



Универзитет одбране у
Београду
Медицински факултет
Војномедицинске академије



Божидар Б. Ковачевић

**ЗНАЧАЈ ДЕТЕКЦИЈЕ ГЕНЕТИЧКОГ
РЕАРАНЖМАНА *EWSR1*
И НИВОА ЕКСПРЕСИЈЕ PD-L1 ПРОТЕИНА
КАО ПРОГНОСТИЧКИХ БИОМАРКЕРА У
ПАПИЛАРНОМ МИКРОКАРЦИНОМУ
ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ**

Докторска дисертација

Београд, 2021

МЕНТОР:

ВС Доц. др сц мед. Весна Шкулетић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду, Институт за патологију и судску медицину, Београд, Србија

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

ВС професор др сци. мед. Снежана Церовић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду, Институт за патологију и судску медицину, Београд, Србија

Професор др сци. мед. Светислав Татић редовни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду, Институт за патологију Београд, Србија

ВС научни саветник професор др сци. мед. Драгана Вучевић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду, Србија

САДРЖАЈ

1.0. УВОД.....	1
1.1. Карциноми штитасте жлезде.....	1
1.2. Папиларни карцином и папиларни микрокарцином (m-PTC) штитасте жлезде.....	2
1.3 Епидемиологија карцинома штитасте жлезде.....	3
1.4. Етиологија карцинома штитасте жлезде.....	4
1.5. Клиничка презентација, дијагноза и терапија m-PTC.....	5
1.6. Патохистолошке карактеристике и морфолошки параметри агресивности PTC и m-PTC.....	8
1.7. Молекуларна основа m-PTC.....	13
1.8. Генетички реаранжамани <i>EWSR1</i> у туморима штитасте жлезде.....	16
1.9. Експресија PD-L1 протеина у туморима штитасте жлезде.....	18
2.0. ХИПОТЕЗА.....	21
2.1 Циљеви истраживања.....	22
3.0. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	23
3.1. Врста студије.....	23
3.2. Селекција испитаника.....	23
3.3. Патохистолошка анализа препарата и патохистолошки параметри од значаја за истраживање.....	24
3.4. Флуоресцентна <i>IN SITU</i> хибридизација.....	27
3.5. Имунохистохемијско одређивање нивоа експресије PD-L1 протеина на туморским ћелијама.....	29
3.6. Статистичка обрада.....	30
4.0. РЕЗУЛТАТИ.....	31
4.1. Демографске карактеристике болесника.....	31
4.2. Папиларни микрокарцином штитасте жлезде – клиничко патолошке карактеристике и њихова удруженост са локализацијом тумора.....	32

4.2.1. Величина, локализација и морфолошка форма m-PTC.....	32
4.2.2. Присуство малих ћелија у m-PTC и њихова удруженост са клиничко-патолошким карактеристикама и локализацијом тумора.....	35
4.2.3. Форма раста, мултифокалност/интрагландуларно ширење, лимфатичка инвазија, васкуларна инвазија, екстратиреоидно ширење m-PTC и удруженост са локализацијом тумора.....	38
4.2.4. Интратуморска/интерстицијална фиброза, псамозна тела, стромални калцификати у m-PTC и удруженост са локализацијом m-PTC.....	41
4.2.5. Тумор инфилтришићи лимфоцити и мултинуклеарне циновске ћелије у m-PTC и удруженост са локализацијом m-PTC.....	43
4.2.6. Лимфоцитни тиреоидитис и m-PTC.....	45
4.2.7. Присуство метастаза m-PTC у лимфним чворовима врата и локализација m-PTC.....	46
4.2.8. Патолошки и клинички стадијум болести.....	48
4.3. Присуство генетичког реранжмана <i>EWSR1</i> у m-PTC.....	50
4.3.1. Повезаност демографских карактеристика (године, пол) болесника и присуство <i>EWSR1</i> реаранжмана у ћелијама m-PTC.....	52
4.3.2. Повезаност морфолошких карактеристика m-PTC и присуства <i>EWSR1</i> реаранжмана у ћелијама m-PTC	55
4.3.3. Анализа величине нуклеуса m-PTC са или без присуства генетичких измена <i>EWSR1</i> гена.....	59
4.3.4. Удруженост локализације, присуства ТИЈ, присуства МЦЋ и ЛТ са присуством <i>EWSR1</i> реаранжмана у m-PTC.....	60
4.3.5. Присуство метастаза у лимфним чворовима врата и њихова удруженост са присуством <i>EWSR1</i> реаранжама у ћелијама m-PTC.....	60
4.3.6. Патолошки и клинички стадијуми болести и њихова удруженост са присуством <i>EWSR1</i> реаранжама у ћелијама m-PTC.....	61
4.4. Експресија PD-L1 протеина у m-PTC.....	64
4.4.1. Повезаност демографских карактеристика (године, пол) болесника и експресије PD-L1 протеина на туморским ћелијама.....	66

4.4.2. Повезаност патохистолошких параметара m-PTC и експресије PD-L1 протеина на туморским ћелијама.....	67
4.4.2.1. Локализација m-PTC и експресије PD-L1 протеина.....	67
4.4.2.2. Морфолошка форма m-PTC и експресије PD-L1 протеина.....	68
4.4.2.3. Заступљеност малих ћелија у m-PTC и експресије PD-L1 протеина.....	69
4.4.2.4. Форма раста m-PTC и експресије PD-L1 протеина.....	70
4.4.2.5. Мултифокалност/интрагландуларно ширење m-PTC и експресије PD-L1 протеина.....	70
4.4.2.6. Инвазија лимфатика m-PTC, васкуларна инвазија m-PTC и експресија PD-L1 протеина.....	71
4.4.2.7. Екстратиреоидно ширење m-PTC и експресија PD-L1 протеина.....	73
4.4.2.8. Интерстицијална/интратуморска фиброза m-PTC и експресија PD-L1 протеина.....	73
4.4.2.9. Присуство псамозних тела и стромалних калцификата у m-PTC и експресија PD-L1 протеина.....	74
4.4.2.10. Присуство тумор инфилтришућих лимфоцита, мултинуклеарних циновских ћелија и PD-L1 позитивних лимфоцита у m-PTC и експресија PD-L1 протеина у туморским ћелијама.....	76
4.4.2.11. Присуство лимфоцитног тиреоидитиса и експресија PD-L1 протеина.....	78
4.4.3 Присуство метастаза у лимфним чворовима врата и експресија PD-L1 протеина у ћелијама m-PTC.....	80
4.4.4. Патолошки и клинички стадијуми болести и експресија PD-L1.....	81
5. ДИСКУСИЈА.....	83
6. ЗАКЉУЧАК.....	101
7. ЛИТЕРАТУРА.....	102

1. УВОД

1.1. КАРЦИНОМИ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ

Карциноми штитасте жлезде (ШЖ) представљају најчешће малигне туморе ендокриних жлезди, чине око 2% свих малигнитета и око 4% новодијагностикованих малигнитета код жена [1-3]. На основу хистогенезе, морфологије и клиничког понашања, ови тумори су хетерогена група малигнитета. Према пореклу, карциноми ШЖ могу настати из фоликуларних ћелија (тиреоцита) и парафоликуларних или „С“ ћелија [3, 4]. На основу степена диференцијације и биолошког понашања карциноми порекла фоликуларних ћелија могу се сврстати у категорију добро диферентованих карцинома (енг. *differentiated thyroid carcinoma*, DTC), категорију слабо диферентованих карцинома (енг. *poorly differentiated thyroid carcinoma*, PDTC) и групу недиферентованих или анапластичних карцинома (енг. *anaplastic thyroid carcinoma*, ATC). Категорија DTC обухвата папиларни карцином ШЖ (енг. *papillary thyroid carcinoma*, PTC), фоликуларни карцином ШЖ (енг. *follicular thyroid carcinoma*, FTC) и карциноме Хиртлових (онкоцитних) ћелија. Добро диферентовани карциноми нису праћени испољавањем агресивне клиничке слике и високом смртношћу. Насупрот групи добро диферентованих карцинома, PDTC и посебно ATC су тумори изузетно агресивног клиничког тока са високим степеном леталитета и просечним једногодишњим преживљавањем у 10-20% случајева [3, 4].

Карциноми порекла неуроендокриних „С“ ћелија називају се медуларни карциноми ШЖ и чине око 4% примарних епителних тумора ШЖ. Њихов клинички ток је агресивнији од клиничког тока DTC са десетогодишњим преживљавањем у 75-85% случајева [3, 4].

Најзаступљенија форма карцинома ШЖ код одраслих и деце је PTC и пријављује се у распону од 65% до 93% [1-4].

1.2. ПАПИЛАРНИ КАРЦИНОМ И ПАПИЛАРНИ МИКРОКАРЦИНОМ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ

Светска здравствена организација (СЗО) дефинише РТС као малигни епителни тумор порекла фоликуларних ћелија са карактеристичним морфолошким изменама нуклеуса. Поред нуклеране морфологије за патохистолошку дијагностику РТС неопходно је присуство папила и/или инвазивног раста тумора [3].

Папиларни микрокарцином ШЖ (енг. *papillary thyroid microcarcinoma*, m-РТС) је варијанта РТС дефинисана величином, која не означава специфичне морфолошке и цитолошке карактеристике m-РТС, већ обухвата туморе са највећим промером до 10 mm [3].

Номенклатурно означавање РТС са величином до 10 mm као m-РТС предложила је СЗО 1988. године [5]. У класификацији тумора ШЖ из 2004. године термин m-РТС се односио само на инцидентално откривене туморе [4], док се у најновијој класификацији, критеријум инциденталне детекције не наводи у дефиницији m-РТС [3]. Термином микрокарцином замењени су раније коришћени називи за РТС малих димензија за које су се примењивали термини као што су окултни или латентни карциноми [3, 4, 6]. Према номенклатури, окултни карцином односио се на m-РТС код којих је инцијално постојала клиничка презентација болести са метастазама у лимфним чворовима (ЛЧ) врата. Због свог специфичног патохистолошког изгледа ови тумори су називани и неинкапсулирани склерозирајући тумори ШЖ [7] и окултни склерозирајући карциноми [8]. Са друге стране инцидентално откривени m-РТС у ткивним узорцима ШЖ након аутопсије или након хируршког лечења због других патолошких промена у ШЖ означавани су као латентни РТС [3, 4, 9].

Чињеница да већина m-РТС показује низак малигни потенцијал, а њихова дијагноза као карцинома условљава даље лечење као у случајевима дијагнозе РТС већих димензија, утицала је на покушај преименовања термина m-РТС у папиларни микротумор. Ова терминолошка промена није обухватала m-РТС са агресивним морфолошким карактеристикама (мултифокалност, васкуларна инвазија, екстратиреоидно ширење, присуство високих ћелија) и m-РТС код болесника млађих од 19 година [10]. Због најчешће бенигног клиничког тока m-РТС, група експерата из области патологије ШЖ, као предлог преименовања предлаже терминолошко означавање m-РТС у тзв. граничну (енг. „*border line*“) лезију [11]. По угледу на примењену рекласификацију инкапсулиране фоликуларне варијанте РТС у неинвазивни фоликуларни тумор са

папиларним типом нуклеуса (енг. *Non-Invasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features*, NIFTP) [12], постоји предлог да се исти критеријуми примене и на неинвазивне m-PTC фоликуларне морфологије [13].

1.3. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ

Најзаступљенији тип карцинома ШЖ је PTC. Према објављеним резултатима студија спроведених у различитим земљама, PTC чини од 65% до 93% примарних малигнитета ШЖ [2, 3]. Половину новодијагностикованих случајева чине m-PTC [14] и представљају најчешћу варијанту PTC посебно код болесника старијих од 45 година [15].

Карциноми ШЖ дијагностикују се у свим периодима живота, укључујући и дечији узраст. Три пута чешће настају код особа женског пола, начешће у периоду између 40 и 50 година живота, док се у мушкој популацији најчешће јављају у периоду између 60 и 70 година старости [2, 3, 16].

У последњих 30 година пораст учесталости карцинома ШЖ је континуиран и присутан у свим деловима света. Разлози пораста учесталости PTC углавном се приписују раној детекцији карцинома мањих димензија услед учестале ултразвучне (УЗ) дијагностике [2, 14, 16]. Најбољи пример утицаја ране детекције m-PTC на пораст броја PTC представљају резултати УЗ скрининга који је спроведен у одређеном броју земаља. Резултати скрининга су потврдили да m-PTC постаје најчешћи или један од најчешће дијагностикованих малигнитета [17].

На укупан пораст броја PTC утиче и значајан број постоперативно дијагностикованих m-PTC као узгредних/инциденталних налаза у ШЖ болесника који су оперисани због других патолошких процеса, као и патохистолошка обрада ткива која је укључивала већи број ткивних пресека [6, 18].

Заступљеност m-PTC као узгредних налаза у аутопсијским серијама пријављује се у распону од 1% до 35,6%, док просечна заступљеност износи 11,5% [6, 9, 14, 19]. У хируршким серијама учесталост инциденталних m-PTC у узорцима ШЖ након оперативног лечења износи и до 24% узорака [20-22].

Упркос вишеструком порасту броја оболелих од PTC, стопа морталитета је константна и износи око 0,5 смртних случајева на 100000 особа [15]. Петогодишње и преживљавање од 10 година код оперисаних болесника са PTC пријављује се у 96% (5

година) и 93% случајева (10 година), док је преживљавање више од 20 година >90% случајева [3]. Прогноза тока болести болесника са m-PTC је још повољнија, а смртни исход се пријављује у мање од 1% оболелих [23, 24].

1.4. ЕТИОЛОГИЈА КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ

Етиолошки фактори настанка карцинома ШЖ су још увек недовољно разјашњени. Постоји више студија које наводе факторе који повећавају ризик настанка карцинома ШЖ као што су: инцидентална или терапијска изложеност радиоактивном зрачењу, женски пол, количина јода у ихрани [2, 25]. Радиолошка терапија тумора главе и врата и изложеност радијацији након нуклераних катастрофа у Чернобилу и Фукошими су најчешће анализирани фактори ризика у настанку PTC [26, 27]. Резултати мета-анализе из 2012. године показали су повећан ризик обољевања гојазних особа од карцинома ШЖ за 18% [28], а повећан ризик је пријављен и код болесника са шећерном болести и акромегалијом [29, 30]. Новија истраживања утврдила су и позитивну корелацију изложености хемијским материјама означеним као успоривачи горења (енг. *Flame Retardants*) и појаве PTC [31].

У резултатима већег броја студија, као фактори ризика за настанак карцинома ШЖ наводе се и бенигне болести ШЖ као што су полинодозна струма, бенигни нодуси ШЖ али и други примарни малигнитети ШЖ [3,4]. Од посебног значаја за настанак PTC су аутоимунске болести, пре свега Хашимотов тиреоидитис али и хипертиреозидизам [32-34].

На основу резултата појединих студија, особе са позитивном фамилијарном анамнезом на постојање карцинома ШЖ су у повећаном ризику за настанак PTC [2, 25].

За разлику од већине хуманих малигнитета, пушење и конзумирање алкохолних пића, према резултатима неких истраживања смањују ризик за настака карцинома ШЖ [35].

1.5. КЛИНИЧКА ПРЕЗЕНТАЦИЈА, ДИЈАГНОЗА И ТЕРАПИЈА m-PTC

Нодуси у ШЖ нису ретки, већином су бенигни и према резултатима УЗ дијагностике налазе се у око 65% опште популације [36]. Клиничка презентација нодуса је обично асимптоматска. Код нодуса већих димензија симптоми могу настати као последица компресије или инфилтрације околних анатомских структура (душник, једњак, рекурентни нерв), или у случају испољавања функционалне активности нодуса. У ове симптоме спадају осећај притиска у врату са отежаним дисањем и сметњама приликом гутања. У случају захваћености рекурентног нерва могућа је појава промуклости и бола [37, 43].

Након клиничког прегледа ШЖ, најзначајније дијагностичке процедуре су УЗ преглед нодуса и аспирациона биопсија танком иглом (енг. *Fine-Needle Aspiration Biopsy*, FNA). Због минималне инвазивности, високе сензитивности (80%) и специфичности (~100%), FNA представља најчешће коришћену дијагностичку процедуру у процени малигнитета нодуса ШЖ [37, 38].

Већина m-PTC представља инцидентални налаз након УЗ прегледа врата и ШЖ или након хируршког лечења бенигнух лезија ШЖ. Ретко, иницијалну клиничку презентацију m-PTC представља лимфаденопатија врата узрокована метастазама у регионалним ЛЧ [39]. Удаљене метастазе, као иницијална презентација m-PTC, ретке су и пријављују се као спорадични случаји [40, 41]. Клиничка презентација m-PTC је у ретким случајевима могућа услед инфилтрације душника или рекурентног нерва [42, 43].

Ултразвучно вођена FNA је ефикасна метода дијагностике малигнитета ШЖ и код тумора величине испод 10 mm [44]. Према важећим водичима Америчког удружења тиреоидолога (енг. *American Thyroid Association*, АТА) и Европског удружења тиреоидолога FNA биопсија се не препоручује за туморе ових димензија. Ове препоруке важе и уколико нодуси показују суспектне УЗ карактеристике као што су: хипоехогени изглед нодуса, микрокалцификати, инфилтративни раст и назначена разлика уздужног и попречног промера тумора. У оваквим случајевима, уз сагласност болесника, а након искључивања присуства суспектних ЛЧ предлаже се редовно УЗ праћење. Уколико нодус временом показује раст или дође до појаве локалне лимфаденопатија неопходно је спровођење FNA биопсије [38, 45]. У случајевима малих нодуса са суспектним УЗ карактеристикама, постоје и протоколи којима се препоручује

дијагностика нодуса FNA биопсијом, а биопсија је неопходна и у процени примене даљих модалитета лечења укључујући активно праћење болесника [46, 47].

Поред различитих приступа у дијагностици m-PTC ни избор лечења болесника са овим тумором још није довољно усаглашен [48]. Према АТА критеријумима, у случају солитарних, интратиреоидних m-PTC, без клинички детектованих метастаза, и у одсуству позитивне породичне историје за карциноме ШЖ, лечење лобектомијом је терапија избора [38]. Овакав терапијски приступ није опште прихваћен од стране експерата различитих профила [48, 49]. Према препорукама водећих стручњака из Јапана, клиничко праћење болесника са m-PTC не утиче на дужину преживљавања и оставља опцију накнадног хируршког лечења уколико то захтева болесник или се величина тумора повећава [50]. Са друге стране, радикалнији приступ у хирургији ШЖ у виду тоталне тиреоидектомије са или без лимфаденектомије препоручује се у случајевима присутва метастаза у ЛЧ врата. Овакав приступ се препоручује и на основу морфолошких карактеристика m-PTC попут мултифокалног раста и већег збирног промера туморских поља [51, 52].

Као и у свим хуманим малигнитетима, примењени начин лечења m-PTC зависиће од стадијума болести. На основу VIII издања AJCC/TNM (енг. *American Joint Committee on Cancer/Tumor Node Metastasis*) за стадијуме болести PTC, поред основних клиничко-патолошких параметара (величина тумора, присуство удаљених и метастаза у ЛЧ) стадијум болести се одређује и на основу година болесника и то кроз две старосне категорије. Прву групу чине болесници млађи од 55 година а другу болесници са 55 или више година старости [53, 54]. У табели 1.5.1. приказан је начин одређивања клиничког стадијума болести код болесника са PTC.

Табела 1.5.1. Начин одређивања клиничког стадијума болести код болесника са РТС

Клинички стадијуми болести код болесника са РТС млађих од 55 година			
Стадијум I	Било који Т стадијум	Било који N стадијум	M0
Стадијум II	Било који Т стадијум	Било који N стадијум	M1
Клинички стадијуми болести код болесника са РТС и 55 или више година			
Стадијум I	T1a, T1b, T2	N0	M0
Стадијум II	T3a, T3b	N0	M0
	T1a, T1b, T2, T3a, T3b	N1a, N1b	M0
Стадијум III	T4a	Било који N стадијум	M0
Стадијум IVa	T4b	Било који N стадијум	M0
Стадијум IVb	Било који Т стадијум	Било који N стадијум	M1

T – патолошки стадијум одређен величином и/или локалном проширеношћу тумора; N – патолошки стадијум одређен присуством метастаза у ЛЧ врата; N0 – нема метастаза; N1a – метастазе су присутне у ЛЧ централне регије врата; N1b – метастазе су присутне у ЛЧ латералних регија врата; M – патолошки стадијум одређен присуством или одуством удаљених метастаза.

Преузето и прилагођено из Lloyd RV. и сар., 2017., [3].

На основу приказаних података сви болесници млађи од 55 година са дијагностикованим m-РТС без присуства удаљених метастаза налазе се у првом клиничком стадијуму болести. Код болесника са 55 и више година живота присуство метастаза у ЛЧ централне (патолошки N1a стадијум) и/или латералних ложа врата (патолошки N1b стадијум) налазе се у другом клиничком стадијуму. У зависности од локализације m-РТС, у ретким случајевима могућа је и инфилтрација перитиреоидних мишића (стернохиоидни, стернотироидни или омохиоидни мишић), рекурентног нерва или душника када се болесници налазе у трећем или четвртом клиничком стадијуму болести [53, 54].

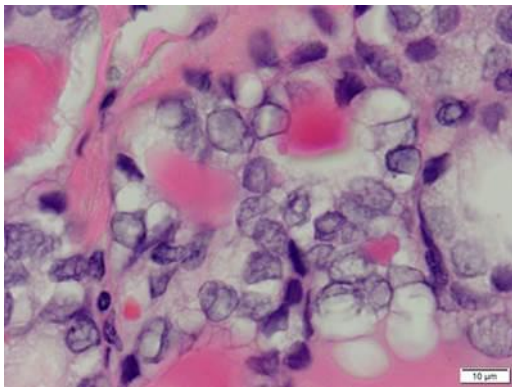
Код болесника са m-РТС у вишим стадијумима болести терапија обухвата хируршко лечење тоталном тиреоидектомијом. У зависности од проширености болести лечење обухвата и лимфаденектомију централне и латарелних ложа врата са или без накнадне примене радиоаблативне терапије јодом [38, 45-47, 50].

Повезивање стандардних и бројних молекулских параметара омогућује разликовање m-РТС различитог малигног потенцијала и од великог је значаја у процени опсежности

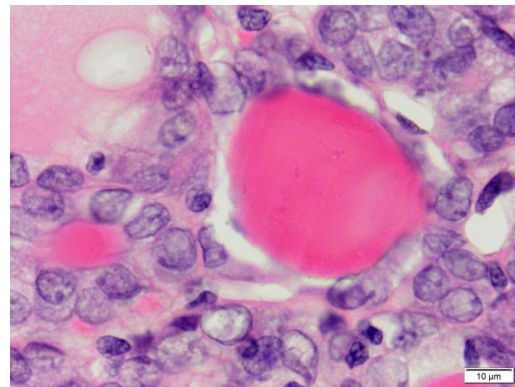
хирушког захвата и постоперативног лечења болесника у првом и другом клиничком стадијуму болести [49, 50, 55, 56].

1.6. ПАТОХИСТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ И МОРФОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ АГРЕСИВНОСТИ РТС И m-РТС

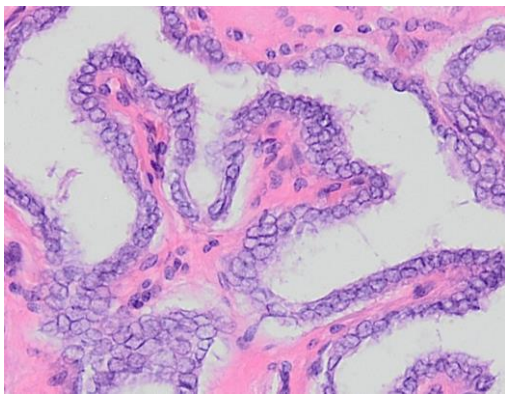
Типичну патохистолошку и дијагностички водећу карактеристику РТС представља морфологија нуклеуса његових ћелија која подразумева увећане и/или издужене, оптички светле нуклеусе са нуклеарним браздама и псеудоинклузијама (слика 1.6.1. а-г) [3, 57].



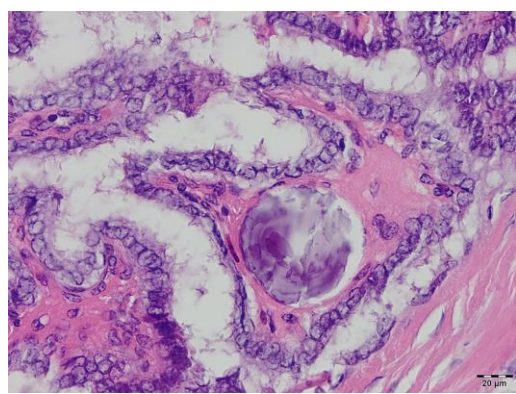
а



б



в



г

Слика 1.6.1. Карактеристике нуклеуса ћелија РТС. (а,б) Карактеристичан изглед нуклеуса ћелија РТС фоликуларне морфологије, (ХЕ* х600); (в) Неопластичне папиле, класична варијанта РТС са типичним карактеристикама нуклеуса (ХЕ* х200); (г) У строми неопластичне папиле РТС налази се једно псамозно тело (ХЕ* х400). * Хематоксилин – Еозин .

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

Степен измењености нуклеуса се према важећим препорукама може описати у оквиру нуклеарних скорова. Нуклеарне карактеристике су подељене у три категорије, а нуклеарни скор се одређује збиром нуклеарних категорија (табела 1.6.1). Туморске ћелије са нуклеарним изменама у оквиру скорa 2 и 3 (најмање присутне измене нуклеуса у две категорије) се дефинишу као ћелије са папиларним типом нуклеуса [3, 12].

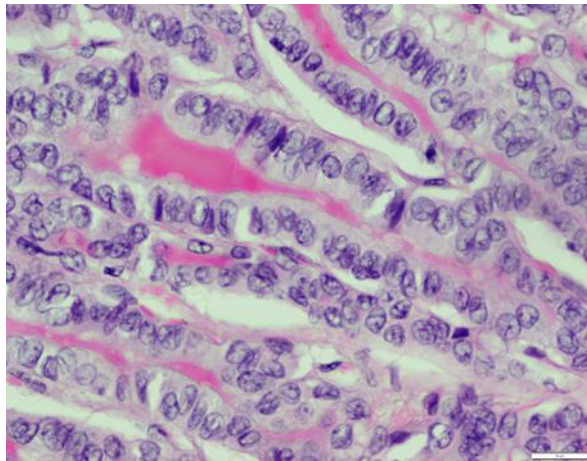
Табела 1.6.1. Категорије измена нуклеуса у ћелијама РТС

Нуклеарне карактеристике папиларног карцинома ШЖ		
Категорија 1	Величина и облик нуклеуса	Нуклеомегалија, нуклеарно преклапање и нагомилавање, елонгација нуклеуса
Категорија 2	Ирегуларности мембране	Ирегуларне контуре, нуклеарне бразде, уврати и псеудоинклузије
Категорија 3	Карактеристике хроматина	Просветљење хроматина са периферном маргинацијом и/или изглед брушеног стакла

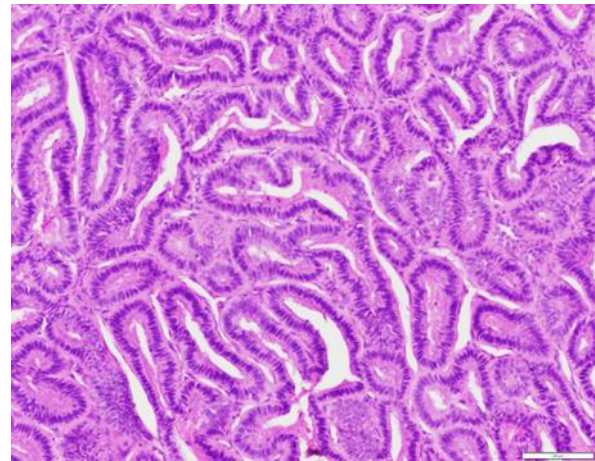
Преузето и прилагођено из Lloyd RV и сар., 2017., [3].

