): bbaa336.

Pereira, F., Ferreira, A., Reis, C. A., Sousa, M. J., Oliveira, M. J., Preto, A. (2022): KRAS as a Modulator of the Inflammatory Tumor Microenvironment: Therapeutic Implications. *Cells* 11(3): 398.

Prior, I. A., Hancock, J. F. (2012): Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Seminars in cell & developmental biology* 23(2): 145–153.

Pudewell, S., Wittich, C., Kazemineh, N. S., Bazgir, F., Ahmadian, M. R. (2021): Accessory proteins of the RAS-MAPK pathway: moving from the side line to the front line. *Communications biology* 4(1): 696.

Qian, B., Guo, S., Zhou, J., Qu, X., Zhang, S. (2021): Intraglandular dissemination is a risk factor for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: a propensity score matching analysis. *Gland surgery* 10(12): 3169–3180.

Radu, T. G., Mogoantă, L., Busuioc, C. J., Stănescu, C., Grosu, F. (2015): Histological and immunohistochemical aspects of papillary thyroid cancer. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 56(2): 789–795.

Rahbari, R., Zhang, L., Kebebew, E. (2010). Thyroid cancer gender disparity. *Future oncology (London, England)* 6(11): 1771–1779.

Roa, P., Bremer, N. V., Foglizzo, V., Cocco, E. (2024): Mutations in the Serine/Threonine Kinase BRAF: Oncogenic Drivers in Solid Tumors. *Cancers* 16(6): 1215.

Rocca, A., Braga, L., Volpe, M. C., Maiocchi, S., Generali, D. (2022): The Predictive and Prognostic Role of RAS-RAF-MEK-ERK Pathway Alterations in Breast Cancer: Revision of the Literature and Comparison with the Analysis of Cancer Genomic Datasets. *Cancers* 14(21): 5306.

Romei, C., Elisei, R. (2012): RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Frontiers in endocrinology* 3: 54.

Rong Cong, Hui Ouyang, Di Zhou, Xinying Li, Fada Xia (2024): BRAF V600E Mutation in Thyroid Carcinoma: A Large-Scale Study in Han Chinese Population,

Sanabria, A., Pinillos, P., Lira, R. B., Shah, J. P., Tufano, R. P., Zafereo, M. E., Nixon, I. J., Randolph, G. W., Simo, R., Vander Poorten, V., Rinaldo, A., Medina, J. E., Khafif, A., Angelos, P., Mäkitie, A. A., Shaha, A. R., Rodrigo, J. P., Hartl, D. M., Kowalski, L. P., Ferlito, A. (2022): Current therapeutic options for low-risk papillary thyroid carcinoma: Scoping evidence review. *Head & neck* 44(1): 226–237.

Sancisi, V., Nicoli, D., Ragazzi, M., Piana, S., Ciarrocchi, A. (2012): BRAFV600E mutation does not mean distant metastasis in thyroid papillary carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97(9): E1745–E1749.

Santoro, M., Carlomagno, F. (2013): Central role of RET in thyroid cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(12): a009233.

Schmidbauer, B., Menhart, K., Hellwig, D., Grosse, J. (2017): Differentiated Thyroid Cancer-Treatment: State of the Art. *International journal of molecular sciences* 18(6): 1292.

Sezer, H., Uren, N., Yazici, D. (2020): Association between BRAFV600E mutation and the clinicopathological features in incidental papillary thyroid microcarcinoma: A single-center study in Turkish patients. *Northern clinics of Istanbul* 7(4): 321–328.

Shen, X., Zhu, G., Liu, R., Viola, D., Elisei, R., Puxeddu, E., Fugazzola, L., Colombo, C., Jarzab, B., Czarniecka, A., Lam, A. K., Mian, C., Vianello, F., Yip, L., Riesco-Eizaguirre, G., Santisteban, P., O'Neill, C. J., Sywak, M. S., Clifton-Bligh, R., Bendlova, B., ... Xing, M. (2018): Patient Age-Associated Mortality Risk Is Differentiated by BRAF V600E Status in Papillary Thyroid Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36(5): 438–445.