Као патолошко-морфолошки ентитет, РТС обухвата различите хистолошке варијанте, дефинисане морфолошком формом (папиларна, фоликуларна, солидна, макрофоликуларна, крибриформно-моруларна), изгледом граница тумора (ограничени, инфилтративни, инкапсулирани), целуларним карактеристикама (карциноми високих, цилиндричних, клинастих, онкоцитних или светлих ћелија) или величином тумора (папиларни микрокарцином) [3, 57]. Значајну морфолошку карактеристику тумора чине и псамозна тела (ПТ) која се ретко детектују у бенигним лезијама ШЖ (слике 1.6.1. г и 1.6.2. г). Туморска строма може бити неупадљива или са различитим степеном или формом фиброзе (фибробластична, дезмопластична, склеротична или строма налик нодуларном фасцитису). У строми је могуће присуство калцификата, масне или коштане метаплазије. Инфламаторну компоненту туморске строми чини лимфоцитни инфилтрат различитог степена, хистиоцити и мултинуклеарне џиновске ћелије (МЦЋ). Туморска некроза је изузетно ретка [3, 57].

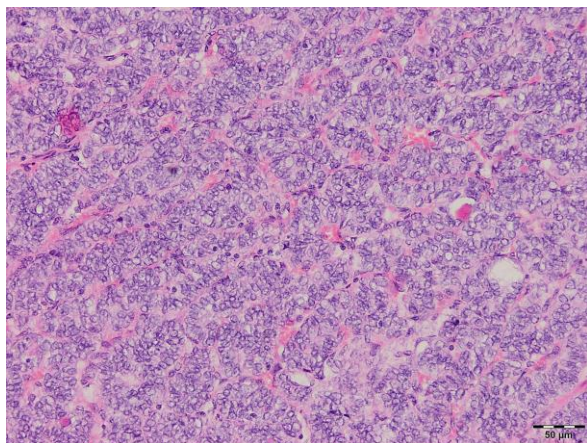
У РТС варијанте са агресивним клиничким током спадају: варијанте високих, цилиндричних или клинастих ћелија, солидна и дифузна склерозирајућа варијанта РТС, (слика 1.6.2. а-г) [3, 57, 58].



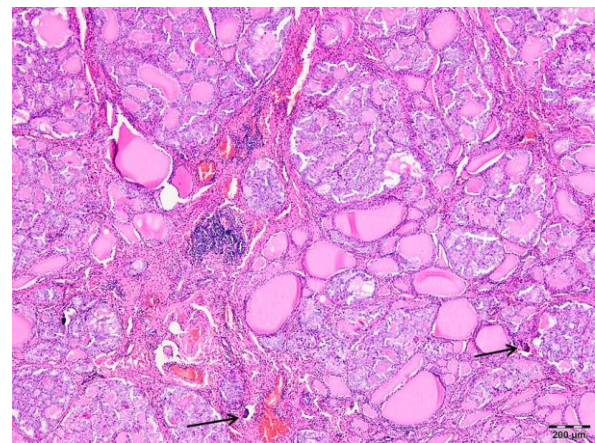
а



б



в



г

Слика 1.6.2. Агресивне варијанте РТС. (а) РТС – варијанта високих ћелија. Ћелије су еозинофилне цитоплазме, типичних нуклеарних карактеристика (ХЕ* x400); (б) РТС – варијанта цилиндричних ћелија са морфологијом налик ендометриоидном карциному; (в) РТС – солидна варијанта, (ХЕ* x400); (г) РТС – дифузна склерозирајућа варијанта, присутни су бројни туморски фокуси са или без ПТ (стрелица) окружени бенигним ткивом ШЖ. У овом случају фиброза није назначена, (ХЕ* x400). *Хематоксилин – Еозин.

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

Папиларни микрокарцином представља величином дефинисану варијанту која морфолошки може показивати све хистолошке елементе РТС већих димензија. Познавање морфолошких форми тумора и њихова детекција у m-РТС има не само

дијагностички већ и клинички значај због тога што је у оквиру овог ентитета могућа и презентација агресивних форми РТС [57, 59, 60].

Карактеристичан макроскопски изглед m-РТС приликом обраде ткива ШЖ је изглед налик ожиљку (слика 1.6.3. а, б). Туморско поље је звездастог или троугластог изгледа, „жилавије“ конзистенције са или без микрокалцификација. Јасно ограничени тумори су овалног изгледа са или без капсуле, а туморе најмањих димензија, најчешће макроскопски није могуће препознати.



а

б

Слика 1.6.3. Макроскопски изглед m-РТС. (а) Стрелицом је означен периферно локализован овалан туморски нодус m-РТС у десном режњу ШЖ; (б) Стрелица беле боје означава периферно локализовани m-РТС у левом режњу жлезде. Црвеном стрелицом је означен метастатски измењен ЛЧ везан за доњи пол левог режња.

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

Величина m-РТС креће се од 0,1 mm када тумор обично чине неколико неопластичних фоликула и/или интрафоликуларних ћелијских набора. Већи број студија је показао да m-РТС већи од 5 mm имају агресивнији клинички ток и неповољнији исход. Резултати неких истраживања указују да збирни промер туморских поља у случају мултифокалног раста m-РТС представља неповољан прогностички параметар [51, 52, 61, 62].

Примарно, m-РТС може бити локализован у периферним/субкапсуларним или централним/интрапаренхимским зонама свих анатомских делова ШЖ [3, 4]. Појава m-РТС описана је и унутар ектопичног ткива ШЖ сублингвалне локализације, тиреоглосног канала или оваријалне струме [63-65]. Према објављеним резултатима

код болесника са периферно локализованим m-PTC чешће долази до појаве метастаза у ЛЧ [55, 66].

Независно од примарне локализације, важну морфолошку карактеристику m-PTC представља мултифокални раст тумора. Мултифокално присуство m-PTC у ткиву ШЖ може бити последица мултицентричног раста тумора (синхроно или метахроно појављивање неколико туморских фокуса) или је чешће последица интрагландуларног ширења (ИГШ) малигнитета. Хистолошко разликовање ових форми мултифокалне презентације m-PTC, често није могуће. Као секундарни туморски фокуси у оквиру ИГШ рачунају се издвојена ПТ унутар строме ШЖ и лумена лимфатика као и туморска поља без стромалне реакције [55, 67]. Мултифокалност (МТФ) се у m-PTC детектује у 15,5% до 40% случајева, а представља независни прогностички параметар у односу на рану појаву метастаза ЛЧ врата [18, 49, 51, 52, 55, 61, 62].

Класична и фоликуларна морфологија или мешовита класично/фоликуларна слика најчешће су присутне у m-PTC. Остале хистолошке форме, укључујући и агресивне типове попут m-PTC са високоћелијском и солидном морфологијом су ретке и налазе се најчешће у мање од 11% случајева [68]. Агресивност m-PTC је најчешћа код тумора грађених од високих ћелија, док m-PTC класичне морфологије имају мање повољну прогнозу од тумора фоликуларне морфологије [68, 69].

Најзаступљенија форма туморског раста m-PTC је инфилтративна, ређе ограничена/експанзивна или инкапсулирана. Инфилтративна форма раста m-PTC чешће је агресивнија и везана за појаву локо-регионалних рецидива и метастаза у ЛЧ врата [70]. Позитивна корелација са налазом метастаза у регионалним ЛЧ доказана је код назначене ИТФ у m-PTC, случајевима лимфоваскуларне инвазије и повећане густине перитуморских лимфатика [55, 71].

Значајан прогностички фактор агресивности m-PTC представља и ЕТШ. На основу захваћености перитиреоидних хистолошких и анатомских структура ЕТШ се дели на минимално/микроскопско када тумор показује продор у перитиреоидно везивно и масно ткиво и макроскопско када тумор захвата скелетне мишиће, душник, рекурентни нерв или једњак. Према новој АЈСС/ТНМ класификацији само макроскопско ЕТШ представља локално проширену болест у патолошком Т3b стадијуму и удружено је са ранијом појавом рецидива и краћим петогодишњим преживљавањем болесника са РТС [53, 72].

Поред наведених патолошких фактора који се повезују са потенцијално агресивнијим понашањем m-PTC, у неповољне прогностичке параметре спадају и старост болесника (<45 година) и мушки пол [61, 68, 73, 74].

Због тога што су удаљене метастазе и локална проширеност микрокарцинома као елементи агресивности изузетно ретки, најзначајнији клиничко-патолошки елемент агресивности m-PTC је присуство метастаза у регионалним ЛЧ врата. Метастазе m-PTC у ЛЧ врата пријављују се у распону од 2% до 64% и утичу на избор лечења и прогнозу болести [14, 18, 23, 24, 38, 49, 52, 55, 56, 59, 61, 62, 66, 67, 69, 70, 73, 74].

1.7. МОЛЕКУЛАРНА ОСНОВА m-PTC

У последње две деценије учињен је значајан напредак у разумевању повезаности генетичких измена, биолошког понашања и клиничко-патолошких карактеристика m-PTC. Најчешће детектоване генетичке измене у m-PTC доводе до активације пута преноса сигнала MAP киназа (митогеном активирани киназе) [75].

У процесима неопластичне трансформације који доводе до развоја PTC, ванћелијски индуктори који покрећу сигнал након везивања за рецепторе, покрећу сигнални пут MAP киназе. Рецептор за који се везује ванћелијски индуктор који покреће сигнал бива фосфорилисан. Фосфорилисани рецептор ступа у интеракцију са протеином GRB-2 (енг. *Growth factor receptor-bound protein 2*). Потом, протеин GRB-2 ступа у интеракцију са фактором SOS (енг. *Son of sevenless*) Овај фактор врши замену молекула GDP који је везан за неактивни протеин Ras молекулом GTP. Везивањем молекула GTP активира се протеин Ras. Активирани протеин Ras активира протеин Raf (киназа киназе MAP киназе). Следи каскадна реакција активације киназа. Raf киназа активира киназу MEK (киназа MAP киназе), а киназа MEK активира киназу ERK (енг. *Extracellular signal-regulated kinases*; киназа MAP). Киназа MAP има способност фосфорилације бројних супстрата, од којих су неки и регулаторни протеини транскрипције [75, 76]. Регулацијом експресије различитих гена активирани сигнални пут MAP киназе утиче на раст, пролиферацију, апоптозу и метаболичку активност ћелија [75].

Молекуларне измене сигналног пута MAP киназе региструју се у различитим фазама неопластичне трансформације m-PTC и то најчешће као тачкасте мутације у генима *BRAF* и *RAS* или генетички реаранжмани *RET-PTC* [77].

Ген *BRAF* је локализован на седмом хромозому (7q34) и кодира протеин (B-Raf) који припада породици Raf протеина (енг. *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog*). Тачкасте мутације у гену *BRAF* представљају најчешћу и најчешће анализирану генетичку измену у m-PTC. У више од 95% случајева m-PTC детектује се V600E *BRAF* мутација којом долази до замене тимиона аденином на позицији 1799 (T1799A) на егзону 15, што у крајњем резултату доводи до супституције валина у глутамин на позицији 600 (V600E). Као последица мутације V600E *BRAF* гена, B-Raf киназа прелази у активну форму која показује пораст киназне активности готово пет стотина пута [75, 78].

Просечна заступљеност тачкасте мутације V600E *BRAF* у класичној варијанти PTC је око 45% док је у варијанти високих ћелија присутна у распону од 80% до 100% [75]. У више студија, присуство мутације V600E *BRAF* у PTC показивало је позитивну корелацију са агресивним карактеристикама тумора као што су ЕТШ, појава рецидива болести, удаљених и метастаза у ЛЧ врата, као и узрапредовали стадијум болести у тренутку дијагностике [75, 78].

Према резултатима две мета-анализа, мутација V600E *BRAF* детектује се у 50,7% и 57,0% случајева m-PTC [77, 79]. Због високе заступљености сматра се да ова мутација представља рану генетичку измену у канцерогенези, и да је одговорна за прогресију m-PTC у PTC [12]. Морфолошке особине m-PTC са мутацијом V600E *BRAF* карактерише инвазивни раст, назначена дезмоплазија строме, класична морфологија и морфологија високих ћелија [80, 81]. Након иницијалне детекције мутације V600E *BRAF* у m-PTC, резултати бројних студија показали су њену повезаност са агресивним биолошким карактеристикама овог микрокарцинома [80-83].

Значај мутације V600E *BRAF* као биомаркера агресивности m-PTC је још увек нејасан. Широком применом генетских анализа и анализом резултата на великом броју m-PTC показано је да је мутација V600E *BRAF* заступљена у далеко већем броју m-PTC од броја m-PTC који у тренутку дијагностике и/или еволуције болести испоље клиничко-патолошке елементе агресивности [77, 70]. Због тога је предложено обједињавање морфолошких карактеристика m-PTC (које укључују периферну локализацију, назначену ИТФ и интрагландуларно ширење микрокарцинома) са присуством мутација V600E *BRAF* и одређивање молекуларно-патолошког скорa. Према добијеним резултатима молекуларно-патолошког скорa m-PTC се сврставају у три категорије. Прву групу чине m-PTC ниског молекуларно-патолошког скорa са вредностима од 0 до 2. Другу групу чине m-PTC средњег молекуларно-патолошког скорa са вредностима 3.

У трећу групу сврстани су m-PTC са високим молекуларно-патолошким скором 4. Припадност m-PTC групи високог ризика подразумева велику вероватноћу рецидива болести и појаву метастаза у ЛЧ [55].

Поред тачкасте мутације V600E *BRAF*, измене у гену *BRAF* детектоване су и као тачкасте мутације K601E *BRAF*, E611K *BRAF*, мале делеције или инсерције у околини кодона 600 и *AKAP9-BRAF* реаранжмани [77, 84].

У PTC и m-PTC детектоване су тачкасте мутације у сва три гена који кодирају протеине Ras. Хумани гени *HRAS* (енг. *Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), *NRAS* (енг. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*) и *KRAS* (енг. *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) кодирају протеин Ras класе G који има централну улогу у активацији сигналних путева MAP и PI3 (фосфатидилинозитол 3) киназе. Тачкасте мутације *RAS* гена доводе до настанка протеина који показују повишени афинитет за GTP (мутације на кодонима 12 и 13), или имају способност инхибиције аутокаталитичке GTP-азне функције (мутација на кодону 61) [85]. Оба ова механизма доводе до непрекидне, аберантне активације нисходних ефектора у сигналним путевима MAP и PI3 киназа. У неоплазмама ШЖ доминира мутациона изоформа *NRAS* 61(Q61R; c.182A>G) [85]. Тачкасте мутације *RAS* гена нису специфичне за малигнитете ШЖ већ се детектују и у бенигним лезијама (фоликуларним аденомима и аденоматозним нодусима). Присуство мутација у гену *RAS* у PTC је повезано са фоликуларном морфологијом тумора, чешћим ограниченим формама раста са или без присуства капсуле, мање израженим нуклеарним променама типичним за PTC и ређом појавом метастаза у ЛЧ [12, 78]. У m-PTC тачкасте мутације у *RAS* гену налази се у око 4% анализираних тумора. Присуство ове генетичке измене није показало повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама m-PTC осим чешће појаве фоликуларне морфологије [77, 86].

Прото-онкоген *RET* (енг. *rearranged durinug transfection; RET*) локализован је на хромозому 10q11.2 и кодира трансмембрански рецептор са тирозин-киназном активношћу који је укључен у регулацију процеса ћелијске диференцијације и пролиферације. Прото-онкоген *RET* се уобичајено експримира у парафоликуларним ћелијама ШЖ [87, 88]. У фоликуларним ћелијама прото-онкоген *RET* се налази у неактивном стању, а до његове активације долази након појаве генетичких измена типа хромозомских реаранжмана означених као *RET-PTC*. У овим реаранжманима,

најчешће, путем интрахромозомске парацентричне инверзије, долази до фузије 3' дела *RET* гена са 5' делом неколико различитих гена. До сада је идентификовано 13 различитих типова *RET-PTC* реаранжмана од којих су најчешћи *RET-PTC1*, *RET-PTC3* и *RET-PTC2*. Генетички реаранжмани *RET-PTC* показују подједнаку заступљеност у класичној и фоликуларној варијанти РТС, и детектују се у распону од 5-35% случајева [3, 88]. Према резултатима мета-анализе из 2017. године заступљеност *RET-PTC* реаранжмана у m-РТС је 44% што представља другу најчешћу генетичку измену у m-РТС [77]. Повезаност реаранжмана *RET-PTC1* са класичном морфологијом и реаранжмана *RET-PTC3* са солидном морфологијом у РТС није показана у туморима мањим од 10 mm [77]. Осим *RET-PTC3* реаранжмана који се детектује у РТС агресивнијег биолошког понашања, карциноми са *RET-PTC1* реаранжманом су најчешће класичне или предоминантно класичне морфологије, ниског малигног потенцијала и могу се описати као тумори са такозваним „Бонсаи“ фенотипом [89].

Поред наведених генетичких измена, досадашња истраживања показала су позитивну корелацију повећане експресије гена *MEDAG*, *S100A4*, *CCND1*, *ERAP2*, *HGF*, *COX2*, *RB1*, *EPCAM* у m-РТС, као и позитивну корелацију смањене експресије гена *P27*, *Bcl2*, *CDKN1B* и *KAI1* са појавом метастаза у регионалним ЛЧ [90-92].

Новији резултати су показали да присуство мутације у гену *TERT* (енг. *Telomerase Reverse Transcriptase*) у РТС представља неповољан прогностички параметар [3]. Међутим, постоје само две студије везане за детекцију ове мутације у m-РТС које не утврђују њен индивидуални значај у односу на клиничке параметре тумора [93] осим у случају њене удружености са V600E *BRAF* мутацијом и појавом метастаза у ЛЧ латералних регија врата [91].

1.8. ГЕНЕТИЧКИ РЕАРАНЖМАНИ *EWSR1* У ТУМОРИМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ

Ген Јуинг саркома региона 1 (енг. *Ewing sarcoma breakpoint region 1*, *EWSR1*) је локализован на хромозому 22q12 и кодира мултифункционални протеин EWS (енг. *Ewing sarcoma protein*, - EWS). Протеин EWS испољава своју биолошку улогу у

процесима регулације експресије гена на нивоу иницијације транскрипције, путева преноса сигнала и транспорта iRNK [94, 95]. Поред улоге у регулацији експресије, показана је и његова улога у процесима одговорним за очување интегритета генома [94, 95]. Хромозомске транслокације између овог и других гена који кодирају регулаторне протеине транскрипције доводе до експресије фузионисаних протеина са онкогеним потенцијалом који су одговорни за неопластичну трансформацију ћелија пре свега мезенхимних неоплазми али и тумора епителног порекла [96, 97]. Рearанжмани *EWSR1* гена са различитим генима партнерима повезани су са специфичним морфологијом тумора која укључује ситноћелијски фенотип, фенотипе вретенастих и светлих ћелија, као и туморе са назначеном миксоидном стромом [96].

Јуинг саркома фамилију тумора (енг. *Ewing Sarcoma family of tumours*, ESFT) чине тумори са ситноћелијским фенотипом и молекуларним карактеристикама које укључују реципрочне транслокације између *EWSR1* гена и гена *ETS* (енг. *E-twenty-six*) фамилије транскрипционих фактора. Две најчешће генетичке измене у ESFT укључују фузију гена *EWSR1* са геном *FLI1* (енг. *Friend leukemia integration 1*) или *ERG* (енг. *Erythroblast transformation-specific*) геном које се описују у 85% и 10% случајева [96, 97]. Рearанжмани *EWSR1* гена присутни су и у малом броју немезенхимних тумора укључујући бенигне и малигне миоепителне туморе плјувачних жлезди, хијалинизирајући светлоћелијски карцином плјувачних жлезди [98-100], хидраденом коже [101], светлоћелијски одонтогени карцином [102] и светлоћелијски карцином тимуса [103]. Ретки случајеви *EWSR1* рearанжмана описани су и карциномима бубрега и аденокарциному колона [104, 105].

У туморима ШЖ, ситноћелијски карцином ШЖ са елементима Јуингове фамилије тумора (енг. *Small-cell Carcinoma of the Thyroid with Ewing Family Tumour Elements*, - SEFTE) карактеристично садржи транслокацију 11;22(q24;q12) која доводи до фузије *EWSR1-FLI1* [106-108]. Ова генетичка измена се налази и у ретким случајевима РТС што сугерише могуће порекло SEFTE из РТС и могући ефекат *EWSR1-FLI1* транслокације на губитак диференцијације и стицање ситноћелијског фенотипа у РТС. У току 2017. године први пут су публиковани резултати студије у којој је нађена висока заступљеност *EWSR1* генетичког рearанжмана са непознатим генима партнерима код 51,9% РТС. Резултати ове студије нису показали позитивну корелацију присуства генетичког рearанжмана *EWSR1* са клиничко-патолошким карактеристикама тумора, али је нађено његово чешће присуство у класичној форми [106].

1.9. ЕКСПРЕСИЈА PD-L1 ПРОТЕИНА У ТУМОРИМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ

Лиганд 1 рецептора програмиране ћелијске смрти (енг. *Programmed death ligand-1*, PD-L1) припада фамилији B7 трансмембранских протеина (гликозил-фосфатидилинозитол везујући протеини) или имунорегулаторних лиганата [109].

У структури PD-L1 протеина разликују се екстрацелуларни IgV и IgC домени, трансмембрански домен и мали интрацитоплазматски домен. Ген *PDCD1LG1* (енг. *Programmed Cell Death 1 Ligand 1*) локализован на хромозому 9p24,2 кодира овај протеин. PD-L1 протеин је сачињен од 290 аминокиселина и има молекулску масу 33,3 kDa. Терминолошки PD-L1 молекул се означава и као B7-H1, а према тзв. CD (енг. *Cluster of Differentiation*) номенклатури и као CD274 [109, 110].

Присуство (експресија) PD-L1 протеина различитог интензитета и дистрибуције детектовано је у здравим ћелијама и органима као што су плућа, срце, мокраћна бешика, ендотел, слезина, мезенхималне матичне ћелије, ћелије панкреасних острваца, астроцити, неурони и кератиноцити. Присуство PD-L1 је нађено и на тзв. имунолошки привилегованим местима као што су епителне и ендотелне ћелије рожњаче и синциотиотрофобласти плаценте. Присуство PD-L1 је показано и у „нормалним“ хематолошким ћелијама, односно активираним Т и В лимфоцитима, дендритским ћелијама и макрофагима [110, 111].

Интеракција PD-L1 молекула са рецептором PD-1 (CD279), рецептором програмиране ћелијске смрти (енг. *Programmed cell death protein*, PD-1) је неопходна за функционалну активацију PD-L1. У физиолошким условима ова интеракција омогућава контролу имунског одговора и одржавање имунолошке хомеостазе. Такође, ова интеракција има важну улогу у спречавању оштећења ћелија или ткива узрокованих продуженим и/или интензивним инфламаторним одговором као и аутоимунским деловањем ћелија имунског система [110-112].

Активирање сигналног пута PD-1/PD-L1, током инфекције или инфламације, има важну улогу у „смањењу“ имунског одговора, механизмима који укључују инхибицију TCR (енг. *T Cell Receptor*) - посредоване пролиферације Т лимфоцита, блокаду секреције цитокина и индукцију диференцијације регулаторних Т лимфоцита (Treg).

Једна од кључних улога у очувању периферне толеранције имунског система остварује се управо преко сигналног пута PD-1/PD-L1 који спречава оштећење ткива до кога би могло доћи деловањем аутореактивних Т ћелија. Клинички значај патолошке

активације сигналног пута PD-1/PD-L1 најбоље је показан у његовом утицају на развој аутоимуних болести [111, 112].

Као резултат константне активације онкогених сигналних путева и генетичке измењености, ћелије тумора и туморске строме стичу способност експримирања тумор-специфичних антигена, укључујући PD-L1 [113]. Поред континуиране активације онкогених сигналних путева, испољеност PD-L1 протеина на туморским ћелијама и тумор инфилтришућим лимфоцитима (ТИЛ) је и под утицајем функционалних, имуномодулаторних молекула микросредине тумора попут интерферона гама (IFN- γ), интерлеукина (IL) - 10, интерлеукина - 4 (IL-4) и фактора васкуларног ендотела. Ове имуномодулаторне молекуле продукују тумору придружене ћелије које су део имунског система, најчешће ТИЛ [112, 113]. Способност туморских ћелија да испоље PD-L1 омогућава инхибицију антитуморског имунског одговора (који је доминантно посредован деловањем Т лимфоцита) и „утишавање“ имунолошког надзора. Активирање сигналног пута PD-1/PD-L1 доводи до исцрпљивања, дисфункције, анергије и коначно апоптозе специфичних Т лимфоцита. Последице, у туморској микросредини долази до измењености броја и функције ћелија имунског система. Повећава се број ћелија и медијатора који делују подстицајно на раст тумора, а смањењује се број ћелија и медијатора имунског система који испољавају антитуморски ефекат. Посебан значај има смањење броја CD8+ цитотоксичних Т лимфоцита и повећање броја Treg лимфоцита чиме је омогућено преживљавање и прогресија тумора [110,112, 113].

Експресија PD-L1 протеина је доказана у различитим типовима малигнитета укључујући меланом, глиобластом, неситноћелијске карциноме плућа, карциноме бубрега, мокраћне бешике, панкреаса, грлића материце и јајника [110, 114]. Све је више истраживања која се баве улогом PD-L1 молекула у настанку и развоју тумора. Међутим, утицај експресије овог молекула на прогресију и клинички ток болести није до краја истражен, а досадашњи резултати нису уједначени. Малигнитети попут хепатоцелуларног карцинома, затим карциноми желуца и панкреаса показују позитивну корелацију између експресије PD-L1 протеина и неповољног клиничког тока болести. Насупрот овоме, у карциномима дојке, назофаринкса и карциному Меркелових ћелија испољеност PD-L1 корелише са бољом прогнозом болести. Истовремено, резултати студија на неситноћелијским карциномима плућа, меланомима, карциномима једњака и јајника су неуједначени и показују позитивну или негативну повезаност експресије PD-L1 протеина и тока болести чиме се веома компликује одговор на питање какав

предиктивни значај има испитивање експресије овог молекула у поменутиим патологијама [114-118].

У веома малом броју студија је анализиран значај експресија PD-L1 протеина у различитим типовима карцинома ШЖ. Учесталост детектоване експресије PD-L1 молекула у поменутиим истраживањима се креће у распону од 6,1% до 82,5% у РТС и између 22,2% и 81,2% у АТС [119-121]. Резултати студија о значају PD-L1 експресије у РТС нису конзистентни. Највећи број резултата указује да је присуство PD-L1 у РТС повезано са већим ризиком за појаву рецидива болести. Показана је и значајније већа експресија овог молекула у РТС код болесника са Хашимотовим тиреоидитисом. Експресија PD-L1 у РТС најчешће није показивала значајну повезност са годинама и полом болесника, као и величином тумора и стадијумом болести. Само је у појединим студијама показана позитивна корелација повећаног нивоа PD-L1 у РТС са мултифокалним и инвазивним растом РТС, ЕТШ и појавом метастаза [119-122].

Присуство PD-L1 у m-РТС анализирано је само у оквиру малобројних студија у којима је поред РТС већих димензија обухваћен и одређени број тумора мањих димензија (са највећим промером до 10 mm) [122, 123]. Chowdhury S и сар. пријавили су мембранску и цитоплазматску имуноекспресију PD-L1 молекула на туморским ћелијама у 52,2% (на мембрани) и 61,6% (у цитоплазми) анализираних m-РТС [123]. У истраживању Aghajani MJ и сар., у серији од 75 РТС, 39 случајева била су m-РТС, а цитоплазматска и/или мембранска имуноекспресија на туморским ћелијама за PD-L1 детектована је у 66,7% РТС [122]. У серији од 10 РТС са коегзистирајућим ЛТ, два случаја била су m-РТС и у оба случаја, ћелије тумора су показале мембранску експресију PD-L1 [124].

Према доступној литератури до сада нису рађена истраживања у којима је испитиван прогностички значај нивоа експресије PD-L1 и присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* и њихова корелација са клиничко-патолошким карактеристикама m-РТС, посебно са специфичним формама и локализацијама m-РТС.

2.0. ХИПОТЕЗА

Полазећи од свега наведеног у уводном делу поставили смо следећу хипотезу истраживања:

Присуство генетичког реаранжмана *EWSR1*, имунохистохемијска експресија PD-L1 протеина и периферна локализација m-PTC представљају предиктивне маркере који указују на чешћу појаву метастаза у регионалним лимфним чворовима оболелих.

2.1. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Испитати присуство реаранжмана *EWSR1* у m-PTC код болесника са учињеном тоталном тиреоидектомијом.
2. Испитати корелацију између присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* у m-PTC и појаве метастаза у регионалним лимфним чворовима врата оболелих.
3. Испитати корелацију између присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* у m-PTC и клиничко-патохистолошких карактеристика тумора.
4. Испитати ниво имунохистохемијске испољености PD-L1 протеина у m-PTC код болесника са учињеном тоталном тиреоидектомијом.
5. Испитати корелацију између нивоа имунохистохемијске испољености PD-L1 протеина у m-PTC са клиничко-патохистолошким карактеристикама тумора.
6. Испитати корелацију између периферне локализације m-PTC и клиничко-патохистолошких карактеристикама тумора.
7. Испитати корелацију између периферне локализације m-PTC и присуства генетичког реаранжмана *EWSR1* код болесника са метастазама у регионалним лимфним чворовима и упоредити са налазима код болесника без метастаза.
8. Испитати корелацију између периферне локализације m-PTC и нивоа испољености протеина PD-L1 код болесника са метастазама у регионалним лимфним чворовима и упоредити са налазима код болесника без метастаза.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

Ова ретроспективна студија је одобрена од стране етичког комитета Војномедицинске академије од 30 октобра 2018. године и Ректората Универзитета одбране, Београд, Србија (одлука број 16-71 од 25.05.2019.).

3.2. СЕЛЕКЦИЈА ИСПИТАНИКА

Из архиве Института за патологију и судску медицину (ИПСМ) Војномедицинске академије у периоду од јануара 2013. године до децембра 2018. године, из хируршког материјала добијеног тоталном тиреоидектомијом са или без лимфаденектомије издвојена је група m-PTC на основу највећег промера тумора (од 5 mm до 10 mm). Код свих случајева класификација тумора учињена је према IV издању СЗО класификације тумора ШЖ [3] и одређен је стадијум болести на основу VIII издања AJCC/TNM за стадијуме болести карцинома ШЖ [53]. У селектованој групи болесника анализирана је заступљеност m-PTC према полу и старости, посебно кроз две старосне категорије. Прву групу чинили су испитаници млађи од 55 година старости, а другу испитаници са 55 или више година. У студију нису укључени болесници са дијагностикованим m-PTC након учињене лобектомије, болесници са m-PTC мањим од 5 mm, болесници са тумором већим од 5 mm уколико је након рутинске и/или интраоперативне („ex tempore“) патохистолошке дијагностике дошло до значајне редукције или губитка туморског ткива у парафинским блоковима. Такође, у студију нису укључени болесници који су примали имуносупресивну терапију због њеног потенцијалног утицаја на ниво експресије PD-L1 молекула.

3.3. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА ПРЕПАРАТА И ПАТОХИСТОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ ОД ЗНАЧАЈА ЗА ИСТРАЖИВАЊЕ

Анализа патохистолошких препарата учињена је на исечцима ткива из парафинских блокова дебљине 4 μm , бојеним стандардном хематоксилин-еозин (ХЕ) методом. Анализом су обухваћени следећи патохистолошки параметри:

- Величина тумора, у случају мултифокалног раста, туморско поље са највећим промером сматрано је примарним туморским фокусом и у њему су анализирани патохистолошки параметри од значаја за студију. У случају постојања два туморска поља исте величине, као примарни туморски фокус сматрано је поље m-PTC са фиброзном реакцијом строме и инфилтративним растом [67].

- Присуство метастаза у ЛЧ врата је анализирани на најмање два серијска пресека; одређен је број метастаза и анатомска локализација метастатски измењених ЛЧ (метастазе централне и/или ЛЧ латералних ложа врата) на основу топографије регија ЛЧ врата која се примењује у хирургији главе и врата [125].

- Локализација тумора је одређена у односу на површину ШЖ као периферна или интрапаренхимска. Перифери/суперфицијални/субкапсуларни m-PTC је дефинисан као тумор локализован непосредно испод перитиреоидног масног ткива (без бенигног ткива ШЖ између тумора и перитиреоидног меког ткива) у најмањој дужини од 20% обима тумора. Интрапаренхимска локализација дефинисана је као m-PTC који је у целости окружен бенигним ткивом ШЖ [55].

- Морфолошка форма m-PTC одређена је према критеријумима СЗО за класификацију хистолошких варијанти PTC (класична/папиларна, фоликуларна, солидна, форма високих ћелија и др.) величине изнад 10 mm [3].

- Због претпостављеног утицаја присуства *EWSR1* генетичког реаранжмана, а пре свега реципрочне транслокације *EWSR1-FL11* на појаву ситноћелијског фенотипа у m-PTC анализирано је присуство малих ћелија у узорцима ткива тумора. Број малих ћелија је одређен семиквантитативно на читавој површини пресека тумора и у резултату је представљен као проценат укупног броја ћелија. Мале ћелије смо дефинисали као ћелије мање од околних ћелија m-PTC, не веће од четвороструке величине лимфоцита. Основне морфолошке особине малих ћелија обухватале су: оскудну или неупадљиву цитоплазму, хиперхроматични нуклеус са овалном или неправилном контуром или нуклеуси који показују некомплетно изражене карактеристике нуклеуса PTC (умерена нуклеомегалија са просветљењем хроматина уз

или без присуства нуклеарних бразди и псеудоинклузија). На основу ових параметара нису анализиране групе ћелија са хиперхроматичним и деформисаним нуклеусима које су нађене уз ресекционе маргине периферно локализованих m-PTC и које су биле интраоперативно артефицијално измењене [126]. Међутим, ћелије са умереним степеном ирегуларности локализоване у централним деловима тумора, окружене малим ћелијама очуване морфологије и/или типичним ћелијама PTC прихватили смо у оквиру исте групе. Разлог томе је особина ових ћелија да често подлежу секундарним артефицијалним изменама у току патохистолошке обраде ткива [127]. На основу присуства малих ћелија анализиране туморе смо поделили у две групе. Прву групу, чинили су m-PTC са најмање 1% малих ћелија, а другу групу m-PTC без присуства малих ћелија.

- Мултифокалност/интрагландуларно ширење (МФР/ИГШ) m-PTC дефинисани су као налаз два или више издвојених туморских фокуса или као мали туморски агрегати локализовани у непосредној близини доминантног туморског поља од кога су одвојени бенигним ткивом жлезде или као туморске ћелије унутар лимфатика или изолована ПТ изван тумора локализована у строми ШЖ [55].

- Форма раста (инфилтративни или експанзиван/ограничен); Инфилтративни m-PTC дефинисани су као тумори ирегуларних, назубљених ивица које показују ширење у околину или као продор најмање три тиреофоликула у околно бенигно ткиво жлезде. Насупрот томе m-PTC са експанзивним/ограниченим растом представљали су јасно ограничене или туморе који експанзивно гурају околно ткиво и не показују продор више од три тиреофоликула у околно бенигно ткиво ШЖ [70].

- Инвазија лимфатика и васкуларна инвазија (присутна, одсутна); Лимфатичка инвазија дефинисана је као директни продор туморских ћелија у лимфне судове или као присуство туморских емболуса и/или ПТ унутар едотелом оивичених простора перитуморског и перитиреоидног ткива [128]. Васкуларна инвазија је била присутна уколико је постојао директни продор туморских ћелија кроз зид васкуларних простора глаткомишићних зидова и/или простора са интралуминалним присуством еритроцита како су претходно описали Mete и Asa [129].

- Процена ЕТШ учињена је на основу критеријума VIII издања AJCC/TNM [53] и одређене су две групе. Једну групу чинили су m-PTC без ЕТШ (у случајевима када је оно одсутно или присутно као микроскопска форма) и другу групу m-PTC са присутним макроскопским ЕТШ. Микроскопско ЕТШ подразумевало је продор тумора у перитиреоидно везивно и масно ткиво без захватања околних мишића. Макроскопско

ЕТШ подразумевало је инфилтрацију околних мишића, или органа (једњак, рекурентни нерв, душник). У нејасним случајевима, када је туморско ткиво било присутно на хируршким маргинама ресекције учињена је корелација са оперативним и преоперативним налазима.

- За анализу ПТ и стромалних калцификата примењена је методологија из рада Bai Y и сар. из 2009. године [130]. Присуство интратуморске/интерстицијалне фиброзе (ИТФ) анализирано је кроз две категорије. Једну групу чинили су m-РТС без или са оскудном ИТФ која се презентовала у виду спорадичних, фокалних или неупадљивих поља фиброзе у интерстицијуму тумора. Другу групу m-РТС чинили су тумори са умереном/назначеном фиброзом. У овим m-РТС интратуморске зоне фиброзе биле су упадљиве и лако препознатљиве у виду бројних тракастих, звездастих или широких поља. Фиброзна капсула или псеудокапсула тумора, у случајевима њиховог присуства нису представљале елементе ИТФ [55].

- Присуство интратуморског лимфоидног инфилтрата/тумор инфилтришућих лимфоцита (ТИЛ) процењено је на основу методологије и препорука које су примењене у процени ТИЛ карцинома дојке [131], као и у студији за РТС [132]. Применом ове методологије у случајевима када ТИЛ заузимају најмање 10% туморске строме, тумори су категорисани као m-РТС богати ТИЛ, док су тумори у којима ТИЛ чине мање од 10% строме означени као m-РТС сиромашни ТИЛ [132].

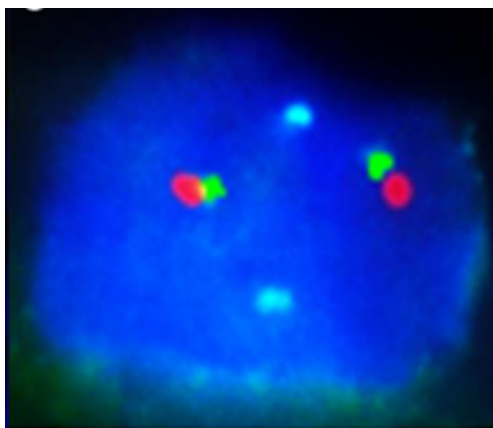
- Поред процене присуства ТИЛ анализирано је и интратуморско присуство МЦЋ. Хистолошки критеријуми за МЦЋ подразумевали су према раније примењеној методологији ћелије локализоване унутар цистичних простора m-РТС, јасних ћелијских граница, еозинофилне цитоплазме (са или без хемосидерина или вакуола) и најмање три насумично распоређена нуклеуса. Број МЦЋ одређен је семиквантитативно на читавај површини пресека тумора. Према детектованом броју МЦЋ анализирани тумори су дефинисани као m-РТС без МЦЋ, група m-РТС са највише три МЦЋ и m-РТС са више од три МЦЋ [133].

- У селектованој групи болесника анализирано је и присуство Хашимотовог/лимфоцитног тиреоидитиса (ЛТ) у ткиву ШЖ. Према примењеној хистолошкој подели ЛТ Mizukami Y и сар. у четири групе случајеви код којих су постојали хистолошки елементи оксифилне и мешовите форме ЛТ су категорисани као случајеви са ЛТ. Случајеви без присуства лимфоцитне инфилтрације или са елементима фокалне и хиперпластичне форме ЛТ су разматрани као случајеви без ЛТ [134].

3.4. ФЛУОРЕСЦЕНТНА *IN SITU* ХИБРИДИЗАЦИЈА

Детекција *EWSR1*- реаранжмана урађена је методом флуоресцентне *in situ* хибридизације (енг. *FISH*) у Институту за имунологију и молекуларну патологију („IPATIMUP“), Медицинског факултета, Универзитета у Порту, Португалија, према раније описаној методологији [106]. Анализирани су узорци ткива m-PTC у чијој су дијагностици учествовала два патолога без увида у клиничко-патолошке карактеристике m-PTC. Ткивни пресеци ШЖ са тумором су депарафинисани ксилолом и дехидрисани серијом етанола опадајуће концентрације. Демаскирање епитопа учињено је у цитратном пуферу рН 6.0 на 95 °С, а ензимска дигестија применом 0.5% раствора пепсина на температури од 37 °С. За коденатурацију постигнута температура износила је 79°С, а за хибридизацију 37°С. Обе анализе учињене су преко ноћи у апарату ZytoLight SPEC *EWSR1-FLI1* TriCheck Probe и у SPOT-Light CISH хибридајзеру. За контрастирање једара коришћен је DAPI/Dura-Test раствор за монтирање. Одговарајуће позитивне и негативне контроле коришћене су у сваком циклусу бојења. Флуоресцентни хибридизациони сигнали анализирани су и снимани на Zeiss Z.01 флуоресцентном микроскопу. За сваки анализирани пресек ткива са тумором анализирано је 50 нуклеуса на присуство *EWSR1*- реаранжмана, *EWSR1*- монозомије, *EWSR1*-полизомије и *EWSR1-FLI1* фузије. *EWSR1*-реаранжман је присутан у једру уколико је уочен сигнал сепарације на 5'-наранџастом и 3'-зеленом делу *EWSR1* пробе. Уколико је сигнал сепарације присутан заједно са фузијом 5'-наранџастог сигнала *EWSR1* гена и плавог сигнала *FLI1* гена, нуклеус је сматран позитивним на присуство *EWSR1-FLI1* фузије, односно транслокације (11; 22).

Као нормалан нуклеус (слика 3.4.1.) за регион хромозома у коме се налази *EWSR1* ген сматрани су случајеви у којима постоје два сигнала фузије (5'-наранџаст и 3'-зелен) и одвојено два плава сигнала *FLI1* гена (плаво).



Слика 3.4.1. FISH анализа нуклеуса PTC без промена у региону хромозома за *EWSR1* ген. Виде се два сигнала фузије (5'-наранџаст и 3'-зелен) *EWSR1* гена и одвојено два плава сигнала *FLII* гена, увећање x600. Преузето из Oliveira G и сар., 2017., [106].

Према раније примењеној методологији [106] узорак m-PTC је сматран позитивним за *EWSR1*- реаранжман уколико је сигнал сепарације присутан у више од 2,4% анализираних неопластичних нуклеуса (*EWSR1* позитивни m-PTC). Тумор је сматран позитивним за *EWSR1-FLII* фузију уколико је сигнал фузије присутан у више од 2,4% анализираних неопластичних нуклеуса (*EWSR1-FLII* позитивни m-PTC). Случајеви у којима није детектовано присуство сигнала у најмање 50 нуклеуса су из техничких разлога сматрани нејасним/неодређеним и искључени су из даље анализе повезаности ових генетичких измена са клиничко-патолошким карактеристикама m-PTC. Нуклеуси m-PTC у којима је број сигнала за *EWSR1* ген био мањи од броја сигнала у нормалним нуклеусима представљали су нуклеусе са (делецијом) монозомијом *EWSR1* гена, а када је детектовани број сигнала био већи од броја сигнала у нормалним нуклеусима представљали су нуклеусе са (амплификацијом) полизомијом *EWSR1* гена.

Применом исте граничне вредности процентуалне заступљености неопластичних нуклеуса за измене у *EWSR1* гену по типу транслокација, случајеви са монозомијом или полизомијом *EWSR1* гена у више од >2,4% класификовани су као монозомија позитивни m-PTC и полизомија позитивни m-PTC.

Повезаност величине нуклеуса *EWSR1* реаранжмана: У накнадно селектованој групи од 5 m-PTC са детектованим малим ћелијама и највећим процентом ћелија у којима су нађене генетичке измене по типу *EWSR1* реаранжмана и *EWSR1-FLII* фузије, учињено је упоређивање величине нуклеуса након одређивања њиховог обима. Обим нуклеуса мерен је коришћењем морфометријског мерења применом софтвера D-Sight

Navigator viewer. Мерен је обим нуклеуса, а резултати су поређени након поделе неопластичних нуклеуса у 3 групе. Прву групу чинили су нуклеуси m-PTC без генетичких измена у *EWSR1* гену, другу групу су чинили нуклеуси са *EWSR1* реаранжманом, док су у трећој групи испитивани нуклеуси са *EWSR1-FLII* фузијом.

3.5. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКО ОДЕЂИВАЊЕ НИВОА ЕКСПРЕСИЈЕ PD-L1 ПРОТЕИНА НА ТУМОРСКИМ ЋЕЛИЈАМА

Ткивни узорци m-PTC фиксирани су 5% пуферисаним неутралним формалином, дехидрисани, просветљени и прожети парафином у апарату за аутоматску фиксацију ткивних узорака и укалупљени у парафин. На аутоматском ротационом микротому из парафинских блокова учињени су резови дебљине 4 μ m. Демаскирање епитопа је урађено у раствору за демаскирање епитопа рН 6.0 (Agilent/DAKO кат. бр. K8005, Глоstrup, Данска) у микроталасној пећници. За имунохистохемијску анализу је као примарно антителио коришћено моноклонско, мишије, анти хумано анти PD-L1 antitelo (Agilent/DAKO кат. бр. M3653, клон 22C3, Глоstrup, Данска) у разблажењу 1:50, а као систем за визуелизацију EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus), HRP, Mouse (Agilent/DAKO кат. бр. K8012, Глоstrup, Данска). Као позитивна контрола коришћено је ткиво плаценте.

Позитивном имунохистохемијском реакцијом сматрана је делимична или комплетна обојеност цитоплазме и/или ћелијске мембране за PD-L1. Процена нивоа експресије за PD-L1 урађена је према раније описаној методологији за PTC [122, 135].

Укратко, имунохистохемијска реакција за PD-L1 вреднована је према интензитету обојености туморских ћелија семиквантитативно као: 0– негативна реакција, 1+ слаба реакција, 2+ умерена реакција и 3+ интензивна реакција. Према проценту позитивних туморских ћелија резултати су вредновани кроз пет група и то: група 1. (<1% ћелија); група 2. (1% – 10% ћелија); група 3. (11% – 33% ћелија); група 4. (34% – 66% ћелија); група 5 (67% – 100% ћелија). Стратификација тумора према нивоу експресије за PD-L1 учињена је применом Алредовог скоринг (АС) система (енг. *Allred scoring system*) који се заснива на збиру скорa процентуално позитивних ћелија и скорa интензитета позитивно обојених ћелија. Тумори са вредностима скорa <2 класификовани су као негативни, са вредносима од 3 до 4 као фокално/умерено позитивни, а вредностима скорa >4 обухваћени су тумори са дифузном експресијом за PD-L1.

3.6. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА

Статистичка обрада резултата обухватила је методе дескриптивне статистике и тестирања хипотеза. Најпре је Колмогоро Смирновим тестом (*Kolmogorov-Smirnov Test*) испитана дистрибуција нумеричких варијабли. За опис параметара од значаја у зависности од њихове природе, коришћени су фреквенције и проценти, аритметичка средина (X) и медијана (Me), мере варијабилитета - интервал варијације (Min-Max), стандардна девијација (SD). За утврђивање значајности разлика квалитативних варијабли примењени су Пирсонов хи квадрат тест (*Pearson Chi square test* (χ^2)) и Фишеров егзактни тест (*Fisher's exact test*). За упоређивање квантитативних варијабли коришћени су Студентов т тест (*Student's t-test*), Мен Витнијев тест (*Mann-Whitney test*) и Једнофакторска анализа варијансе (*ANOVA test*), док су накнадна поређења тестирана Такијевим тестом (*post hoc Tukey test*). Повезаност две кватитативне варијабле одређена је Спирмановим коефицијентом продукт момент корелације (*Spearman's correlation*). Ниво вероватноће установљен је на $p \leq 0,05$. Сви статистички прорачуни добијени су коришћењем софтвера IBM SPSS ver. 25.

4.0. РЕЗУЛТАТИ

4.1. ДЕМОГРАФСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА

У ИПСМ Војномедицинске академије у периоду од јануара 2013. године до децембра 2018. године патохистолошка дијагноза m-PTC постављена је код 446 болесника. Од укупно дијагностикованих случајева m-PTC, број болесника са најмањом величином тумора од 5 mm износио је 116 (26,0%). Према критеријумима наведеним у методологији (тип операције и недостатак ткива у парафинским блоковима) из студије је искључено 17 болесника. Након тога је истраживање спроведено на 99 болесника којима је патохистолошки постављена дијагноза m-PTC величине од 5 до 10 mm.

Просечна старост болесника била је $49 \pm 14,4$ година. Најмлађи болесник у време постављања дијагнозе имао је 19 година, а најстарији 89 година. У анализираној групи број болесника млађих од 55 година био је статистички значајније заступљен ($n=65$; 65,7%) у поређењу са бројем болесника са 55 или више година ($n=34$; 34,3%; $p=0,0002$).

У односу на заступљеност према полу, статистички значајно је био већи број болесника женског пола (77 или 77,8%), док су 22 болесника (22,2%) била мушког пола ($p=0,000$). Однос болесника мушког и женског пола био је 1:3,5. Ови резултати су приказани у табели 4.1.1.

Табела 4.1.1. Пол и старосна структура анализираних болесника

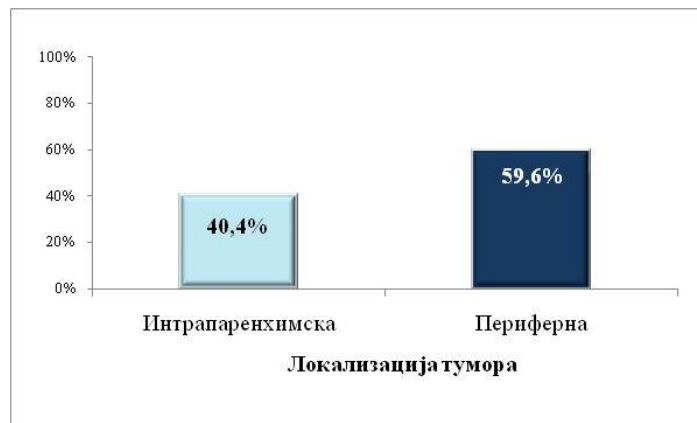
Пол болесника	Број	Просечна старост	SD	Минимум	Максимум	<i>p</i>
Мушки	22	45,41	13,38	30	73	0,000
Женски	77	50,01	14,63	19	85	
Укупно	99	49	14,42	19	85	

SD - стандардна девијација.

4.2. ПАПИЛАРНИ МИКРОКАРЦИНОМ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ - КЛИНИЧКО ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ И ЊИХОВА УДРУЖЕНОСТ СА ЛОКАЛИЗАЦИЈОМ ТУМОРА

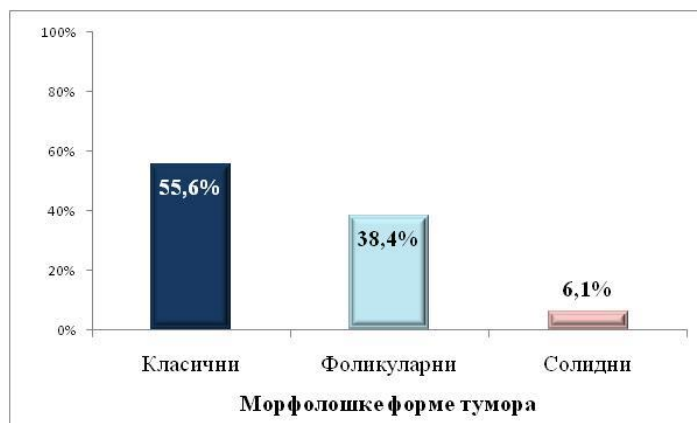
4.2.1. Величина, локализација и морфолошка форма m-PTC

Просечна величина тумора у испитиваним узорцима је износила $7,59 \pm 1,53$ mm. У већем броју анализираних узорака ($n=59$; 59,6%) тумор је био локализован у периферном/субкапсуларном делу жлезде, док је код 40 болесника (40,4%) тумор био локализован у интрапаренхимском делу жлезде, што није представљало статистички значајну разлику ($p=0,056$) (графикон 4.2.1.1.)



Графикон 4.2.1.1. Заступљеност интрапаренхимских и периферно локализованих m-PTC.

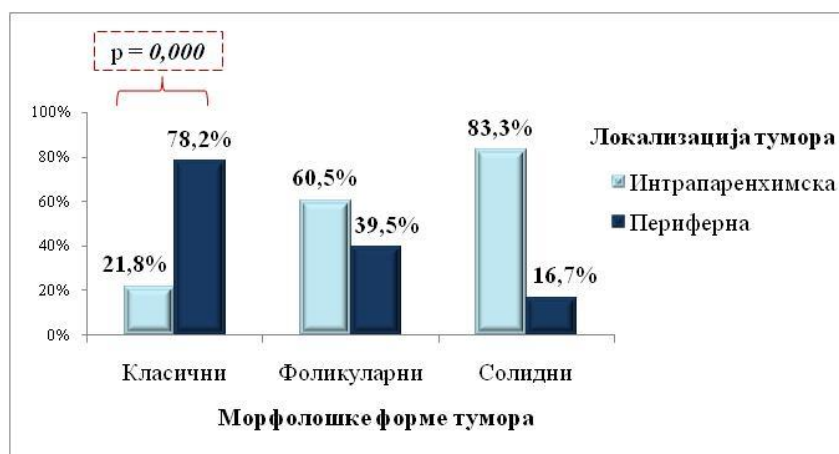
Анализом морфолошких карактеристика утврђено је да је у више од половине испитаних случајева ($n=55$; 55,6%) постојала класична морфолошка форма тумора, у њих 38 (38,4%) детектована је фоликуларна, а у 6 случајева (6,1%) солидна морфолошка форма тумора ($p=0,269$). Ови резултати су приказани на графикону 4.2.1.2.