Shin J. H. (2017): Ultrasonographic imaging of papillary thyroid carcinoma variants. *Ultrasonography (Seoul, Korea)* 36(2): 103–110.

Silver, J. A., Bogatchenko, M., Pusztaszeri, M., Forest, V. I., Hier, M. P., Yang, J. W., Tamilia, M., Payne, R. J. (2021): BRAF V600E mutation is associated with aggressive features in papillary thyroid carcinomas ≤ 1.5 cm. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale* 50(1): 63.

Śmiech, M., Leszczyński, P., Kono, H., Wardell, C., Taniguchi, H. (2020): Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. *Genes* 11(11): 1342.

Song, Y., Bi, Z., Liu, Y., Qin, F., Wei, Y., Wei, X. (2022): Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials. *Genes & diseases* 10(1): 76–88.

Subash, A., Sinha, P., Singh, A. (2020): BRAF mutation and age in differentiated thyroid cancer risk stratification: Two sides of the same coin. *Oral oncology* 106: 104732.

Sugitani, I., Toda, K., Yamada, K., Yamamoto, N., Ikenaga, M., Fujimoto, Y. (2010): Three distinctly different kinds of papillary thyroid microcarcinoma should be recognized: our treatment strategies and outcomes. *World journal of surgery* 34(6): 1222–1231.

- Suh, C. H., Baek, J. H., Choi, Y. J., Lee, J. H. (2017): Performance of CT in the Preoperative Diagnosis of Cervical Lymph Node Metastasis in Patients with Papillary Thyroid Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *AJNR. American journal of neuroradiology* 38(1): 154–161.
- Sun, J., Zhang, J., Lu, J., Gao, J., Ren, X., Teng, L., Duan, H., Lin, Y., Li, X., Zhang, B., Liang, Z. (2016): BRAF V600E and TERT Promoter Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma in Chinese Patients. *PloS one* 11(4): e0153319.
- Takács, T., Kudlik, G., Kurilla, A., Szeder, B., Buday, L., Vas, V. (2020): The effects of mutant Ras proteins on the cell signalome. *Cancer metastasis reviews* 39(4): 1051–1065.
- Tang, H., Xue, G. (2018): Major Physiological Signaling Pathways in the Regulation of Cell Proliferation and Survival. *Handbook of experimental pharmacology* 249: 13–30.
- Tang, K. T., Lee, C. H. (2010): BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 73(3): 113–128.
- Terrell, E. M., Morrison, D. K. (2019): Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9(1): a033746.
- Toraih, E. A., Hussein, M. H., Zerfaoui, M., Attia, A. S., Marzouk Ellythy, A., Mostafa, A., Ruiz, E. M. L., Shama, M. A., Russell, J. O., Randolph, G. W., Kandil, E. (2021): Site-Specific Metastasis and Survival in Papillary Thyroid Cancer: The Importance of Brain and Multi-Organ Disease. *Cancers* 13(7): 1625.
- Tufano, R. P., Teixeira, G. V., Bishop, J., Carson, K. A., Xing, M. (2012): BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine* 91(5): 274–286.
- Vianello, F., Censi, S., Watutantrige-Fernando, S., Barollo, S., Zhu, Y. H., Albiger, N., Bertazza, L., Manso, J., Carducci, S., Benna, C., Iacobone, M., Galuppini, F., Pennelli, G., Mian, C. (2021): The role of the size in thyroid cancer risk stratification. *Scientific reports* 11(1): 7303.

Walczyk, A., Kowalska, A., Kowalik, A., Sygut, J., Wypiórkiewicz, E., Chodurska, R., Pięciak, L., Gózdź, S. (2014): The BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid microcarcinoma: does the mutation have an impact on clinical outcome?. *Clinical endocrinology* 80(6): 899–904.

Wikanta, E. R., Prajoko, Y. W., Issakh, B., Istiadi, H., Puspasari, D. (2022): Relationship between the BRAF V600E and tumor size, lymph node, and distant metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Russian Open Medical Journal* 11: e0216.