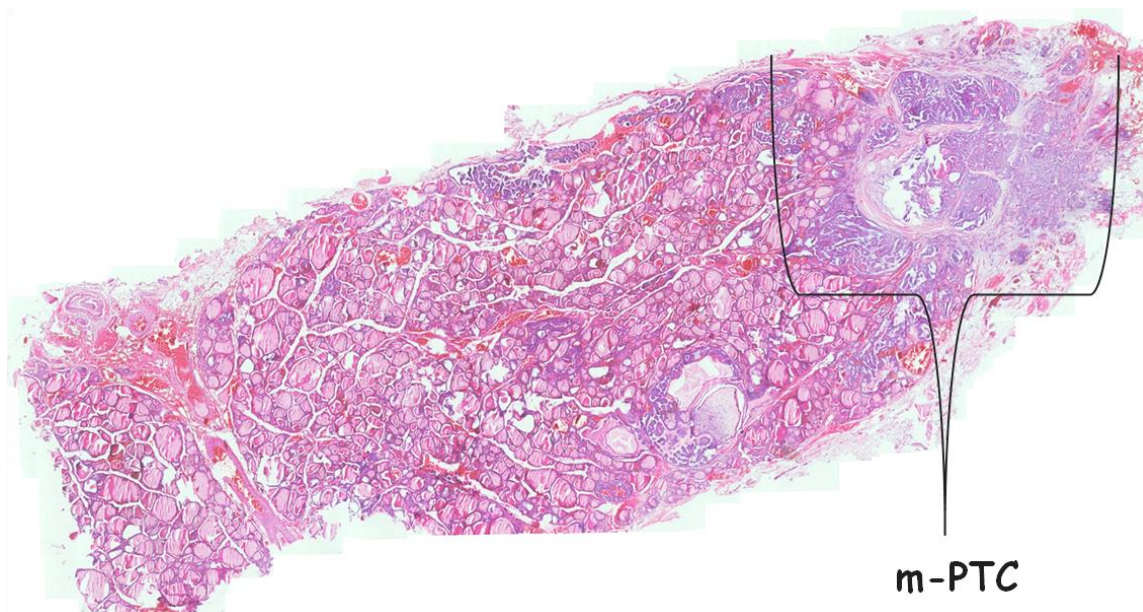
Графикон 4.2.1.2. Заступљеност различитих морфолошких форми m-PTC.

Упоредивањем морфолошких форми m-PTC према њиховој локализацији, детектовано је статистички значајније присуство класичне морфологије у периферно локализованим m-PTC (слика 4.2.1.1.) у односу на m-PTC интрапаренхимске локализације (78,2% vs. 21,8%; $p=0,000$).

Насупрот класичној морфолошкој форми, m-PTC фоликуларне и солидне морфолошке форме чешће су показивали интрапаренхимску локализацију (слика 4.2.1.2.). Ови резултати су приказани на графикону 4.2.1.3

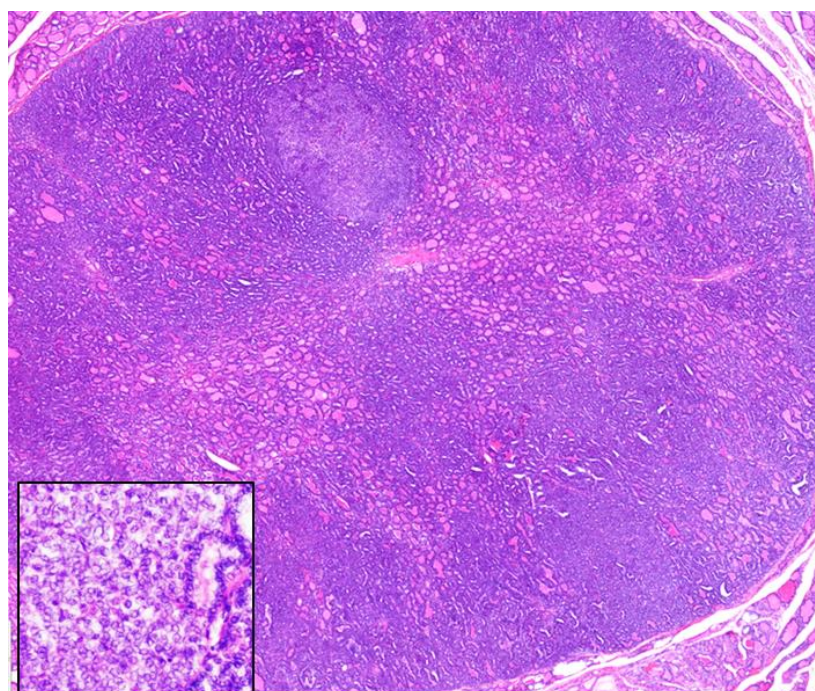


Графикон 4.2.1.3. Заступљеност различитих морфолошких форми m-PTC код болесника са интрапаренхимском и периферном локализацијом тумора.



Слика 4.2.1.1. Папиларни микрокарцином периферне локализације. Приказан је скениран пресек режња ШЖ (ХЕ* x100) са периферно локализованим m-PTC. Карцином је класичне морфолошке форме, умерене/назначене ИТФ, инфилтративног раста са МФР/ИГШ и минималним ЕТШ.
* Хематоксилин – Еозин

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.



Слика 4.2.1.2. Папиларни микрокарцином интрапаренхимске локализације. Приказан је скениран m-PTC (ХЕ* x100) интрапаренхимске локализације, фоликуларне морфологије, ограничене/експанзивне форме раста без ИТФ. У левом углу слике инсертована је зона са карактеристичним нуклераним изменама за РТС (ХЕ* x100). * Хематоксилин – Еозин.

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

4.2.2. Присуство малих ћелија у m-PTC и њихова удруженост са клиничко-патолошким карактеристикама и локализацијом тумора

Просечан број малих ћелија у анализираним узорцима m-PTC износио је $12,3\% \pm 16,9\%$ (од 0,0% до 80,0%). Девет случајева (9,1%) било је негативно на присуство малих ћелија, док је у 90 случајева (90,9%) m-PTC нађено присуство малих ћелија. Просечан број малих ћелија у овој групи износио је $13,6\% \pm 17,2\%$ и кретао се у распону од 1,0% до 80,0%. У групи m-PTC са малим ћелијама постојало је статистички значајније присуство инвазивног раста, инвазије лимфатика и умерене/назначене ИТФ. Удруженост клиничко-патолошких карактеристика m-PTC према групама тумора са или без присуства малих ћелија приказан је у табели 4.2.2.1. Морфолошки изглед малих ћелија у m-PTC приказан је на слици 4.2.2.1 (а-ђ).

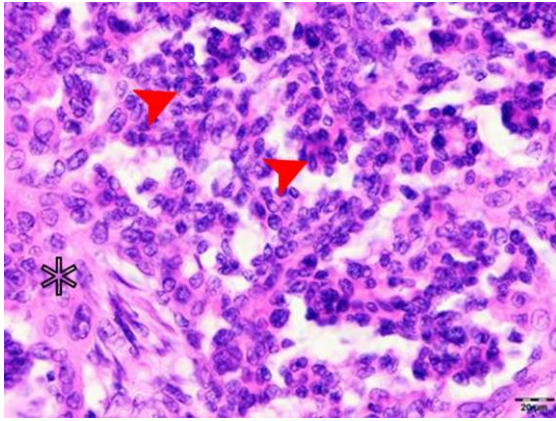
Анализом присуства малих ћелија унутар m-PTC није утврђена специфичност њихове дистрибуције. Мале ћелије биле су присутне у близини или унутар ИТФ али и у пољима без континуитета и близине ИТФ.

Применом Спирманове анализе корелације није показана статистички значајна повезаност процентуалне заступљености малих ћелија у односу на локализацију m-PTC ($\rho = -0,095$; $p = 0,348$).

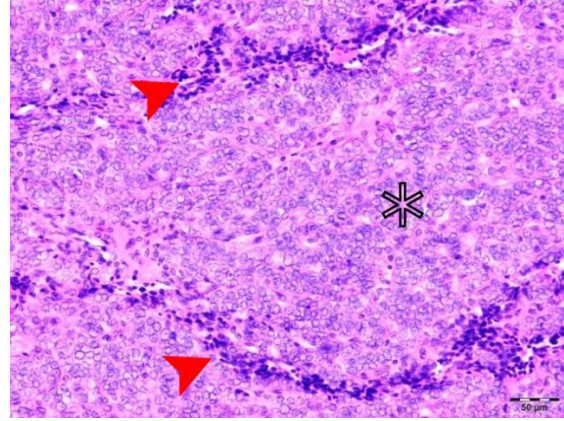
Табела 4.2.2.1. Клиничко-патолошке карактеристике m-PTC са и без присуства малих ћелија

Карактеристике	Укупно (%)	Мале ћелије		p
		Негативни m-PTC n=9 (9,1%)	Позитивни m-PTC n=90 (90,9%)	
Пол				
Женски	77 (77,8)	9 (11,7)	68 (88,3)	0,201 ^a
Мушки	22 (22,2)	0 (0,0)	22 (24,4)	
Старост				
< 55 година	65 (65,7)	6 (9,2)	59 (90,8)	1,000 ^a
≥ 55 година	34 (34,3)	3 (8,8)	31 (91,2)	
Стадијум болести				
I	92 (92,9)	9 (9,8)	83 (90,2)	1,000 ^a
II	7 (7,1)	0 (0,0)	7 (100,0)	
pT				
T1a	96 (97,0)	9 (9,4)	87 (90,6)	1,000 ^b
T3b	3 (3,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	
pN				
N0	69 (69,7)	8 (11,6)	61 (88,4)	0,270 ^a
N1a and N1b	30 (30,3)	1 (3,3)	29 (96,7)	
ЕТШ				
Присутно	3 (3,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	1,000 ^b
Одсутно	96 (97,0)	9 (9,4)	87 (90,6)	
Мултифокалност				
Присутна	82 (82,8)	7 (8,5)	75 (91,5)	0,650 ^a
Одсутна	17 (17,2)	2 (11,8)	15 (88,2)	
Морфологија				
Класична	55 (55,6)	3 (5,5)	52 (94,5)	0,082 ^b
Фоликуларна	38 (38,4)	4 (10,5)	34 (89,5)	
Солидна	6 (6,1)	2 (33,3)	4 (66,7)	
Форма раста				
Инфилтративана	72 (72,7)	2 (2,8)	70 (97,2)	0,001^a
О/Е	27 (27,3)	7 (25,9)	20 (74,1)	
Инвазија лимфатика				
Присутна	64 (64,6)	1 (1,6)	63 (98,4)	0,001^a
Одсутна	35 (35,4)	8 (22,9)	27 (77,1)	
Васкуларна инвазија				
Присутна	15 (15,2)	0 (0,0)	15 (100,0)	0,347 ^a
Одсутна	84 (84,8)	9 (10,7)	75 (89,3)	
ПТ				
Присутна	46 (46,5)	2 (4,3)	44 (95,7)	0,170 ^a
Одсутна	53 (53,5)	7 (13,2)	46 (86,8)	
ИТФ				
Умер/назначена	59 (59,6)	1 (1,7)	58 (98,3)	0,003^a
Одсутна/блага	40 (40,4)	8 (20,0)	32 (80,0)	
СК				
Присутна	33 (33,3)	3 (9,1)	30 (90,9)	1,000 ^a
Одсутна	66 (66,7)	6 (9,1)	60 (90,9)	

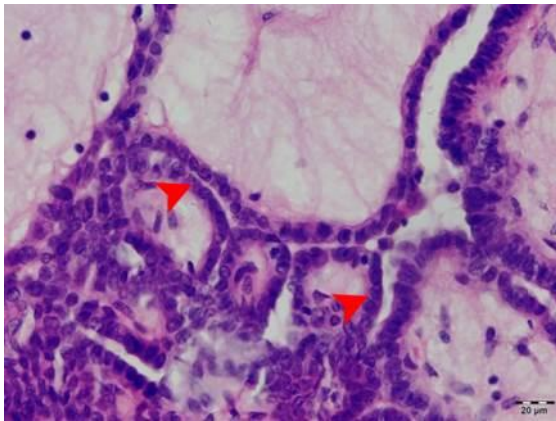
О/Е – ограничена/експанзивна форма раста; ЕТШ – екстратиреоидно ширење; ПТ - псамозна тела; ИТФ – интратуморска фиброза; СК – стромална калцификација. ^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2); ^b Фишерев егзактни тест.



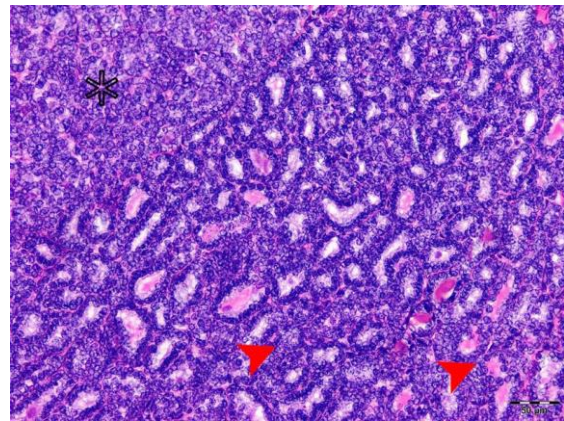
а



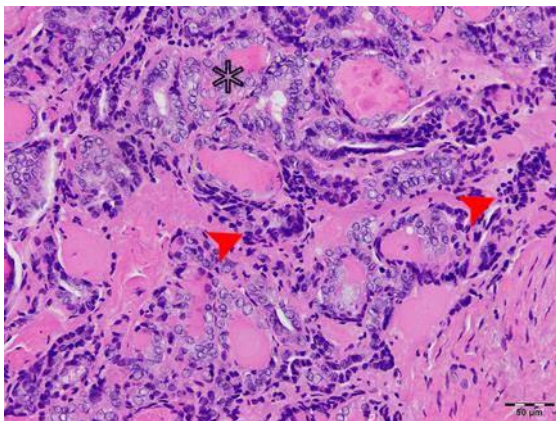
б



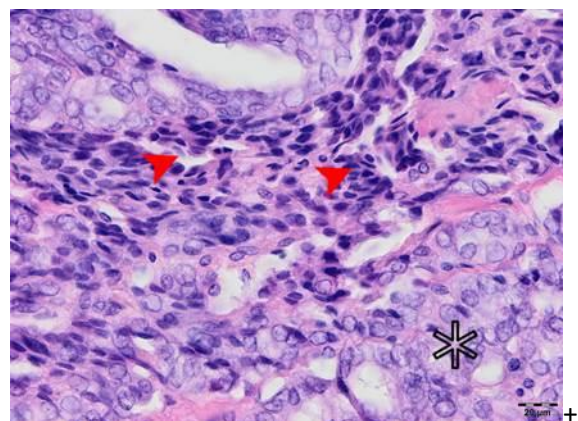
в



г



д



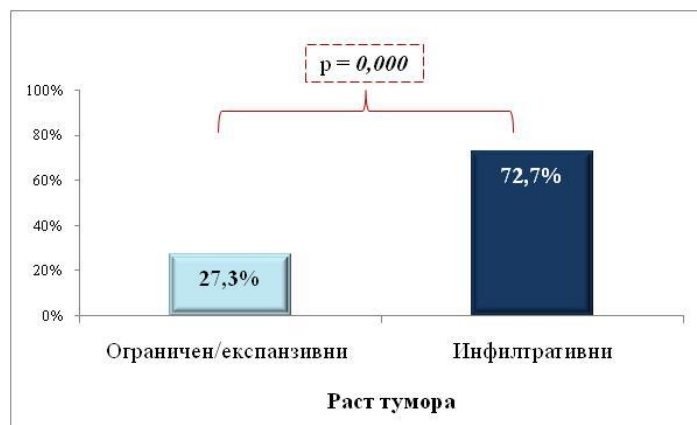
ђ

Слика 4.2.2.1. Морфолошки изглед малих ћелија у m-PTC. (а) Кратке папиларне структуре и ћелијски набори сачињени од малих ћелија са комплетним или некомплетним нуклераним карактеристикама PTC и фокално елементима хиперхромазије (XE* x400) (црвена стрелица – мале ћелије; звездица – ћелије тумора са типичним нуклераним карактеристикама PTC); (б) Мале ћелије хиперхорматичних нуклеуса у mPTC солидне морфологије (XE* x200); (в) Туморско поље изграђено од папиларних структура, едематозне строме, прекривене малим, кубичним ћелијама хиперхроматичних нуклеуса (XE* x400); (г) Мале ћелије микрофоликуларног распореда (XE* x200); (д,ђ) Мале ћелије хиперхроматичних нуклеуса распоређене између ћелија типичних нуклераних карактеристика PTC (XE* x200 и XE* x400). * Хематоксилин – Еозин.

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

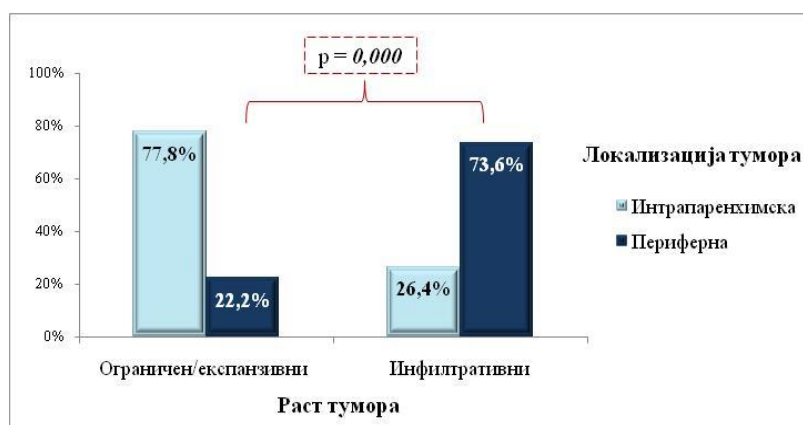
4.2.3. Форма раста, мултифокалност/интрагландуларно ширење, лимфатичка инвазија, васкуларна инвазија, екстратиреоидно ширење m-PTC и удруженост са локализацијом тумора

Већина анализираних тумора ($n=77$; 72,7%) показивала је инфилтративни раст, док је ограничен/експанзивни раст детектован у 27 случајева (27,3%), што се показало као статистички значајна разлика ($p=0,000$). Графикон 4.2.3.1.



Графикон 4.2.3.1. Заступљеност m-PTC различите форме раста анализираних болесника.

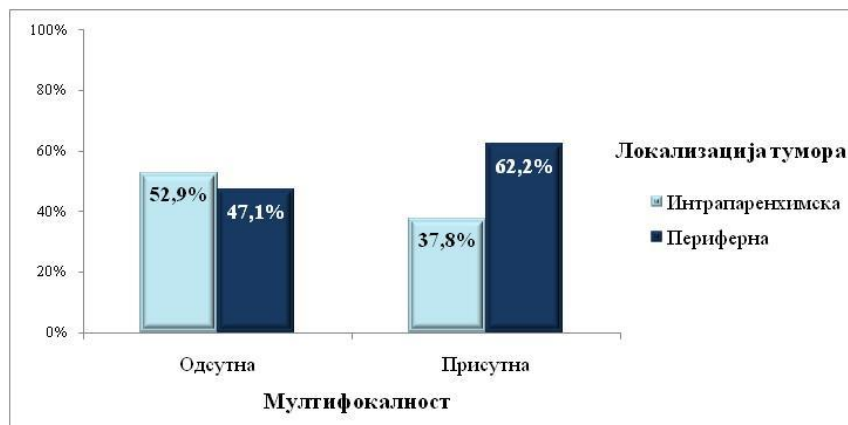
Анализа форме раста m-PTC према његовој локализацији показала је статистички значајније присуство инфилтративног раста код m-PTC периферне локализације у поређењу са туморима интрапаренхимске локализације (73,6% vs 22,2%; $p=0,000$). Графикон 4.2.3.2.



Графикон 4.2.3.2. Заступљеност m-PTC ограничене/експанзивне и инфилтративне форме раста у односу на локализацију карцинома.

Мултифокалност/интрагландуларно ширење (МФР/ИГШ) детектовано је у статистички већем броју испитиваних узорака ($n=81$; 81,81%), док је присуство само једног туморског поља нађено у 18 случајева (18,21%) ($p=0,000$).

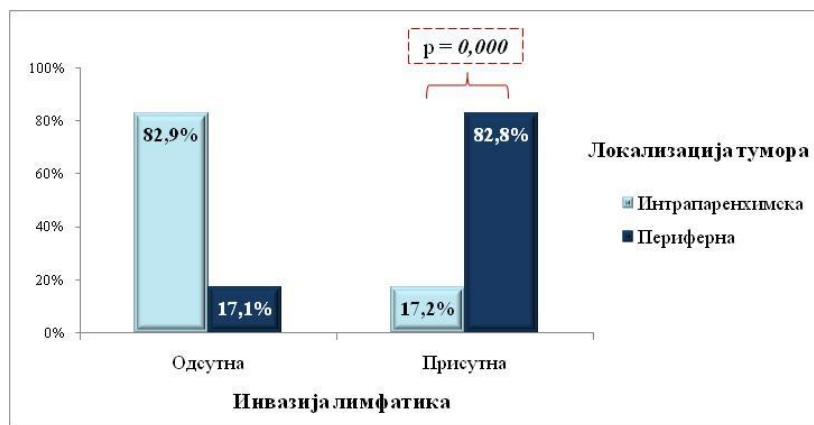
У групи m-PTC са МФР/ИГШ 45 узорака (54,88%) тумора показивало је 4 и мање туморских фокуса, док је више од четири туморских поља постојало код 37 (45,12%) анализираних узорака. Мултифокални раст постојао је чешће код m-PTC периферне локализације у односу на туморе са интрапаренхимском локализацијом али без статистичке значајности (62,2% vs 47,1%; $p=0,376$) (графикон 4.2.3.3.).



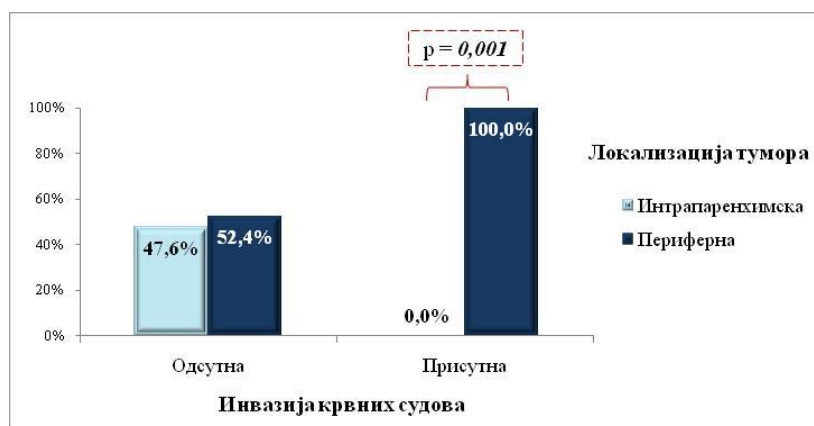
Графикон 4.2.3.3. Заступљеност МФР/ИГШ у m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.

Инвазија лимфатика била је присутна у 64 испитаника (64,6%) што је представљало статистички значајније заступљену групу m-PTC ($p=0,004$). Васкуларна инвазија је постојала у статистички значајније мањем броју m-PTC ($n=15$; 15,2%) укупно анализираних групе ($p=0,000$).

У оквиру групе m-PTC са периферном локализацијом у односу на групу m-PTC са интрапаренхимском локализацијом, постојало је статистички значајније присуство инвазије лимфатика (82,8% vs 17,2%; $p=0,000$) и васкуларне инвазије (100% vs 0,0%; $p=0,001$) (графикони 4.2.3.4. и 4.2.3.5.).



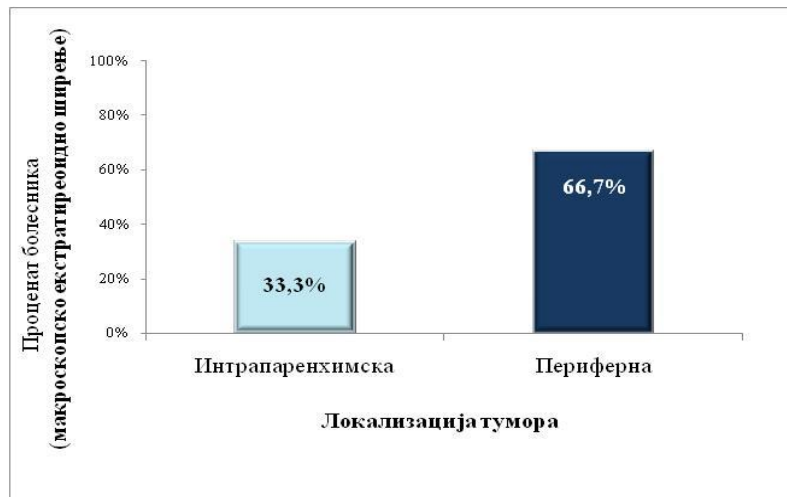
Графикон 4.2.3.4. Заступљеност инвазије лимфатика у m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.



Графикон 4.2.3.5. Заступљеност инвазије крвних судова у m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.

У 96 случајева (97,0%) карциноми су били ограничени на ткиво ШЖ што је представљало статистички значајније заступљену групу анализираних тумора ($p=0,000$). Унутар ове групе минимално/микроскопско ЕТШ тумора у перитиреоидном везивном и масном ткиву детектовано је код 46 узорака (47,91%) m-PTC. Само 3 узорака (3%) m-PTC показивала су макроскопско ЕТШ са инфилтрацијом перитиреоидних скелетних мишића.

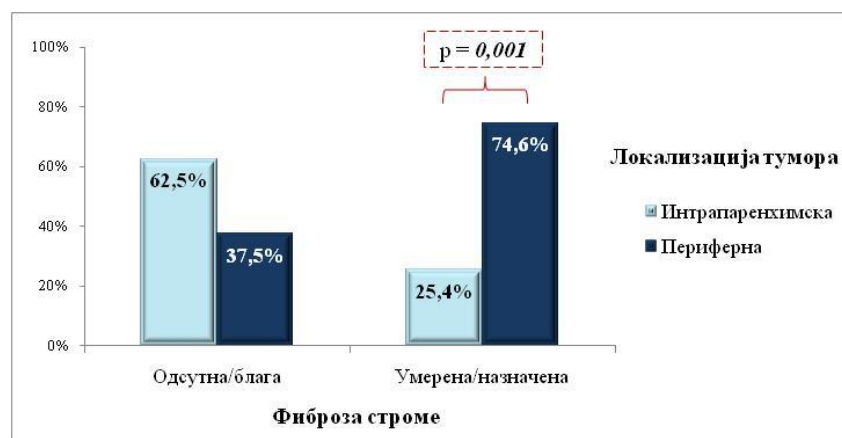
Периферно локализовани m-PTC чешће су показивали макроскопско ЕТШ (графикон 4.2.3.6.) у односу на интрапаренхимске m-PTC али без статистичке значајности (66,7% vs 33,3%; $p=1,000$).