Wong, K. T., Ahuja, A. T. (2005): Ultrasound of thyroid cancer. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society* 5(1): 157–166.

Xie, H., Wei, B., Shen, H., Gao, Y., Wang, L., Liu, H. (2018): BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma (PTC) and its association with clinicopathological features and systemic inflammation response index (SIRI). *American journal of translational research* 10(8): 2726–2736.

Xing M. (2016). Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer. *BMC medicine* 14: 12.

Xing, M., Westra, W. H., Tufano, R. P., Cohen, Y., Rosenbaum, E., Rhoden, K. J., Carson, K. A., Vasko, V., Larin, A., Tallini, G., Tolaney, S., Holt, E. H., Hui, P., Umbricht, C. B., Basaria, S., Ewertz, M., Tufano, A. P., Califano, J. A., Ringel, M. D., Zeiger, M. A., ... Ladenson, P. W. (2005): BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(12): 6373–6379.

Xiong, X. J., Xiao, M. M., Zhang, Y. X., Liu, D. G., Jin, M. L., Wang, J., Xu, H. T., Li, Q. C., Wu, G. P. (2023): The Accurate Interpretation and Clinical Significance of Morphological Features of Fine Needle Aspiration Cells in Papillary Thyroid Carcinoma. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 2023: 9397755.

Xu, B., Teplov, A., Ibrahim, K., Inoue, T., Stueben, B., Katabi, N., Hameed, M., Yagi, Y., Ghossein, R. (2020): Detection and assessment of capsular invasion, vascular invasion and lymph node metastasis volume in thyroid carcinoma using microCT scanning of paraffin tissue blocks (3D whole block imaging): a proof of concept. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 33(12): 2449–2457.

Yaeger, R., Corcoran, R. B. (2019): Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. *Cancer discovery* 9(3): 329–341.

Yan, C., Huang, M., Li, X., Wang, T., Ling, R. (2019): Relationship between BRAF V600E and clinical features in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine connections* 8(7): 988–996.

Yang, Z., Heng, Y., Lin, J., Lu, C., Yu, D., Tao, L., Cai, W. (2020): Nomogram for Predicting Central Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Cancer: A Retrospective Cohort Study of Two Clinical Centers. *Cancer research and treatment* 52(4): 1010–1018.

Yang, Z., Heng, Y., Zhou, J., Tao, L., Cai, W. (2023): Central and lateral neck involvement in papillary thyroid carcinoma patients with or without thyroid capsular invasion: A multi-center analysis. *Frontiers in endocrinology* 14: 1138085.

Zhang, M., Maloney, R., Jang, H., Nussinov, R. (2021): The mechanism of Raf activation through dimerization. *Chemical science* 12(47): 15609–15619.

Zhang, W., Liu, H. T. (2002): MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* 12(1): 9–18.

Zhao, Q., Chen, M., Fu, L., Yang, Y., Zhan, Y. (2024): Assessing and projecting the global burden of thyroid cancer, 1990-2030: Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Journal of global health* 14: 04090.

Zheng, X., Wei, S., Han, Y., Li, Y., Yu, Y., Yun, X., Ren, X., Gao, M. (2013): Papillary microcarcinoma of the thyroid: clinical characteristics and BRAF(V600E) mutational status of 977 cases. *Annals of surgical oncology* 20(7): 2266–2273.

8. Životopis

Moje ime je Franko Klasić i rođen sam u Zagrebu 2000. godine. Srednjoškolsko obrazovanje stekao sam u općoj gimnaziji te sam zatim upisao preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu koji sam završio 2022. godine. Zatim sam upisao diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul imunobiologija i fiziologija te sam diplomirao 2024. godine. Tijekom obrazovanja sudjelovao sam na brojnim znanstveno-istraživačkim projektima poput 'Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi' (KK.01.1.1.04.0093) i 'Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije' (HRZZ- IP-2019-04-2237) pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Dobitnik sam STEM stipendije i Stipendije Grada Zagreba.