Графикон 4.2.3.6. Присуство макроскопског ЕТШ m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.

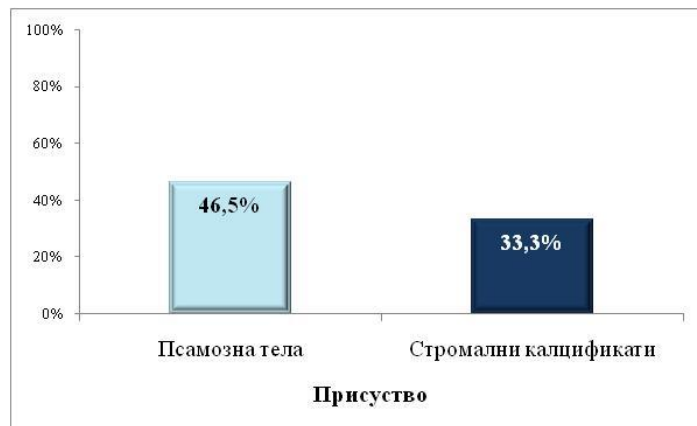
4.2.4. Интратуморска/интерстицијална фиброза, псамозна тела, стромални калцификати у m-PTC и удруженост са локализацијом m-PTC

Присуство умерене/назначене ИТФ детектовано је у 59 узорка (59,6%), док је у 40 узорака (40,4%) испитаних m-PTC показано одсуство или благи степен ИТФ. Није било статистички значајне разлике у заступљености ове две групе m-PTC ($p=0,056$). Поређењем заступљености ИТФ у m-PTC различите локализације (графикон 4.2.4.1.) показана је значајнија заступљеност умерене/назначене ИТФ у групи тумора периферне локализације ($n=44$; 74,6%) у односу на интрапаренхимски локализоване m-PTC ($n=15$; 25,4%) ($p=0,001$).



Графикон 4.2.4.1. Заступљеност ИТФ у m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.

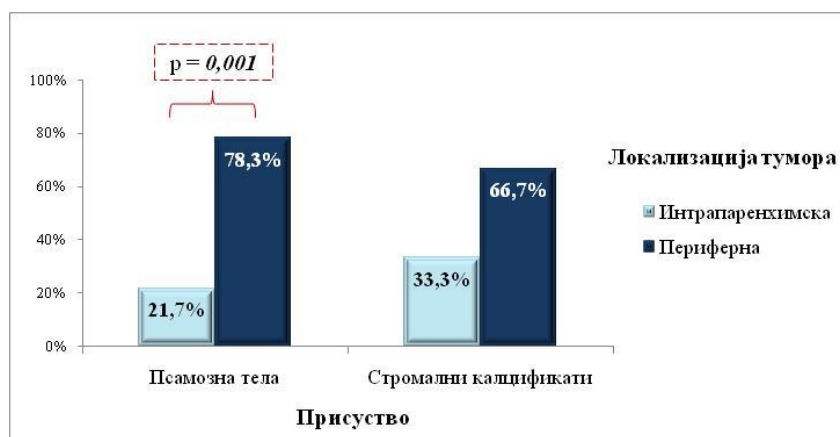
Присуство ПТ нађено је у 46 узорака (46,5%), а стромалних калцификата у 33 испитана случаја (33,3%) (графикон 4.2.4.2.).



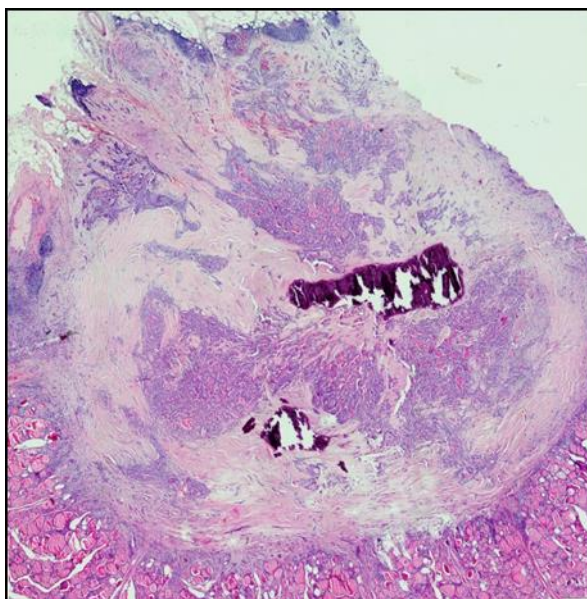
Графикон 4.2.4.2. Присуство ПТ и стромалних калцификата у m-PTC.

У укупно анализираној групи (n=99) није постојала статистички значајна разлика у заступљеност m-PTC са или без ПТ ($p=0,482$), док су m-PTC без стромалних калцификата чинили бројнију групу испитиваних узорака ($p=0,001$)

Периферно локализовани m-PTC показивали су статистички значајније присуство ПТ у односу на групу m-PTC интрапаренхимске локализације (78,3% vs 21,7%; $p=0,001$), док је појава стромалних калцификата такође била чешћа у m-PTC периферне локализације (слика 4.2.5.1) али без статистичке значајности (66,7% vs. 33,3%; $p=0,426$) (графикон 4.2.4.3.).



Графикон 4.2.4.3. Присуство псамозних тела и стромалних калцификата у m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.



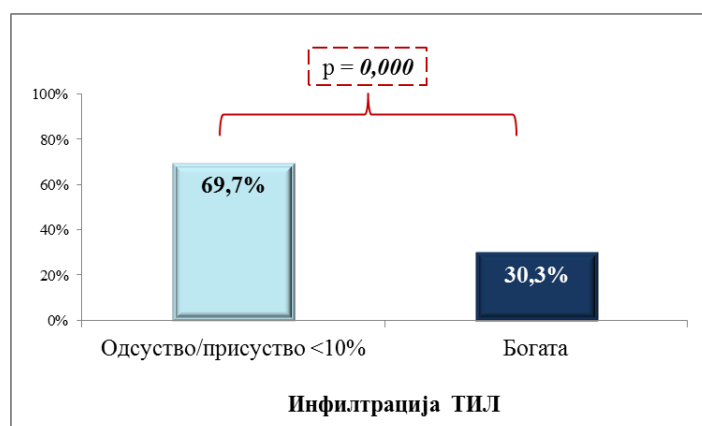
Слика 4.2.4.1. Стромални калцификати у папиларном микрокарциному. Приказан је скениран m-PTC (ХЕ* x40) периферне локализације, фоликуларне морфологије, назначене ИТФ са стромалним калцификатима. Присутан је инфилтративни раст са минималним ЕТШ.

* Хематоксилин – еозин.

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

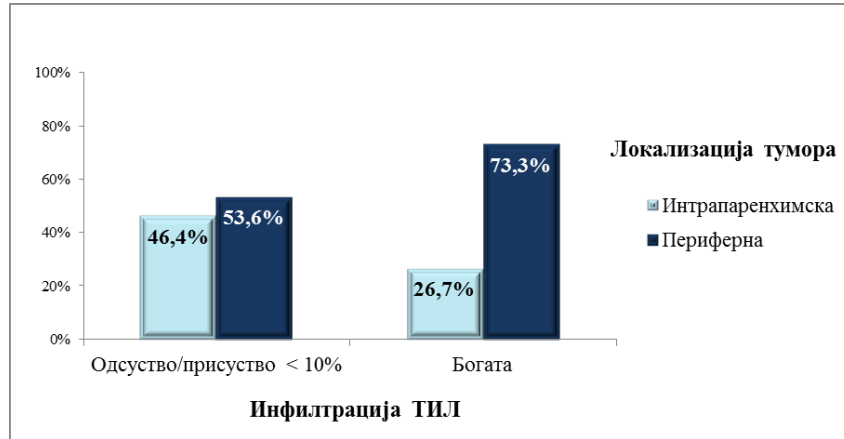
4.2.5. Тумор инфилтришићи лимфоцити и мултинуклеарне циновске ћелије у m-PTC и удруженост са локализацијом m-PTC

Богата инфилтрација m-PTC ТИЛ постојала је у 30 испитаних узорака (30,3%), док је њихово одсуство или присуство у мање од 10% строме нађено у статистички значајније већем броју случајева (n=66; 66,7%) ($p=0,000$) (графикон 4.2.5.1.)



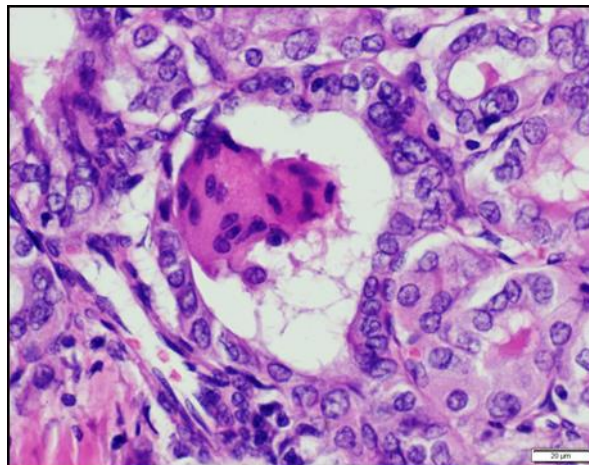
Графикон 4.2.5.1. Заступљеност m-PTC са богатом и сиромашном инфилтрацијом строме ТИЛ.

Богато присуство ТИЛ било је чешће у m-РТС периферне локализације, у поређењу са интрапаренхимском локализацијом, али без статистичке значајности (73,3% vs 26,7%; $p=0,066$) (графикон 4.2.5.2.).

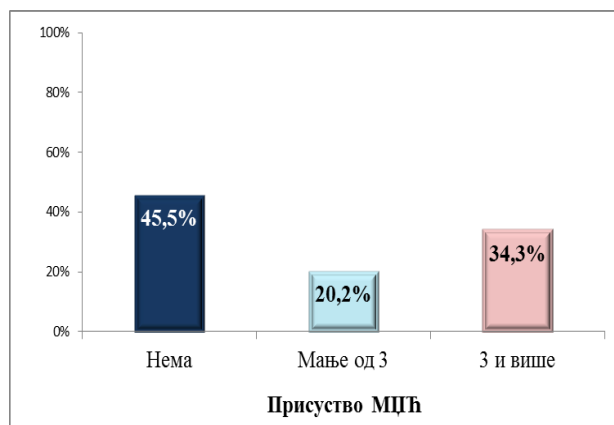


Графикон 4.2.5.2. Заступљеност m-РТС са богатом и сиромашном инфилтрацијом строме ТИЛ према локализацији карцинома.

Присуство МЦЋ (слика 4.2.5.1.) нађено је у статистички значајно већем броју m-РТС ($p=0,009$), код 54 (54,5%) испитаних узорак тумора. У 20 (20,2%) анализираних узорак детектовано је до 3 МЦЋ по површини пресека тумора, док је више од 3 МЦЋ уочено у 34 узорак (34,3%) тумора (графикон 4.2.5.3.).

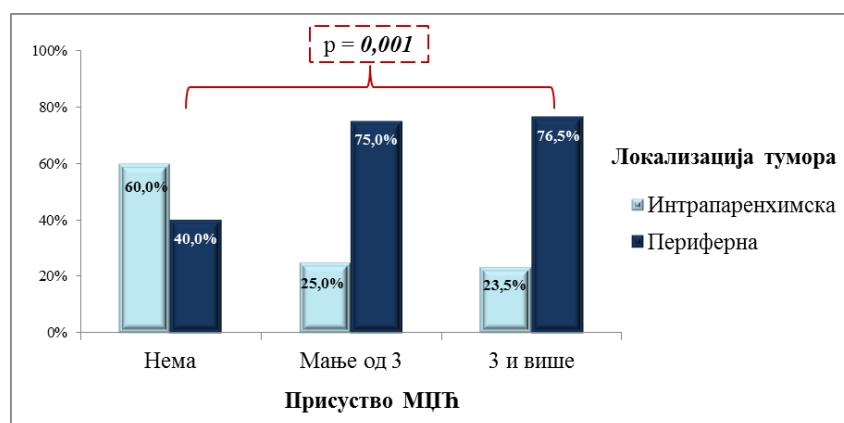


Слика 4.2.5.1 Интратуморска/интрафоликуларна МЦЋ. Приказан је део тумора фоликуларне морфологије са мултинуклеарном циновском ћелијом (ХЕ* x400).* Хематоксилин – еозин. Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.



Графикон 4.2.5.3. Заступљеност МЦЋ у m-PTC анализираних група болесника.

Упоредивањем броја МЦЋ у m-PTC различите локализације (графикон 4.2.5.3), нађено је статистички значајније присуство више од 3 МЦЋ у туморима периферне локализације у односу на интрапаренхимске m-PTC (76,5% vs 40,0; $p=0,001$).



Графикон 4.2.5.4. Заступљеност МЦЋ у m-PTC периферне и интрапаренхимске локализације.

4.2.6. Лимфоцитни тиреоидитис и m-PTC

Присуство лимфоцитног тиреоидитиса (ЛТ) нађено је у 20 (20,2%) случајева док у 79 (79,8%) узорака ШЖ није било елемената ЛТ. Група болесника са m-PTC без присуства ЛТ била је статистички значајније заступљена ($p=0,000$). Разлика у дистрибуцији периферно и интрапаренхимски локализованих m-PTC у ШЖ са или без ЛТ није била статистички значајна. Резлтати су приказани у табели. 4.2.6.1

Табела 4.2.6.1. Заступљеност m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације код болесника са или без ЛТ

Лимфоцитни тиреоидитис	Укупан број m- PTC (%)	Локализација m-PTC		p
		Интрапаренхимска n (%)	Периферна n (%)	
Присутан	30(20,2)	6(15%)	14(23,7%)	0,420 ^a
Одсутан	69(79,8)	34(85,0%)	45(76,3%)	

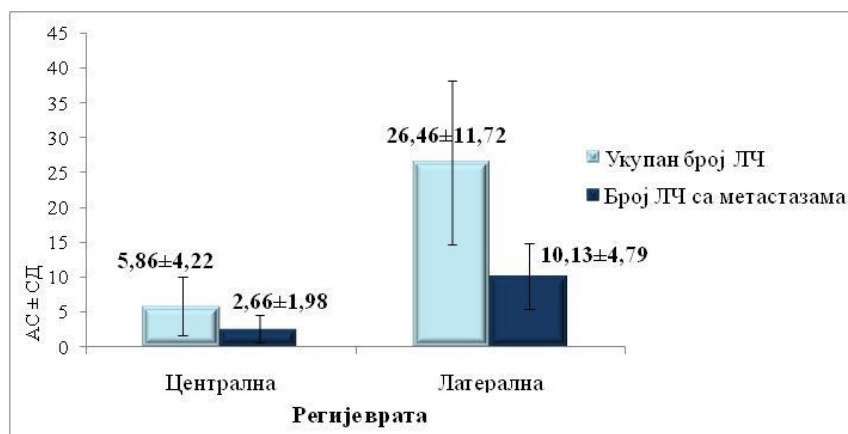
^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2).

4.2.7. Присуство метастаза m-PTC у лимфним чворовима врата и локализација m-PTC

Након учињене тоталне тиреоидектомије, код 69 (69,7%) болесника није детектовано присуство метастаза у ЛЧ централне и латералних регија врата. Ова група болесника је била статистички значајније заступљена у односу на болеснике са метастазама у регионалним ЛЧ ($p=0,000$).

Код 32 (32,3%) болесника од укупног броја испитаника ($n=99$), у хируршком материјалу није било ЛЧ, а присуство метастаза је искључено клиничким пре- и постоперативним прегледима, док је код 37 (37,4%) болесника присуство метастаза искључено и патохистолошком анализом ЛЧ. Просечан број ЛЧ у овој групи болесника са ЛЧ у оперативном материјалу износио је $3,16 \pm 2,12$ ЛЧ (у распону од 1 до 10).

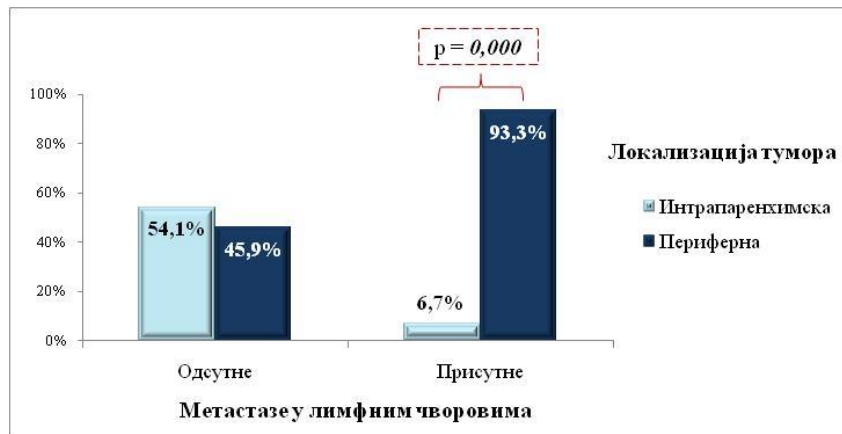
Код 30 (30,4%) болесника детектовано је присуство метастаза у ЛЧ врата. Метастазе у ЛЧ централне регије детектоване су у 15 (15,2%) болесника а исти број болесника ($n=15$; 15,2%) имао је метастазе и/или у ЛЧ латералних регија врата. Просечан број метастатски измењених ЛЧ код болесника са метастазама само у централној регији врата износио је $5,86 \pm 4,22$ (од 1 до 14), а број метастаза био је $2,66 \pm 1,98$ (од 1 до 8). У групи болесника са метастазама и/или у латералним регијама врата, просечан број ЛЧ износио је $26,46 \pm 11,72$ (од 13 до 55), а број метастаза $10,13 \pm 4,79$ (од 2 до 19). Наведени резултати су приказани на графикону 4.2.7.1.



Графикон 4.2.7.1. Однос укупног броја ЛЧ и метастаски измењених ЛЧ централне и периферних регија врата.

АС – аритметичка средина; СД – стандардна девијација.

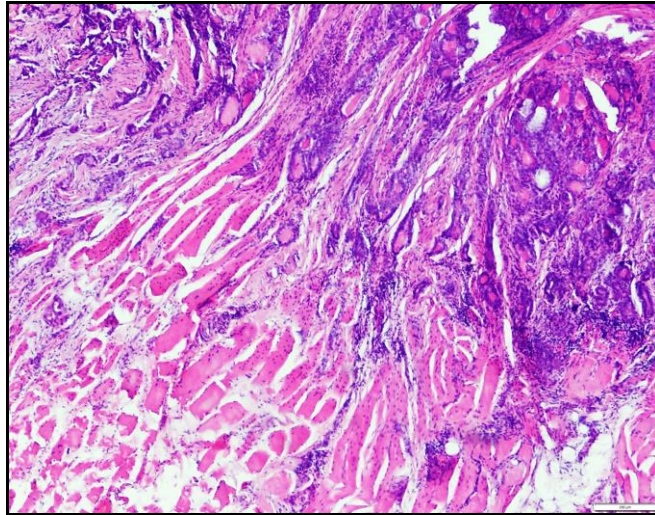
Упоређивањем присуства метастаза у ЛЧ врата са групама m-PTC различите локализације показано је да m-PTC периферне локализације, у тренутку операције статистички значајније метастазирају у регионалним ЛЧ у односу на m-PTC интрапаренхимске локализације (93,3% vs 6,7%; $p = 0,000$) (графикон 4.2.7.2.).



Графикон 4.2.7.2. Заступљеност метастаза у ЛЧ врата код болесника са интрапаренхимски и периферно локализованим m-PTC.

4.2.8. Патолошки и клинички стадијум болести

У већини случајева (n=96; 97,0%) тумор је био у патолошком T1a стадијуму, а патолошки T3b стадијум постојао је код 3 (3%) болесника са ЕТШ m-PTC (слика 4.2.8.1.).



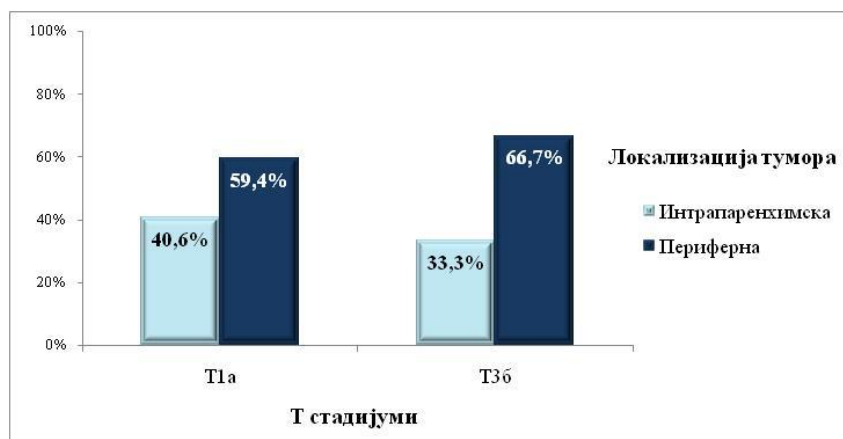
Слика 4.2.8.1. Папиларни микрокарцином са екстратиреоидним ширењем.

Приказана је инфилтрација скелетног мишића m-PTC (ХЕ* x400). * Хематоксилин – еозин.

Архива Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије.

Већина болесника (n=69; 69,7%) била је у патолошком N0 стадијуму, док су патолошки N1a и N1b стадијуми постојали у истом броју болесника (n=15; 15,2%). Присуство удаљених метастаза није нађено у селектованој групи болесника.

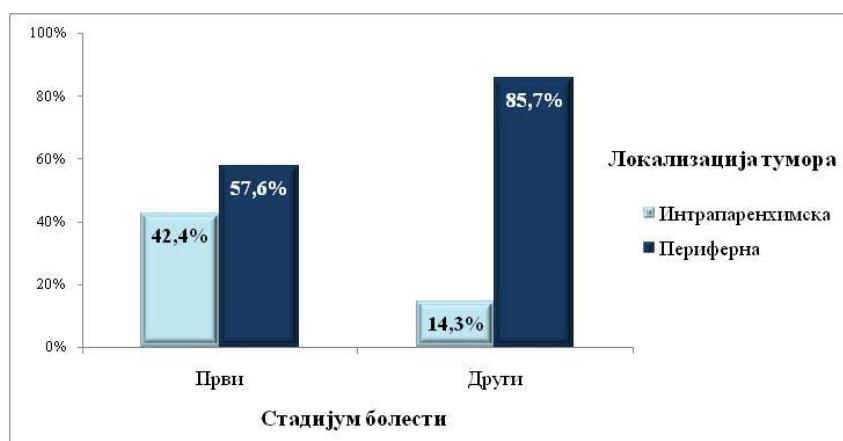
Упоређивањем патолошког T стадијума болести и локализације m-PTC није нађена статистички значајна разлика у стадијуму m-PTC периферне и интрапаренхимске локализације (графикон 4.2.8.1).



Графикон 4.2.8.1. Учесталост патолошког T стадијума болести код болесника са m-PTC различите локализације.

У патолошком T1a стадијуму налазило се 39 (40,6%) узорака m-PTC интрапаренхимске локализације и 57 (59,4%) узорака тумора периферне локализације ($p=1,000$). На основу критеријума VIII издања AJCC већина болесника, њих 92 (92,92%) била је у првом, а 7 болесника (7,07%) је било у другом стадијуму болести.

Испитивањем повезаности клиничког стадијума болести и локализације m-PTC (резултати су приказани на графикону 4.2.8.2.) показана је чешћа заступљеност периферно локализованих m-PTC у другом стадијуму болести у поређењу са интрапаренхимским карциномима али без статистичке значајности (85,7% vs. 14,3%; $p=0,236$).

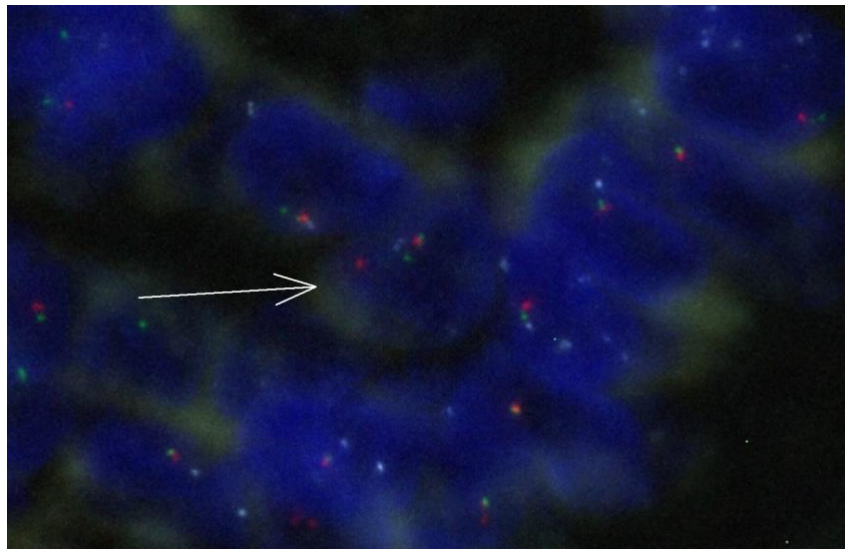


Графикон 4.2.8.2. Учесталост првог и другог клиничког стадијума болести код болесника са m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.

4.3. ПРИСУСТВО ГЕНЕТИЧКОГ РЕАРАНЖМАНА *EWSR1* У m-PTC

Након учињене FISH анализе, у 3 случаја селектоване групе m-PTC (n=99) нису детектовани анализирани сигнали *EWSR1* и *FLII* гена у најмање 50 неопластичних нуклеуса због чега су они дефинисани као нејасни/неодређени и искључени су из даље компарације са клиничко-патолошким карактеристикама m-PTC. Нејасни/неодређени случајеви су постојали код два болесника женског и једног болесника мушког пола. Анализирани тумори су у два случаја показивали класичну, а у једном случају солидну морфолошку форму. Код два болесника постојале су метастазе у ЛЧ врата. Сви случајеви су били у првом стадијуму болести.

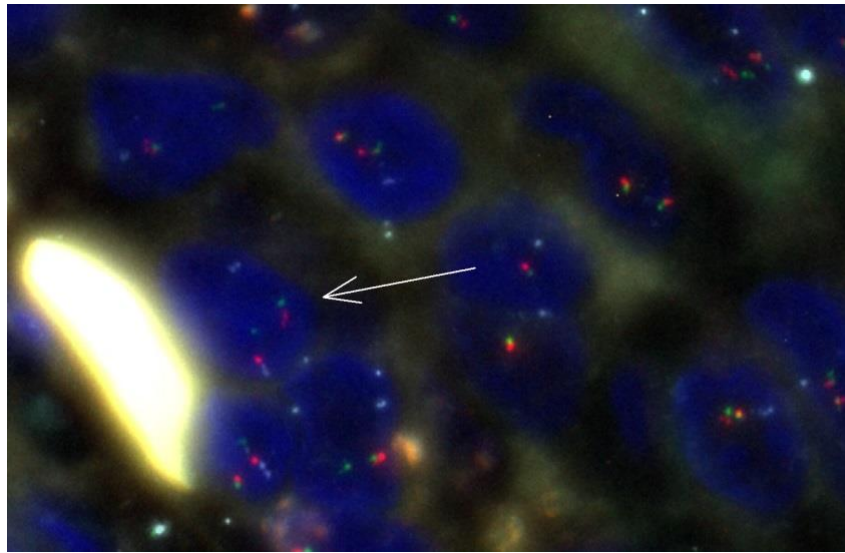
Од 96 анализираних m-PTC, 89 узорака или 92,7% показало је присуство реаранжмана *EWSR1* гена (слика 4.3.1) у више од 2,4% ћелија (*EWSR1* реаранжман позитивни m-PTC). Просечана процентуална заступљеност ћелија са реаранжманом *EWSR1* гена у m-PTC ове групе била је $16,72 \pm 9,76$ % и кретала се у распону од 4% до 66%.



Слика 4.3.1. Нуклеус m-PTC са реаранжманом *EWSR1* гена. Стрелицом је означен нуклеус са реаранжманом *EWSR1* гена. У нуклеусу се види један нормалан сигнал (5' наранџаст и 3' зелени) и два одвојена сигнала (5' наранџаст и 3' зелени сигнал) *EWSR1* гена. FISH (x200).

Присуство транслокације (11;22) односно *EWSR1-FLII* фузије гена (слика 4.3.2.) у више од 2,4% ћелија показано је у 27 анализираних тумора (*EWSR1-FLII* фузија позитивни m-PTC). У 13 случајева ове групе тумора процентуална заступљеност ћелија са

EWSR1-FLII фузијом била је 4%, у пет тумора проценат позитивних ћелија износио је 6% и исти број тумора показивао је заступљеност транслокације у 8% ћелија, а по два случаја имала су *EWSR1-FLII* фузију у 10% и 12% ћелија. Просечна процентуална заступљеност *EWSR1-FLII* фузије у овој групи m-PTC износила је $6,15 \pm 2,59$ % и кретала се у распону од 4% to 12%.



Слика 4.3.2. Фузија *EWSR1* и *FLII* гена. Стрелица приказује нуклеус ћелије са фузијом *EWSR1* и *FLII* гена. У овом нуклеусу налази се један нормалан сигнал *EWSR1* гена (5' наранџаст и 3' зелени) и један у фузији са *FLII* геном (фузија 5'-наранџастог сигнала *EWSR1* гена и плавог сигнала *FLII* гена). FISH (x200).

Монозомија *EWSR1* гена постојала је у 88 узорка (91,6%) анализираних m-PTC. Просечан проценат неопластичних нуклеуса са губитком *EWSR1* гена (монозомија) у анализираним туморима износио је $13,7 \pm 12,6$ % и кретао се у распону од 0,0% до 88,0%. У 8 узорка (8,3%) није нађено присуство монозомије *EWSR1* гена, а у 6 узорка m-PTC монозомија је детектована само у 2,0% неопластичних нуклеуса. Групу *EWSR1* монозомија позитивних m-PTC чинила су 82 (85,4%) тумора, а групу монозомија *EWSR1* негативних m-PTC 14 (14,6%) узорка.

Анализом присуства полизомије (амплификације) *EWSR1* гена у ћелијама m-PTC показано је њено присуство у само једном тумору ($n=1$; 1,04%) и то у 2,0% туморских ћелија.

Спирмановом анализом корелације детектованих генетичких измена *EWSR1* гена показана је статистички значајна негативна корелација између пораста процента

реаранжмана *EWSR1* гена и процента монозомије *EWSR1* гена ($\rho = -0,536$; $p = 0,000$). Процент ћелија са реаранжманом *EWSR1* гена није показивао значајну корелацију са *EWSR1-FLII* фузијом ($\rho = 0,111$; $p = 0,281$) и полизомијом *EWSR1* гена ($\rho = -0,045$; $p = 0,666$).

4.3.1. Повезаност демографских карактеристика (године, пол) болесника и присуство *EWSR1* реаранжмана у ћелијама m-PTC

Поређењем присуства *EWSR1* реаранжмана у ћелијама m-PTC у групама болесника подељеним на основу пола и година старости, показано је да не постоји значајна разлика у дистрибуцији *EWSR1* позитивних m-PTC у односу на ове категорије испитаника. Код болесника женског пола *EWSR1* реаранжман позитивни m-PTC били су присутни у 69 случаја (92,0%), а код болесника мушког пола у 20 случаја или 95,2%. У групама болесника подељеним на основу година старости *EWSR1* позитивни m-PTC чинили су већину испитаних случаја у обе старосне категорије. У групи болесника млађих од 55 година *EWSR1* реаранжман позитивни m-PTC чинили су 90,3% ($n=56$) испитиваних узорака, а у старосној популацији са 55 и више година заступљеност је била нешто већа и износила је 97,1% ($n=33$). Резултати дистрибуције *EWSR1* реаранжман позитивни m-PTC према полу и старости болесника приказани су у табели 4.3.1.1.

Табела 4.3.1.1. Повезаност присуства *EWSR1* реаранжмана у m-PTC и демографских карактеристика болесника

Карактеристике	Укупно (%)	<i>EWSR1</i> реаранжман негативни m-PTC $n=7$ (7,3%)	<i>EWSR1</i> реаранжман позитивни m-PTC $n=89$ (92,7%)	<i>p</i>
Пол				
Женски	75 (78,1)	6 (8,0)	69 (92,0)	1,000 ^a
Мушки	21 (21,9)	1 (4,8)	20 (95,2)	
Године старости				
<55	62 (64,6)	6 (9,7)	56 (90,3)	0,415 ^a
≥55	34 (35,4)	1 (2,9)	33 (97,1)	

^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2).

Није показана статистички значајна разлика у заступљености *EWSR1-FLII* позитивних m-PTC у групама болесника подељеним на основу пола и година старости. Присуство *EWSR1-FLII* позитивних m-PTC нађено је у 23 (30,7%) болесника женског пола и код 4 (19,0%) болесника мушког пола. Резултати су приказани у табели 4.3.1.2. Анализом повезаности процента *EWSR1-FLII* фузије у оквиру групе *EWSR1-FLII* фузија позитивних m-PTC показан је већи проценат фузије у туморима болесника женског пола ($\rho=0,400$; $p=0,038$). У групама различите старосне категорије није постојала статистички значајна разлика у процентуалној заступљености *EWSR1-FLII* фузије ($\rho=-0,010$; $p=0,960$).

Табела 4.3.1.2. Повезаност присуства *EWSR1-FLII* фузије у m-PTC и демографских карактеристика болесника.

Крактеристике	Укупно (%)	<i>EWSR1-FLII</i> негативни m-PTC n=69 (71,9%)	<i>EWSR1-FLII</i> позитивни m-PTC n=27 (28,1%)	<i>p</i>
Пол				
Женски	75 (78,1)	52 (69,3)	23 (30,7)	0,413 ^a
Мушки	21 (21,9)	17 (81,0)	4 (19,0)	
Године старости				
<55	62 (64,6)	47 (75,8)	15 (24,2)	0,343 ^a
≥55	34 (35,4)	22 (64,7)	12 (35,3)	

^aПирсонов хи квадрат тест (χ^2).

У испитаним узорцима m-PTC присуство монозомије *EWSR1* гена није се статистички значајно разликовало код болесника различитог пола и болесника различитих старосних група (Табела 4.3.1.3.). Такође, пораст процента монозомије *EWSR1* гена у испитиваним узорцима тумора није показивао значајне разлике према полу ($\rho=0,118$; $p=0,254$) и годинама испитаника ($\rho=0,075$; $p=0,465$).

Табела 4.3.1.3. Повезаност присуства монозомије *EWSR1* гена у m-PTC и демографских карактеристика болесника

Крактеристике	Укупно (%)	Монозомија <i>EWSR1</i> негативни m-PTC n=14 (14,019%)	Монозомија <i>EWSR1</i> позитивни m-PTC n=82 (85,4%)	<i>p</i>
Пол				
Женски	75 (78,1)	8 (10,7)	67 (89,3)	0,073 ^a
Мушки	21 (21,9)	6 (28,6)	15 (71,4)	
Године старости				
<55	62 (64,6)	10 (16,1)	52 (83,9)	0,764 ^a
≥55	34 (35,4)	4 (11,8)	30 (88,2)	

^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2)

4.3.2. Повезаност морфолошких карактеристика m-PTC и присуства EWSR1 реаранжмана у ћелијама m-PTC

Резултати упоредне анализе морфолошких карактеристика m-PTC као што су морфолошка форма, присуство малих ћелија, форма раста, МТФ/ИГШ, лимфатичка инвазија, васкуларна инвазија, ЕТШ, ИТФ, присуство ПТ и стромалних калцификата према групама EWSR1 реаранжман позитивних и EWSR1 реаранжман негативних m-PTC налазе се у табели 4.3.2.1.

Табела 4.3.2.1 Морфолошке карактеристике m-PTC са и без EWSR1 реаранжмана

Карактеристике	Укупно (%)	EWSR1 реаранжман негативни m-PTC n=7 (7,3%)	EWSR1 реаранжман позитивни m-PTC n=89 (92,7%)	p
Морфолошка форма				
Класична	53 (55,2)	0 (0,0)	53 (100)	0,005 ^b
Фоликуларна	38 (39,6)	6 (15,8)	32 (84,2)	
Солидна	5 (5,2)	1 (20,0)	4 (80,0)	
Мале ћелије				
Присутне	88 (91,7)	5 (5,7)	83 (94,3)	0,104 ^a
Одсутне	8 (8,3)	2 (25,0)	6 (75,0)	
Форма раста				
Инфилтративана	69 (71,9)	3 (4,3)	66 (95,7)	0,095 ^a
О/Е	27 (28,1)	4 (14,8)	23 (85,2)	
Мултифокалност				
Присутна	79 (82,3)	5 (6,3)	74 (93,7)	0,604 ^a
Одсутна	17 (17,7)	2 (11,8)	15 (88,2)	
Инвазија лимфатика				
Присутна	61 (63,5)	2 (3,3)	59 (96,7)	0,095 ^a
Одсутна	35 (36,5)	5 (14,3)	30 (85,7)	
Васкуларна инвазија				
Присутна	14 (14,6)	0 (0,0)	14 (100,0)	0,589 ^a
Одсутна	82 (85,4)	7 (8,5)	75 (91,5)	
ЕТШ				
Присутно	2 (2,1)	7 (7,4)	2 (100)	1,000 ^a
Одсутно	94 (97,9)	0 (0)	87 (92,6)	
ИТФ				
Умерена/назначена	57 (59,4)	3(5,3)	54(94,7)	0,437 ^a
Одсутна/блага	39(40,6)	5(9,4)	35(89,7)	
ПТ				
Присутна	43 (44,8)	2 (4,7)	41 (95,3)	0,454 ^a
Одсутна	53 (55,2)	5 (9,4)	48 (90,6)	
СК				
Присутна	32 (33,3)	3 (9,4)	29 (90,6)	0,683 ^a
Одсутна	64 (66,7)	4 (6,2)	60 (93,8)	
Локализација				
Интрапаренхимска	40 (41,7)	5 (12,5)	35 (87,5)	0,124 ^a
Периферна	56 (58,3)	2 (3,6)	54 (96,4)	

О/Е – ограничена/експанзивна форма раста; ЕТШ – екстратиреоидно ширење; ИТФ- интратуморска фиброза; ПТ – псамозна тела; СК – стромална калцификација; ^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2); ^b Фишеров егзактни тест.

У *EWSR1* реаранжман позитивним m-PTC је постојала статистички значајнија заступљеност класичне морфолошке форме у поређењу са фоликуларном и солидном формом морфологије тумора (100% vs. 84,2% vs. 80%; $p=0,005$). Поређењем процентуалне заступљености *EWSR1* реаранжмана са морфолошким карактеристикама m-PTC показана је статистички значајна позитивна корелација са присуством малих ћелија ($\rho=0,349$; $p<0,001$). Остале анализирани морфолошке карактеристике нису показивале статистички значајну корелацију са порастом процента *EWSR1* реаранжмана у ћелијама m-PTC. Истовремено и пораст процентуалне заступљености *EWSR1* реаранжмана у m-PTC није показао значајну повезаност са локализацијом m-PTC, присуством МЦЋ, ТИЛ и ЛТ. Резултати поређења морфолошких карактеристика *EWSR1-FLII* позитивних и *EWSR1-FLII* негативних m-PTC налазе се у табели 4.3.2.2.

Није показана повезаност различитих група m-PTC подељених на основу присуства *EWSR1-FLI* фузије са морфолошким карактеристикама тумора осим присуства малих ћелија. Наиме, поређењем процентуалне заступљености *EWSR1-FLII* фузије, применом Спирманове анализе корелације добијена је статистички значајна позитивна корелација са присуством малих ћелија у m-PTC ($\rho= 0,201$; $p <0,050$).

Остале морфолошке карактеристике нису показивале статистички значајно различиту заступљеност морфолошких параметара m-PTC у групама тумора са или без монозомије *EWSR1* гена. Ови резултати су приказани у табели 4.3.2.3.

Табела 4.3.2.2. Морфолошке карактеристике m-PTC са и без EWSR1-FLII фузије

Крактеристике	Укупно (%)	EWSR1-FLII негативни m-PTC n=69 (71,9%)	EWSR1-FLII позитивни m-PTC n=27 (28,1%)	p
Морфолошка форма				
Класична	53 (55,2)	34 (64,2)	19 (35,8)	0,106 ^b
Фоликуларна	38 (39,6)	30 (78,9)	8 (21,1)	
Солидна	5 (5,2)	5 (100,0)	0 (0,0)	
Мале ћелије				
Присутне	88 (91,7)	62 (70,5)	26 (29,5)	0,435 ^a
Одсутне	8 (8,3)	7 (87,5)	1 (12,5)	
Форма раста				
Инфилтративана	69 (71,9)	49 (71,0)	20(29,0)	1,000 ^a
О/Е	27 (28,1)	20 (74,1)	7(25,9)	
Мултифокалност				
Присутна	79 (82,3)	55 (69,6)	24 (30,4)	0,381 ^a
Одсутна	17 (17,7)	14 (82,4)	3 (17,6)	
Инвазија лимфатика				
Присутна	61 (63,5)	44 (72,1)	17 (27,9)	1,000 ^a
Одсутна	35 (36,5)	25 (71,4)	10 (28,6)	
Васкуларна инвазија				
Присутна	14 (14,6)	12 (92,6)	2 (7,4)	0,336 ^a
Одсутна	82 (85,4)	57 (82,6)	25 (17,4)	
ЕТШ				
Присутно	2 (2,1)	1 (50,0)	1 (50,0)	0,486 ^a
Одсутно	94 (97,9)	68 (72,3)	26 (27,7)	
ИТФ				
Умер/назначена	57 (59,4)	40 (70,2)	17 (29,8)	0,828 ^a
Одсутна/блага	39(40,6)	29 (74,4)	10 (25,6)	
Псамозна тела				
Присутна	43 (44,8)	32 (74,4)	11 (25,6)	0,786 ^a
Одсутна	53 (55,2)	37 (69,8)	16 (30,2)	
СК				
Присутна	32 (33,3)	24 (75,0)	8 (25,0)	0,300 ^a
Одсутна	64 (66,7)	45 (70,3)	19 (29,7)	
Локализација				
Интрапаренхимска	40 (41,7)	26 (65,0)	14 (35,0)	0,205 ^a
Периферна	56 (58,3)	43 (76,8)	13 (23,2)	

О/Е – ограничена/експанзивна форма раста; ЕТШ – екстратиреоидно ширење; ИТФ- интратуморска фиброза; ПТ – псамозна тела; СК – стромална калцификација; ^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2); ^b Фишеров егзактни тест.

Табела 4.3.2.3. Морфолошке карактеристике m-PTC са и без монозомије *EWSR1* гена

Крактеристике	Укупно (%)	Монозомија <i>EWSR1</i> негативни m-PTC n=14 (14,019%)	Монозомија <i>EWSR1</i> позитивни m-PTC n=82 (85,4%)	<i>p</i>
Морфолошка форма				
Класична	53 (55,2)	8(15,1)	45(84,9)	1,000 ^b
Фоликуларна	38 (39,6)	6(15,8)	32(84,2)	
Солидна	5 (5,2)	0(0,0)	5 (100,0)	
Мале ћелије				
Присутне	88 (91,7)	62 (70,5)	26 (29,5)	0,435 ^a
Одсутне	8 (8,3)	7 (87,5)	1 (12,5)	
Форма раста				
Инфилтративана	69 (71,9)	13(18,8)	56(81,2)	0,104 ^a
О/Е	27 (28,1)	1 (3,7)	26(96,3)	
Мултифокалност				
Присутна	79 (82,3)	14 (17,7)	65 (82,3)	0,068 ^a
Одсутна	17 (17,7)	0 (82,4)	17 (100,0)	
Инвазија лимфатика				
Присутна	61 (63,5)	1 (2,9)	34 (97,1)	0,014 ^a
Одсутна	35 (36,5)	13 (21,3)	48 (78,7)	
Васкуларна инвазија				
Присутна	14 (14,6)	10 (12,2)	72 (87,8)	0,119 ^a
Одсутна	82 (85,4)	4 (28,6)	10 (71,4)	
ЕТШ				
Присутно	2 (2,1)	1 (50,0)	1 (50,0)	0,272 ^a
Одсутно	94 (97,9)	13 (13,8)	81 (86,2)	
ИТФ				
Умер/назначена	57 (59,4)	10 (17,4)	47 (82,5)	0,484 ^a
Одсутна/блага	39 (40,6)	4 (10,3)	35 (89,7)	
Псамозна тела				
Присутна	43 (44,8)	9 (20,9)	34 (79,1)	0,112 ^a
Одсутна	53 (55,2)	5 (9,4)	48 (90,6)	
СК				
Присутна	32 (33,3)	4 (12,5)	28 (87,5)	0,768 ^a
Одсутна	64 (66,7)	10 (15,6)	54 (84,4)	
Локализација m-PTC				
Интрапаренхимска	40 (41,7)	4 (10,0)	36 (90,0)	0,282 ^a
Периферна	56 (58,3)	10 (17,9)	46 (82,1)	

О/Е – ограничена/експанзивна форма раста; *ЕТШ* – екстратиреоидно ширење; *ИТФ* –интратуморска фиброза; *СК* – стромална калцификација; ^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2); ^b Фишеров егзактни тест.

Поређењем морфолошких карактеристика m-PTC у групама тумора подељеним на основу присуства монозомије *EWSR1* гена показана је статистички значајно већа појава инвазије лимфатика у групи *EWSR1* монозомија негативних m-PTC ($p=0,014$). Корелационом анализом процентуалне заступљености монозомије *EWSR1* гена у ћелијама групе m-PTC позитивних на *EWSR1* монозомију показана је статистички

значајна негативна корелација само са бројем малих ћелија тумора ($\rho=-0,202$; $p < 0,048$) и инвазијом лимфатика ($\rho=-0,252$; $p < 0,013$).

4.3.3. Анализа величине нуклеуса m-PTC са или без присуства генетичких измена *EWSR1* гена

Резултати поређења величине неопластичних нуклеуса m-PTC без и са генетичким изменама по типу *EWSR1* реаранжмана и *EWSR1-FLII* фузије приказани су у табели 4.3.3.1 Показана је статистички значајно мања величина нуклеуса m-PTC са *EWSR1-FLII* фузијом и *EWSR1* реаранжманом у поређењу са величином нуклеуса m-PTC без *EWSR1* реаранжмана. Такође, неопластични нуклеуси са *EWSR1-FLII* фузијом су мање величине од нуклеуса m-PTC са *EWSR1* реаранжманом али је статистички значајна разлика приказана само у случају број 5 ($F=5,889$; $p=0,006$; Такијев тест; $p=0,047$).

Табела 4.3.3.1. Компарација величине нуклеуса m-PTC у селектованим случајевима са или без *EWSR1-FLII* фузије и *EWSR1* реаранжмана

	Група 1		Група 2		Група 3		F	p
	N	CB µm (±SD)	N	CB µm (±SD)	N	CB µm (±SD)		
Случај 1	20	29,29 (±3,30)	20	25,39 (±6,43)	19	22,61 (±5,22)	8,309	0,001
Случај 2	20	31,03 (±2,04)	20	26,54 (±3,00)	9	24,66 (±2,74)	24,110	0,000
Случај 3	20	34,73 (±4,11)	20	31,87 (±4,84)	15	33,65 (±6,99)	1,457	0,238
Случај 4	20	29,22 (±2,97)	20	24,07 (±3,10)	6	23,06 (±2,69)	18,409	0,000
Случај 5	20	33,86 (±7,06)	17	31,44 (±4,91)	7	24,82 (±4,81)	5,889	0,006
Укупно	100	31,63 (±4,76)	97	27,75 (±5,55)	56	26,22 (±6,85)	20,388	0,000
Такијев тест (укупно)	Група 1 : Група 2 ($p = 0,000$) Група 1 : Група 3 ($p = 0,000$) Група 2 : Група 3 ($p = 0,232$)							

CB – средња величина; Група 1 – неопластични нуклеуси без *EWSR1* реаранжмана; Група 2 – неопластични нуклеуси са *EWSR1* реаранжманом; Група 3 – неопластични нуклеуси са *EWSR1-FLII* фузијом. N – број анализираних нуклеуса.

4.3.4. Удруженост локализације, присуства ТИЛ, присуства МЦЋ и ЛТ са присуством *EWSR1* реаранжмана у m-PTC

Применом Спирманове корелационе анализе није показана повезаност процентуалне заступљености присуства *EWSR1* реаранжмана, *EWSR1-FLI1* фузије и *EWSR1* монозомије са локализацијом m-PTC, ТИЛ, МЦЋ, ЛТ и експресијом PD-L1 протеина на туморским и ћелијама имунског система. Резултати су приказани у табели 4.3.4.1.

Табела 4.3.4.1. Корелација процентуалне заступљености генетичких измена *EWSR1* гена у m-PTC и локализације карцинома, присуства ТИЛ, МЦЋ, експресије PD-L1 протеина на туморским, ћелијама имунског система и ЛТ

		Лок.	ТИЛ	МЦЋ	PD-L1	PD-L1 + ТИЛ	ЛТ
<i>EWSR1</i> реаранжман % ћелија у m-PTC	<i>rho</i>	-0,114	0,103	-0,035	-0,116	-0,052	0,159
	<i>p</i>	0,267	0,319	0,733	0,259	0,618	0,123
<i>EWSR1-FLI1</i> фузија % ћелија у m-PTC	<i>rho</i>	-0,155	0,074	-0,127	0,168	0,004	0,050
	<i>p</i>	0,131	0,474	0,216	0,102	0,970	0,629
<i>EWSR1</i> монозомија % ћелија у m-PTC	<i>rho</i>	-0,049	0,026	-0,064	0,011	0,012	0,117
	<i>p</i>	0,636	0,799	0,538	0,912	0,911	0,912

rho - Спирманов коефицијент корелације; Лок. - локализација m-PTC; ТИЛ- присуство тумор-инфилтришућих лимфоцита у m-PTC; PD-L1 – експресија PD-L1 протеина у туморским ћелијама m-PTC; PD-L1 + ТИЛ – експресије PD-L1 на тумор-инфилтришућим лимфоцитима; ЛТ – лимфоцитни тиреоидитис.

4.3.5. Присуство метастаза у лимфним чворовима врата и њихова удруженост са присуством *EWSR1* реаранжмана у ћелијама m-PTC

Од укупно анализираних m-PTC (n=96) присуство метастаза у ЛЧ врата постојало је код 28 (29,2%) болесника и налазило се у патолошком N1 стадијуму болести. Код 15 (15,6%) болесника метастазе су постојале само у ЛЧ централне регије врата (pN1a), док су код 13 (13,5%) болесника метастазе постојале и/или у латералним регијама врата (pN1b). Шесдесетосам (70,8%) болесника налазило се у патолошком N0 стадијуму, односно нису имали метастазе у ЛЧ врата у тренутку операције ШЖ.

Већина m-PTC са метастазама (n=27; 96,4%), припадала је групи *EWSR1* реаранжман позитивних m-PTC, док је само један узорак (n =1; 3,6%) метастатског m-PTC припадао групи *EWSR1* реаранжман негативних m-PTC. Такође, група *EWSR1* позитивних m-PTC чинила је већину m-PTC без метастаза у ЛЧ (n=62; 91,2%) у односу на групу *EWSR1* негативних m-PTC (n=6; 8,8%). Овакви резултати су показали да не постоји статистичка значајност између присуства *EWSR1* реаранжмана у m-PTC у односу на присуство метастаза у ЛЧ врата ($p<0,669$).

У даљем раду поредили смо групе *EWSR1-FLII* фузија позитивних и *EWSR1-FLII* фузија негативних m-PTC са групама m-PTC са и без метастаза у ЛЧ врата. Резултати су показали да већина тумора са метастазама у ЛЧ (n=21; 75,0%) припада групи *EWSR1-FLII* фузија негативних m-PTC наспрам групи *EWSR1-FLII* позитивних m-PTC (n= 7; 25,0%). У групи m-PTC без метастаза 48 случаја или 70,6% чинили су *EWSR1-FLII* фузија негативни m-PTC, док су 20 случаја или 29,4% чинили *EWSR1-FLII* фузија позитивни m-PTC.

Поређећи заступљеност група тумора подељених у *EWSR1* монозомија позитивне и *EWSR1* монозомија негативне m-PTC са присуством метастаза у ЛЧ врата показано је статистички значајно присуство метастаза у групи *EWSR1* монозомија негативних (n=14; 14.6 %) у односу на групу монозомија *EWSR1* позитивних m-PTC (n=82; 85,4%). У групи m-PTC са метастазама у ЛЧ, 9 случаја или 32,1% била су монозомија негативни, а 19 узорка m-PTC или 67,9% била су монозомија позитивни m-PTC.

Насупрот томе само 5 (7,4%) случаја без метастаза припадало је групи *EWSR1* монозомија негативним m-PTC, док је велика већина (n=63; 92,6%) припадала групи *EWSR1* монозомија позитивних m-PTC са статистички значајном разликом ($p=0,004$).

4.3.6. Патолошки и клинички стадијуми болести и њихова удруженост са присуством *EWSR1* реаранжмана у ћелијама m-PTC

Резултати удружености патолошких и клиничких стадијума болести према групама m-PTC подељеним на основу присуства *EWSR1* реаранжмана приказани су у табели 4.3.6.1.

На основу добијених резултата није показана статистички значајна разлика у стадијумима болести *EWSR1* позитивних и *EWSR1* негативних m-PTC. Применом Спирманове анализе корелације, такође није нађена значајна повезаност процента *EWSR1* реаранжмана у ћелијама m-PTC са патолошким T стадијумом ($\rho=0,145$;

$p=0,158$), патолошким N стадијумом ($\rho=0,035$; $p<0,734$) и клиничким стадијумом болести ($\rho=0,079$; $p<0,446$).

Tabela 4.3.6.1. Удруженост патолошких и клиничког стадијума m-PTC са и без реаранжмана *EWSR1* гена

Стадијум болести	Укупно (%)	<i>EWSR1</i> негативни m-PTC n=7 (7,3%)	<i>EWSR1</i> позитивни m-PTC n=89 (92,7%)	<i>p</i>
pT				
pT1a	94 (97,9)	7(7,4)	87(92,6)	1,000 ^a
pT3b	2 (2,1)	0(0,0)	2(100,0)	
pN				
pN0	68 (70,8)	6 (8,8)	62(91,2)	0,669 ^a
pN1a i N1b	28 (28,9)	1(3,6)	27(96,4)	
Клинички стадијум				
I	89 (92,7)	7(7,9)	82(92,1)	1,000 ^a
II	7 (7,3)	0(0,0)	2(100,0)	

pT – патолошки T стадијум; *pN*- патолошки N стадијум; ^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2).

Патолошки и клинички стадијуми анализираних карцинома поређени су и на основу поделе m-PTC у групе са и без присуства *EWSR1-FLII* фузије, а резултати су приказани у табели 4.3.6.2. У добијеним резултатима није показана статистички значајна разлика у анализираним патолошким и клиничком стадијуму болести *EWSR1-FLII* позитивних и негативних m-PTC.

Tabela 4.3.6.2. Удруженост патолошких и клиничког стадијума m-PTC са и без присуства *EWSR1-FLII* фузије

Стадијум болести	Укупно (%)	<i>EWSR1-FLII</i> негативни m-PTC n=7 (7,3%)	<i>EWSR1-FLII</i> позитивни m-PTC n=89 (92,7%)	<i>p</i>
pT				
pT1a	94 (97,9)	68(72,3)	26(27,7)	0,486
pT3b	2 (2,1)	1(50,0)	1(50,0)	
pN				
pN0	68 (70,8)	6 (8,8)	62(91,2)	0,804
pN1a i N1b	28 (28,9)	1(3,6)	27(96,4)	
Клинички стадијум				
I	89 (92,7)	66(74,2)	23(25,8)	0,095
II	7 (7,3)	3(42,9)	4(57,1)	

pT – патолошки T стадијум; *pN*- патолошки N стадијум; ^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2).

Применом Спирманове корелационе анализе није показана повезаност процентуалне заступљености *EWSR1-FLII* фузије у ћелијама тумора са патолошким Т стадијумом ($\rho=0,049$; $p=0,638$), патолошким N стадијумом ($\rho=0,059$; $p<0,571$) и клиничким стадијумом болести ($\rho=0,090$; $p<0,382$).

Резултати поређења патолошких и клиничког стадијума болести m-PTC у односу на групе монозомија *EWSR1* негативних и монозомија *EWSR1* позитивних m-PTC приказани су у табели 4.3.6.3. Статистички значајна повезаност је постојала између патолошког N стадијума и монозомија *EWSR1* негативних m-PTC (резлтати су приказани у поглављу 3.3). Дистрибуција патолошког Т и клиничког стадијума није се значајно разликовала у групама тумора подељеним на основу присуства монозомије *EWSR1* гена.

Табела 4.3.6.3. Удруженост патолошких и клиничког стадијума m-PTC са и без монозомије *EWSR1* гена

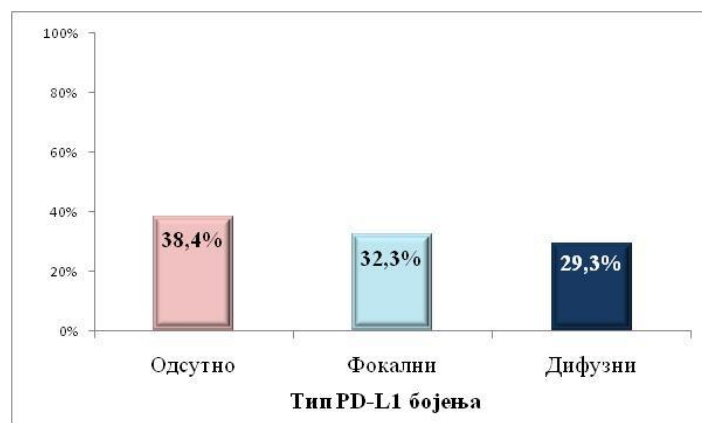
Стадијум болести	Укупно (%)	Монозомија <i>EWSR1</i> негативни m-PTC n=14 (14,6%)	Монозомија <i>EWSR1</i> позитивни m-PTC n=82 (85,4%)	<i>p</i>
pT				
pT1a	94 (97,9)	13(13,8)	81(86,8)	0,272 ^a
pT3b	2 (2,1)	1(50,0)	1(50,0)	
pN				
pN0	68 (70,8)	5(7,4)	63(92,6)	0,004 ^a
pN1a i N1b	28 (28,9)	9(32,1)	19(67,9)	
Клинички стадијум				
I	89 (92,7)	12 (13,5)	77 (86,5)	0,270 ^a
II	7 (7,3)	2 (28,6)	5 (71,4)	

pT – патолошки Т стадијум; *pN*- патолошки N стадијум; ^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2).

4.4. ЕКСПРЕСИЈА PD-L1 ПРОТЕИНА У m-PTC

Један од циљева истраживања овог рада је био и испитивање нивоа експресије молекула PD-L1 на ћелијама m-PTC. То је учињено применом имунохистохемијских метода и Алредовог система за вредновање резултата. Присуство PD-L1 молекула (позитивна реакција) је детектовано у 61 испитаном узорку (61,6%) m-PTC што је чинило статистички значајнију већину ($p = 0,021$) у односу на број m-PTC ($n=38$; 38,4%) код којих је постојала негативна реакција за PD-L1 протеин.

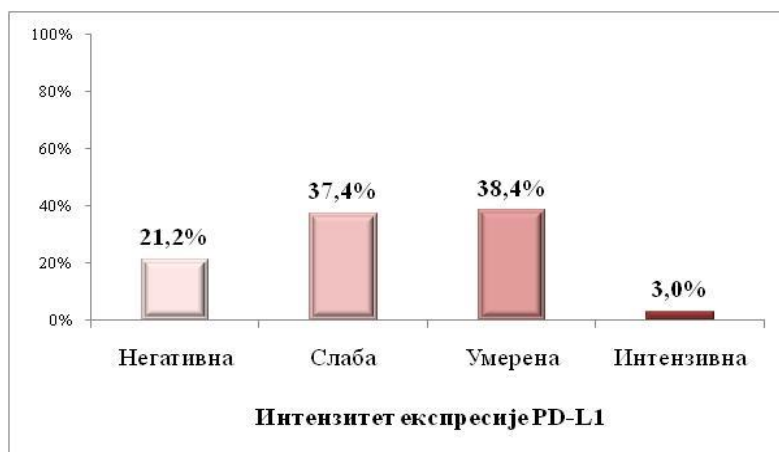
У највећем проценту (75,8%) позитивне ћелије су имале слаб-умерен интензитет експресије PD-L1. Додатном анализом облика (типа) позитивности PD-L1 бојења (фокални vs. дифузни), показано је да од укупног броја узорака ($n=99$), 32 анализирани тумора (32,3%) испољавају фокални, а 29 m-PTC (29,3%) дифузни тип PD-L1 бојења. Ови резултати су приказани на графикону 4.4.1.



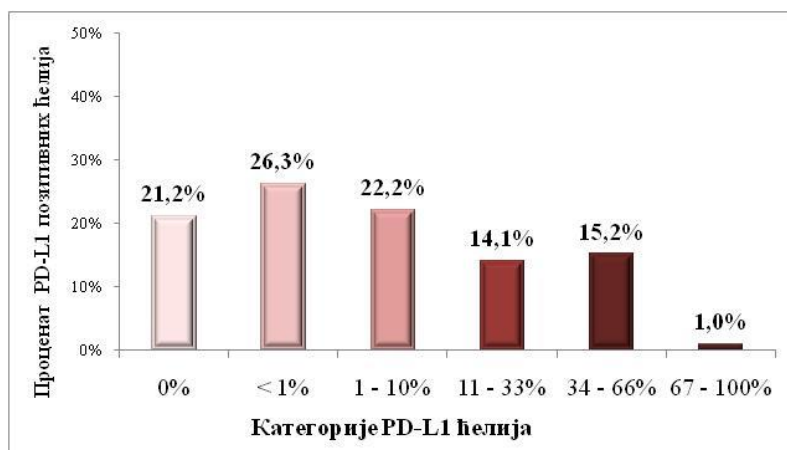
Графикон 4.4.1. Процентуална заступљеност различитих облика експресије PD-L1 у m-PTC.

Средња вредност Алредовог скорa (збир вредности процента позитивних ћелија и вредности интензитета позитивних ћелија) износила је $3,03 \pm 2,04$.

Детектовани проценат позитивних ћелија за PD-L1 у анализираној групи ($n=99$) приказан је на графикону 4.4.2., а дистрибуција интензитета експресије у туморским ћелијама приказана је на графикону 4.4.3.

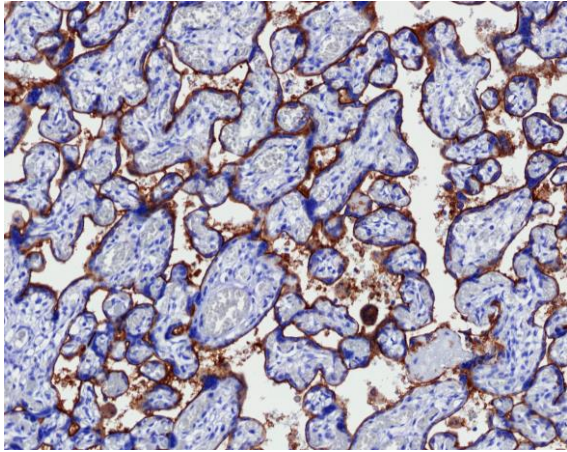


Графикон 4.4.2. Процентуална заступљеност интензитета експресије PD-L1 у m-PTC.

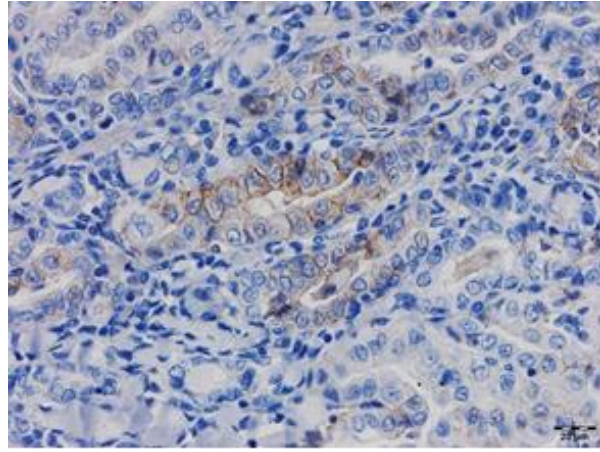


Графикон 4.4.3. Процентуална заступљеност PD-L1 позитивних ћелија у анализираним m-PTC према категоријама Алредовог скоринг система.

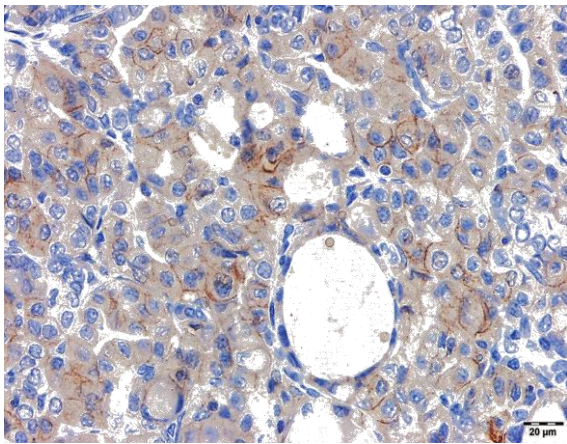
На слици 4.4.1. приказан је различит интензитет експресије PD-L1 протеина на ћелијама анализираних m-PTC, као и различита процентуална заступљеност туморских ћелија са експресијом PD-L1. Приказана је и позитивна контрола за PD-L1 у ткиву плаценте.



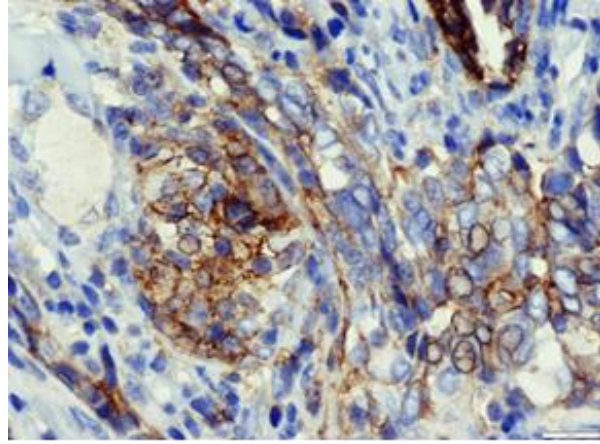
а



б



в



г

Слика 4.4.1. PD-L1 експресија у ткиву плаценте и m-PTC. (а) Дифузна интензивна позитивност за PD-L1 у синциотиотрофобластима плаценте - позитивна контрола; скенирано на увећану $\times 400$. (б) Фокус туморских ћелија са slabом до умереном, мембранском и цитоплазматском експресијом PD-L1 протеина. (в) Поље m-PTC са дифузном мембранском и цитоплазматском експресијом за PD-L1 протеин slabог до умереног интензитета. (г) Поље туморских ћелија са интензивном експресијом за PD-L1 протеин (мембранска и цитоплазматска реакција). Имунохистохемијска детекција PD-L1 ($\times 400$).

4.4.1. Повезаност демографских карактеристика (године, пол) болесника и експресије PD-L1 протеина на туморским ћелијама

Анализом нивоа испољености PD-L1 протеина на ћелијама m-PTC у групама испитаника подељеним на основу пола и година старости, показано је да није било статистички значајне разлике у погледу експресије PD-L1 молекула. Наиме, показано је да је PD-L1 испољен на узорцима ткива тумора 61% жена (47/77) и 63,6% (14/22) мушкараца. Такође, овај молекул је детектован у 63,1% (41/65) узорака ткива млађих од 55 година старости и 58,8% (20/34) узорака ткива старијих од 55 година ($p=0,845$).

Образац експресије PD-L1 молекула у ткиву тумора млађих и старијих испитаника је био различит. У популацији млађих испитаника је нађен већи проценат фокалног облика PD-L1 експресије (35,4%; n=23 наспрам 27,7%; n=18 дифузног облика). Истовремено, у популацији старијих од 55 година је показано веће присуство дифузног типа бојења PD-L1 молекула (32,4%; n=11 наспрам 26,5%; n=9). Табела 4.4.1.1. приказује резултате експресије PD-L1 протеина код испитаника на подељених на групе основу пола и година старости.

Tabela 4.4.1.1. Експресија PD-L1 протеина у односу на демографске карактеристике болесника

Карактеристике	Укупно (%)	Експресија PD-L1 протеина			p
		Негативна n=38 (38,4%)	Фокална n=32 (32,3%)	Дифузна n=29 (29,3%)	
Пол					
Женски	77 (77,8%)	30 (39,0)	25 (32,5)	22 (28,6)	0,954 ^a
Мушки	22 (22,2%)	8 (36,4)	7 (31,8)	7 (31,8)	
Године старости					
<55	65 (65,7%)	24 (36,9)	23 (35,4)	18 (27,7)	0,664 ^a
≥55	34 (34,3%)	14 (41,2)	9 (26,5)	11 (32,4)	

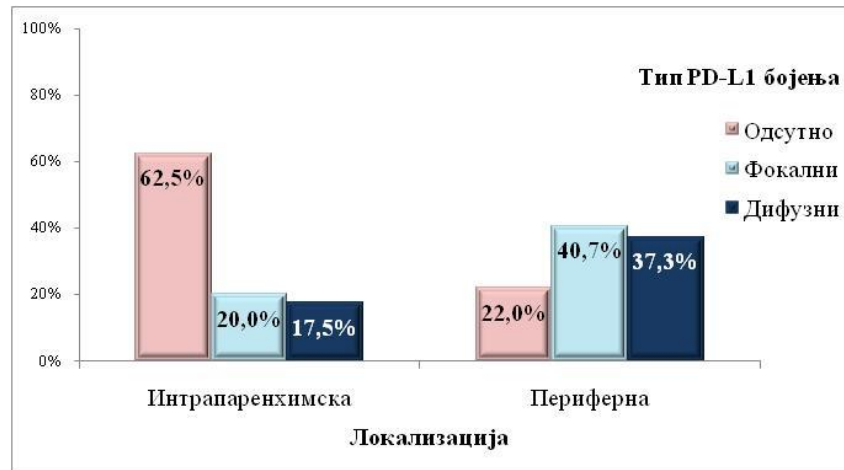
^a Пирсонов хи квадрат тест (χ^2).

4.4.2. Повезаност патохистолошких параметара m-PTC и експресије PD-L1 протеина на туморским ћелијама

4.4.2.1. Локализација m-PTC и експресије PD-L1 протеина

У наредном кораку испитивали смо да ли постоји повезаност експресије PD-L1 молекула и локализације тумора. Према локализацији, анализирани тумори смо поделили у две групе. Прву групу чинили су m-PTC периферне/субкапсуларне локализације (n=59; 59,6%). У другој групи m-PTC су били тумори интрапаренхимске локализације (n=40; 40,4%). У бројнијој групи m-PTC, оних са периферном/субкапсуларном локализацијом детектован је статистички значајно већи проценат узорака који су испољавали PD-L1 протеин (78%; n=46) ($p=0,000$). Међу њима није уочена значајна разлика у типу експресије PD-L1 (фокални 40,7%; n=24 vs. дифузни 37,3%; n=22). Насупрот овоме, у групи m-PTC са интрапаренхимском

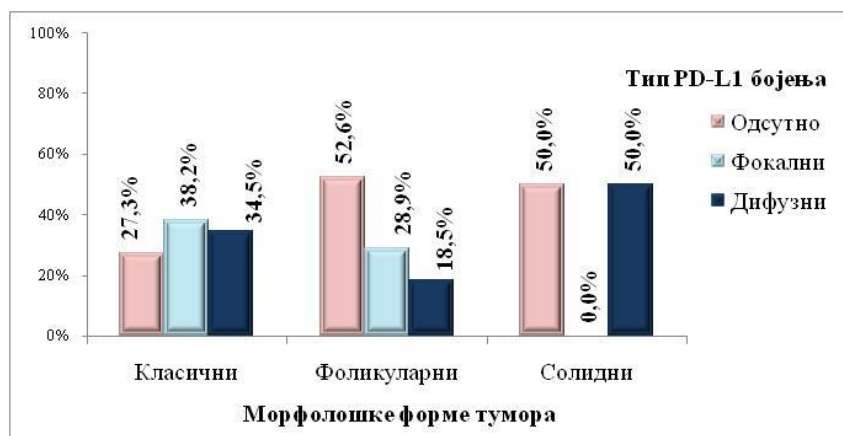
локализацијом (n=40; 40,4%) доминирало је одсуство PD-L1 молекула (негативна реакција у 62,5%; n=25 анализираних узорака). Присуство PD-L1 по типу фокалног бојења је нађено у 20% (n=8) узорака са интрапаренхимском локализацијом, а 17,5% (n=7) тестираних исечака је испољило дифузни тип PD-L1 позитивности. Графикон 4.4.2.1. приказује разлике у експресији PD-L1 у m-PTC различите локализације.



Графикон 4.4.2.1. Експресија PD-L1 у m-PTC интрапаренхимске и периферне локализације.

4.4.2.2. Морфолошка форма m-PTC и експресије PD-L1 протеина

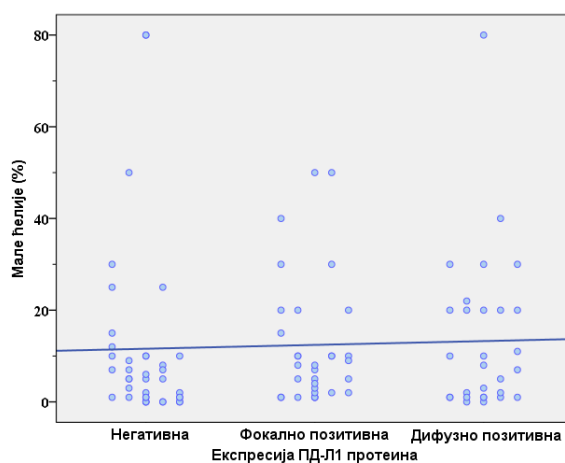
У додатним истраживањима урађена је упоредна анализа нивоа експресије PD-L1 протеина и раличитих морфолошких форми m-PTC (класичне, фоликуларне и солидне грађе). Добијени резултати су приказани на графикону 3.2.2. Више од половине испитаних узорака је имало класичну морфологију (55,6%; n=55), њих 38 (n=38,4) је сврстано у фоликуларну форму m-PTC, а најмањи број болесника је имао солидну форму тумора 6,1% (n=6). У групи тумора класичне морфологије у 72,7% (n=40) узорака је детектована експресија PD-L1, у 38,2% (n=21) по типу фокалне позитивности и у 34,5% (n=19) по типу дифузне позитивности. Насупрот овоме, у групи тумора фоликуларне морфологије, у више од пола испитаних узорака (52,6%; n=20) није нађена PD-L1 експресија ($p=0,031$). У узорцима у којима је детектован PD-L1 (47,4%; n=18) било је више фокалног типа позитивности (28,9%; n=11) у поређењу са дифузним типом PD-L1 позитивности (18,4%; n=7). У најмалобројнијој групи испитаних узорака, туморима солидне морфологије, једна половина није испољавала PD-L1, док је 50% (n=3) испољило PD-L1 по типу дифузног бојења (графикон 4.4.2.1.).



Графикон 4.4.2.2. Процентуална заступљеност различитих облика експресије PD-L1 у морфолошким формама m-PTC.

4.4.2.3. Заступљеност малих ћелија у m-PTC и експресије PD-L1 протеина

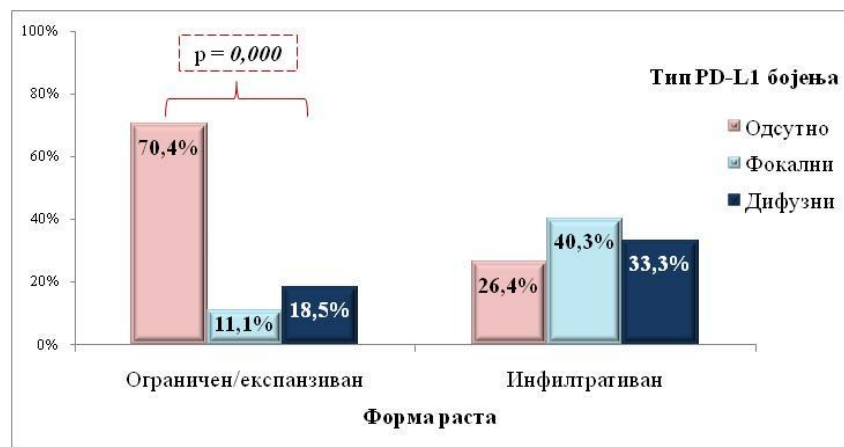
Упоредном анализом процентуалне заступљености малих ћелија у m-PTC и различитих типова експресије PD-L1 протеина у ћелијама тумора, показан је пораст броја малих ћелија у m-PTC са фокалним и дифузним типом експресије PD-L1 молекула али без статистичке значајности (графикон 4.4.2.3.1).



Графикон 4.4.2.3.1. Корелација процентуалне заступљености малих ћелија у m-PTC са типовима експресије PD-L1 у туморским ћелијама.

4.4.2.4. Форма раста m-PTC и експресије PD-L1 протеина

Доминантна форма раста m-PTC у испитиваним узорцима је била инфилтративна (n=72; 72,7%). Значајна већина ових тумора је испољила PD-L1 (73,6%; n=53). Фокална позитивност је нађена у већем броју случајева у поређењу са дифузном (40,3%; n=29 vs. 33,3%; n=24). Насупрот инфилтративној форми тумора, у узорцима m-PTC који су имали експанзивну/ограничену форму раста (27,35%; n=27) уочен је статистички значајно већи број узорака (70,4%; n=19) који није испољио детектабилан PD-L1 ($p=0,000$). Међу PD-L1 позитивним узорцима са експанзивном/ограниченом формом раста уочен је већи број оних који су показали дифузни облик позитивности (18,5%; n=5) у поређењу са фокалном дистрибуцијом бојења (11,1%; n=3) (графикон 4.4.2.4.1.).

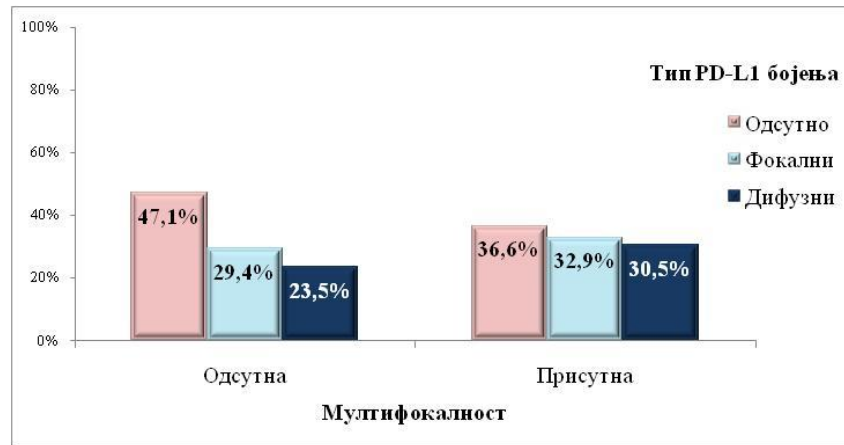


Графикон 4.4.2.4.1. Типови експресије PD-L1 у m-PTC различите форме раста.

4.4.2.5. Мултифокалност/интрагландуларно ширење m-PTC и експресије PD-L1 протеина

Резултати истраживања у којима смо анализирали експресију протеина PD-L1 и МФР/ИГШ су приказани на графикону 4.4.2.5.1. МФР/ИГШ је уочена у 82,8% (n=82) испитаних узорака m-PTC. У овој групи тумора њих 63,4% (n=52) испољава PD-L1. Није било значајне разлике у заступљености два тестирана облика позитивности, фокалног и дифузног (32,9%; n=27 vs. 30,5%; n=25). У малом броју испитаних m-PTC није нађен МФР/ИГШ (17,2%; n=17). У овој групи је 47,1% (n=8) узорака имало

негативну реакцију за PD-L1 (одсуство експресије), док је анализом PD-L1 позитивних тумора показано веће присуство фокалног типа позитивности (29,4%; n=5) у поређењу са дифузним типом PD-L1 бојења (23,5%; n=4).



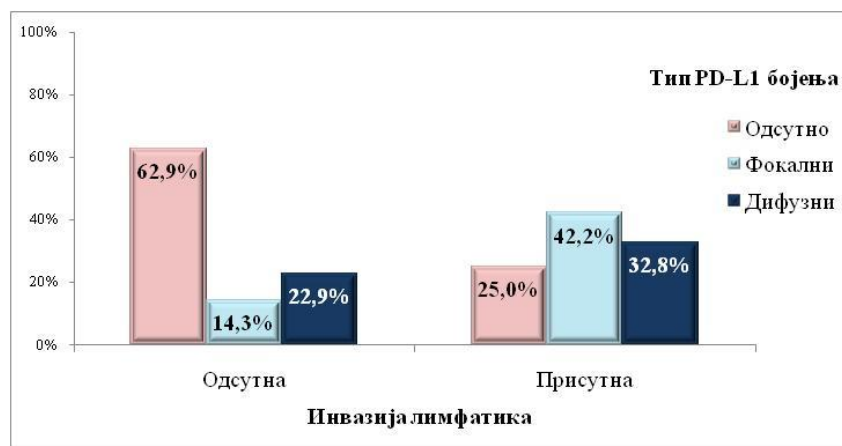
Графикони 4.4.2.5.1. Удруженост мултифокалности/интрагландуларног ширења m-PTC са типовима експресије PD-L1 протеина.

4.4.2.6. Инвазија лимфатика m-PTC, васкуларна инвазија m-PTC и експресија PD-L1 протеина

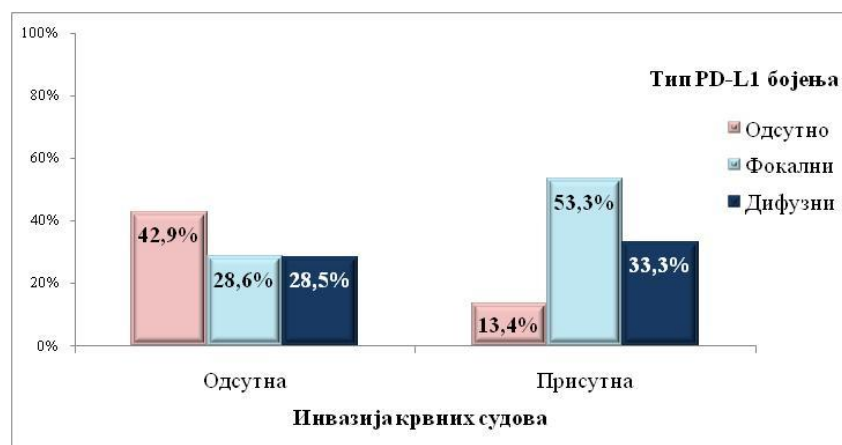
Инвазија лимфатика виђена је у 64 анализирана узорка m-PTC (64,6%). У групи m-PTC са инвазијом лимфатика доминирала је експресија PD-L1 молекула која је детектована у статистички значајно већем броју (75,0%; n=48 vs. 25,0%; n=16; $p=0,000$). Већи проценат PD-L1 позитивних узорака испољавао је фокални облик позитивности (42,2%; n=27) у поређењу са дифузним обликом позитивности (32,8%; n=21). У 35 болесника (35,4%) није детектована инвазија лимфатика. У овој групи доминира одсуство детектабилне експресије PD-L1 протеина (негативна реакција у 62,9%; n=22 случајева), дифузни облик PD-L1 позитивности је нађен у 22,9% (n=8) случајева а фокални у 14,3% (n=5) испитаних узорака (графикон 4.4.2.6.1.).

Насупрот инвазији лимфатика која је детектована у већини узорака, присуство васкуларне инвазије постојало је у 15 анализираних узорака m-PTC (15,2%). Слично као и код инвазије лимфатика, у групи са васкуларном инвазијом доминантно је детектована експресија PD-L1 молекула (86,7%; n=13) у поређењу са групом без експресије PD-L1 молекула (13,3%; n=2) али без статистичке значајности ($p=0,060$). У групи m-PTC са експресијом PD-L1 молекула у 53,3% (n=8) постојао је фокални тип

позитивности, док је дифузни облик позитивности виђен у 33,3% (n=5) случајева. У значајној већини испитаних узорака васкуларна инвазија није детектована (84,8%; n=84). Унутар ове групе, у 42,9% (n=36) узорака реакција на PD-L1 молекул је била негативна, док се PD-L1 позитивност детектовала у преосталом броју (57,1%; n=48), и то у једнаком проценту (28,6%; n=24) у оба испитана облика позитивности, фокалном и дифузном (графикон 4.4.2.6.2).



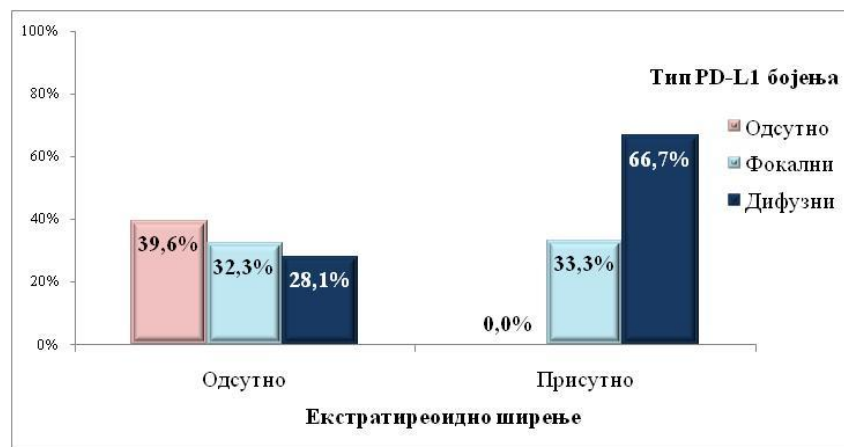
Графикон 4.4.2.6.1. Инвазија лимфатика m-PTC и типови експресије PD-L1 протеина у m-PTC.



Графикон 4.4.2.6.2. Инвазија крвних судова и типови експресије PD-L1 протеина у m-PTC.

4.4.2.7. Екстратиреоидно ширење m-PTC и експресија PD-L1 протеина

У скоро свим тестираним узорцима (97%; n=96) није уочено макроскопско екстратиреоидно ширење (ETE). Међу њима, присуство PD-L1 молекула је нађено у 60,4% (n=58) случајева, док је одсуство позитивности за PD-L1 постојало код 39,6% (n=38) болесника (без статистички значајне разлике, $p=0,283$). У случајевима са детектованим присуством PD-L1 молекула није било значајније разлике у типу позитивности (32,3%; n=31 фокални тип и 28,1%; n=27 дифузни тип). ETE је постојало у само три случаја (3%) испитаних узорака m-PTC. У свима је детектовано присуство PD-L1 молекула, значајније у облику дифузног типа позитивности (66,7%; n=2) у поређењу са фокалним типом позитивности (33,3%; n=1) (графикон 4.4.2.7.1).

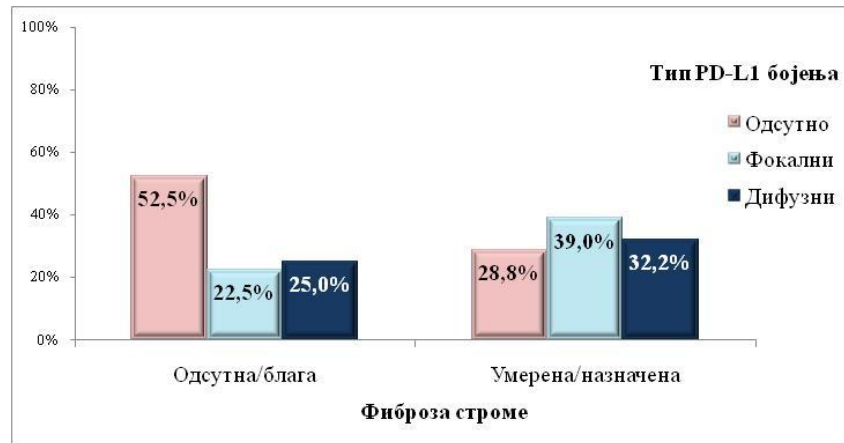


Графикон 4.4.2.7.1. Типови експресија PD-L1 у m-PTC са и без екстратиреоидног ширења.

4.4.2.8. Интерстицијална/интратуморска фиброза m-PTC и експресија PD-L1 протеина

Присуство умерене/назначене ИТФ нађено је у 59,6% (n=59) испитаних узорака m-PTC. У групи тумора са умереном/назначеном ИТФ присуство PD-L1 је показано у статистички значајно већем броју случајева у односу на PD-L1 негативне туморе са овим типом стромалне реакције (71,2%; n=42 vs. 28,8%; n=17; $p=0,030$). Међу PD-L1 позитивним туморима приближно је једнак број оних који испољавају фокалну позитивност (39,0%; n=23) у поређењу са дифузним обликом бојења (32,2%; n=19). У групи тумора са одсутном/благом ИТФ (40,4%; n=40) присуство PD-L1 је показано у 19

случајева или 47,5%. Слично резултатима у туморима са умереном/назначеном ИТФ, међу PD-L1 позитивним m-PTC са одуством/благом ИСФ/ИТФ, постојао је приближно исти број оних који испољавају фокалну (22,5%; n=9) и дифузну позитивност (25,0%; n=10).

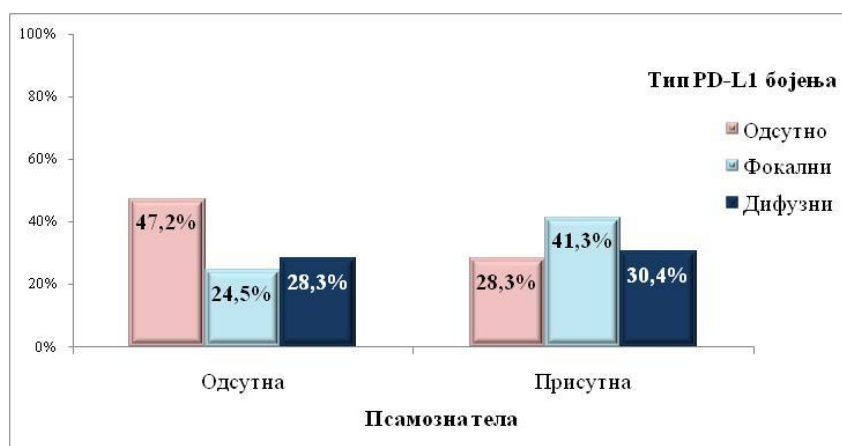


Графикон 4.4.2.8.1. Интерстицијална/интратуморска фиброза m-PTC и типови експресије PD-L1.

4.4.2.9. Присуство псамозних тела и стромалних калцификата у m-PTC и експресија PD-L1 протеина

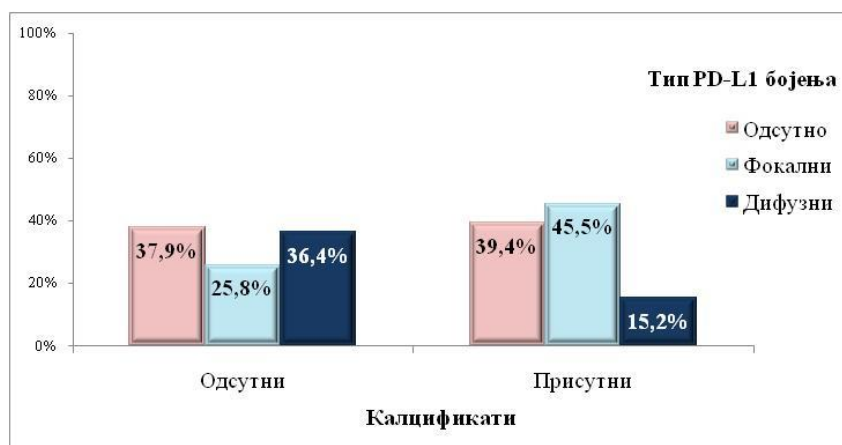
Резултати истраживања у којима смо анализирали присуство ПТ у m-PTC и експресију протеина PD-L1 су приказани на графикону 4.4.2.9.1. ПТ нису нађена у 53,5% (n=53) испитаних случајева. У овој групи тумора, присуство PD-L1 је детектовано у 52,8% (n=28) узорака, без значајне разлике у заступљености дифузног и фокалног облика бојења (28,3%; n=15 vs. 24,5%; n=13). Присуство ПТ је постојало у 46,5% (n=46) испитаних тумора, а PD-L1 експресија је постојала у 71,1% (n=33) ове групе m-PTC. Анализом облика експресије PD-L1 уочен је већи број тумора са фокалном дистрибуцијом (41,3%; n=19) у поређењу са дифузном дистрибуцијом (30,4%; n=14) овог молекула.

Присуство стромалних калцификата постојало је у 33,3% (n=33) и било одсутно у 66,7% (n=66,7) испитаних узорака m-PTC. У обе групе (са и без стромалних калцификата) су одсуство и присуство PD-L1 уочени у приближно истом проценту узорака: одсуство у нешто мање од 40% случајева и присуство PD-L1 у нешто више од 60%.



Графикон 4.4.2.9.1. Типови експресије PD-L1 у групама m-PTC са и без присуства псамозних тела.

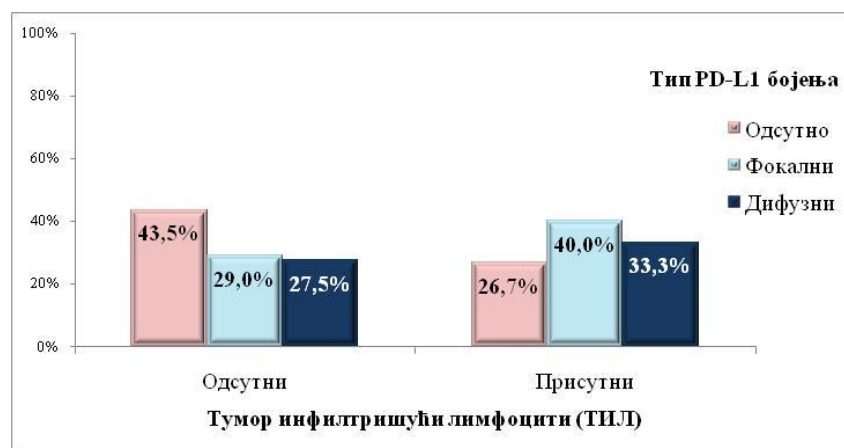
Разлике су нађене у заступљености типова PD-L1 позитивности у групама PD-L1 позитивних узорака. Наиме, у групи тумора са стромалним калцификацијама који су PD-L1 позитивни значајно је веће присуство фокалног типа позитивности у поређењу са дифузним типом бојења (45,5%; n=15 vs. 15,2%; n=5). Насупрот овоме, у групи тумора без стромалних калцификација који су PD-L1 позитивни значајно је веће присуство дифузног типа позитивности у поређењу са фокалном дистрибуцијом (36,4%; n= 24 vs. 25,8%; n=17) (графикон 4.4.2.9.2).



Графикон 4.4.2.9.2. Типови експресије PD-L1 у групама m-PTC са и без присуства стромалних калцификата.

4.4.2.10. Присуство тумор инфилтришућих лимфоцита, мултинуклеарних циновских ћелија и PD-L1 позитивних лимфоцита у m-PTC и експресија PD-L1 протеина у туморским ћелијама

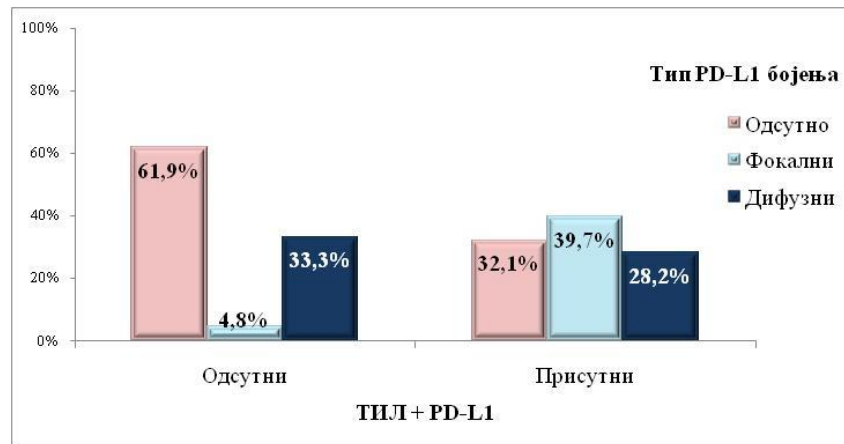
Богата инфилтрација ТИЛ постојала је у 30,3% (n=30) анализираних m-PTC, а сиромашна инфилтрација ТИЛ у 69,7% (n=69) узорака. У групи m-PTC са богатом инфилтрацијом ТИЛ присуство PD-L1 молекула је детектовано у већем броју случајева у односу на PD-L1 негативне узорке али без статистичке значајности (73,3% vs. 26,7%; $p=0,277$). Микрокарциноми са богатом инфилтрацијом ТИЛ испољавали су PD-L1 молекуле, више у облику фокалне (40%; n=12) него дифузне позитивности (33,3%; n=10). У групи m-PTC са сиромашном инфилтрацијом ТИЛ, 56,5% узорака испољава PD-L1 молекуле и нема значајне разлике у заступљености облика позитивности (29%; n=20 фокални и 27,5%; n=19 дифузни) (графикон 4.4.2.10.1.).



Графикон 4.4.2.10.1. Удруженост типова експресије PD-L1 у m-PTC са или без богате инфилтрације ТИЛ.

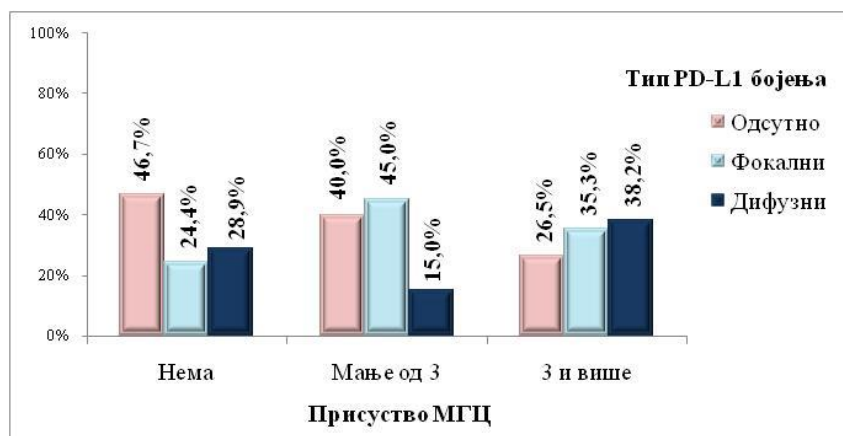
Спирмановом корелационом анализом, покзано је да је богата инфилтрација m-PTC ТИЛ у позитивној корелацији са присуством PD-L1 позитивних лимфоцита ($\rho=0,288$; $p=0,004$), LT ($\rho=0,216$; $p=0,032$) и присуством МЦЋ ($\rho=0,280$; $p=0,005$). Додатно је анализирано присуство PD-L1 позитивних ТИЛ (графикон 4.4.2.10.2.). Као што се може запазити, ове ћелије су биле присутне у већини испитиваних узорака тумора (78,8%; n=78). У овој групи тумора PD-L1 позитивност је детектована у 67,9% (n=53) узорака и статистички је била значајно већа у односу на број m-PTC без PD-L1 позитивности (32,1%; n=25) ($p=0,025$). ТИЛ богати m-PTC чешће су показивали фокални облик PD-L1 позитивности (39,7%; n=31) у поређењу са дифузним типом бојења (28,2%; n=22).

Насупрот овоме, у групи тумора у којима су PD-L1 позитивни ТИЛ били одсутни (21,2%; n=21) уочљиво је одсуство PD-L1 бојења у више од пола узорака (61,9%; n=13). Истовремено, у овој групи тумора (одсутни PD-L1 позитивни ТИЛ), у узорцима у којима је детектовано присуство PD-L1 бојења (38,1%; n=8) доминира дифузни тип позитивности (33,3%; n=7) у поређењу са фокалним типом експресије PD-L1 молекула (4,8%; n=1).



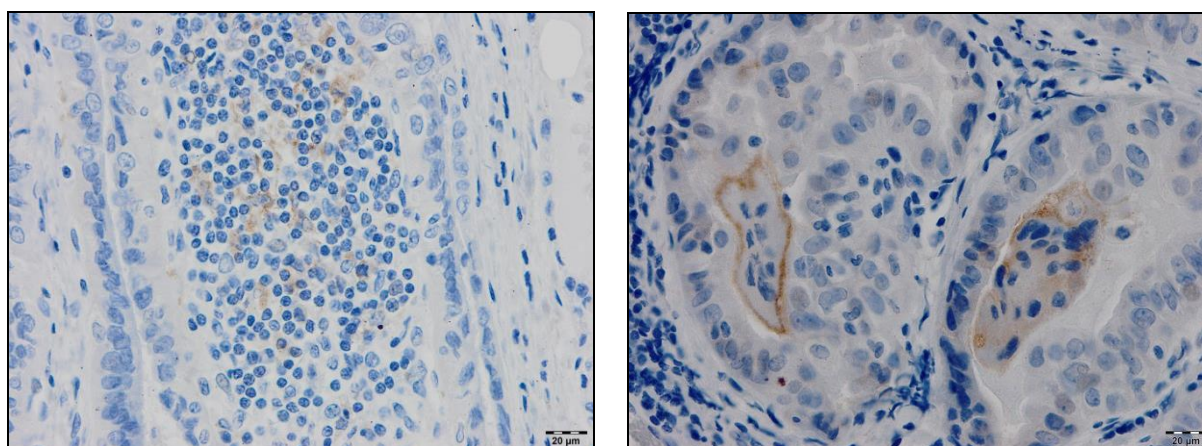
Графикон 4.4.2.10.2. Заступљеност PD-L1 позитивних ТИЛ у m-PTC са различитим облицима експресије PD-L1 на туморским ћелијама.

Истраживали смо и повезаност присуства интратуморских МЦЋ и PD-L1 молекула. Ови резултати су приказани на графикону 4.4.2.10.3. Тумори су подељени на групу у којој нису уочене МЦЋ (45,5%; n=45), групу у којој је било највише 3 МЦЋ (20,2%; n=20) и групу у којој је показано више од МЦЋ (34,3%; n=34). У анализираним групама m-PTC са различитом заступљеношћу МЦЋ није постојала статистички значајна разлика у присуству и облику PD-L1 експресије (p=0,186). У групи тумора у којима су МЦЋ одсутне, 53,3% (n=24) тумора испољава PD-L1 без значајне разлике у заступљености типова PD-L1 позитивности (28,9%; n=13 дифузни и 24,4%; n=11 фокални тип). Међутим, у групи тумора у којима је било присутно >3 МЦЋ, PD-L1 је присутан у 60% (n=12) m-PTC, значајно више у облику фокалне позитивности (45%; n=9) у односу на дифузну PD-L1 обојеност (15%; n=3). Уочљива разлика у групи тумора са >3 МЦЋ је већи проценат PD-L1 позитивних m-PTC (73,5%; n=25) међу којима су оба типа позитивности слично заступљена (35,3%; n=12 фокални и 38,2%; n=13 дифузни).



Графикон 4.4.2.10.3. Повезаност типова експресије PD-L1 у m-PTC са различитим бројем МЦЋ.

На слици 4.4.2.10.1. (а и б) је приказана имунохистохемијска експресија PD-L1 ТИЛ и МЦЋ.



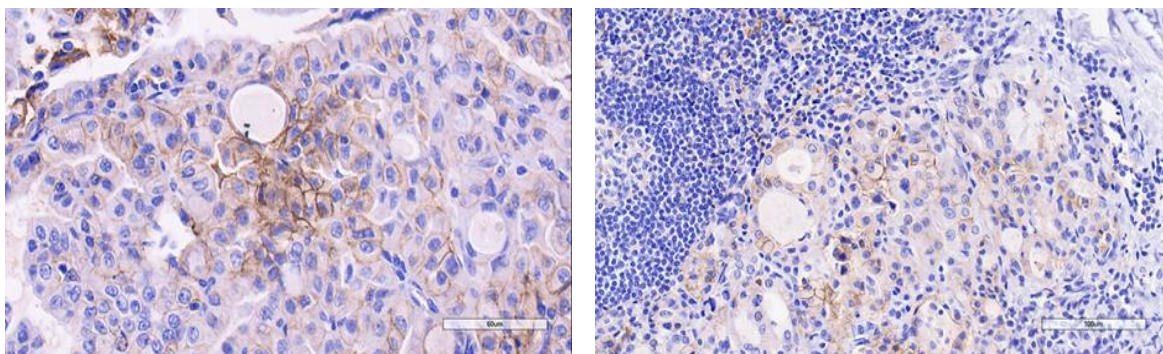
Слика 4.4.2.10.1. Експресије PD-L1 у ТИЛ и МЦЋ. (а) Богата инфилтрација m-PTC ТИЛ у којима се имунохистохемијски детектује експресија PD-L1 (x400); (б) Интратуморске МЦЋ са позитивном експресијом PD-L1 (x400).

4.4.2.11. Присуство лимфоцитног тиреоидитиса и експресија PD-L1 протеина

Присуство лимфоцитног тиреоидитиса (ЛТ) нађено је у мањем броју испитаних m-PTC (20,2%; n=20). У овој групи тумора већи број узорак (n=16; 80%) испољио је PD-L1 позитивност, док у 20% (n=4) није уочено присуство овог молекула. У групи m-PTC са ЛТ већи број узорак показивао је форму дифузног PD-L1 бојења (45%; n=9) (слика

4.4.2.11.1), у поређењу са фокалним бојењем (35%; n=7). Такође, применом Спирманове корелационе анализе показана је статистички значајна позитивна корелација између присуства ЛТ и експресије PD-L1 ($\rho=0,210$; $p=0,037$) и између ЛТ и ТИЛ богате инфилтрације m-PTC ($\rho=0,216$; $p=0,032$).

Туморски неизмењено ткиво жлезде укупно анализираних групе (n= 99) није показивало експресију PD-L1 молекула у 58,58% анализираних ШЖ (n=58). У 36 случаја (36,36%) позитивна реакције за PD-L1 у ненеопластичним ћелијама је била слаба, неспецифична и налазила се у појединачним или малим групама тироцита. Оваква неспецифична реакција детектована је увек у ћелијама око којих се налазила лимфоцитна инфилтрација (невезано за постојање ЛТ) и то деловима ткива удаљено од присутног тумора или непосредно уз инфилтративну ивицу тумора. Међутим, у 5 (5,05%) узорак ткива ШЖ, код болесника са ЛТ и богатом инфламацијом ШЖ, виђене су мање групе ненеопластичних тироцита са добро дефинисаном слабом до умереном мембранском и/или цитоплазматском експресијом PD-L1 (слика 4.4.2.11.1. а-б). Поред туморских ћелија позитивност за PD-L1 постојала је у МЦТ (најмање у једној ћелији анализираних тумора) и хистиоцитима туморске строге.



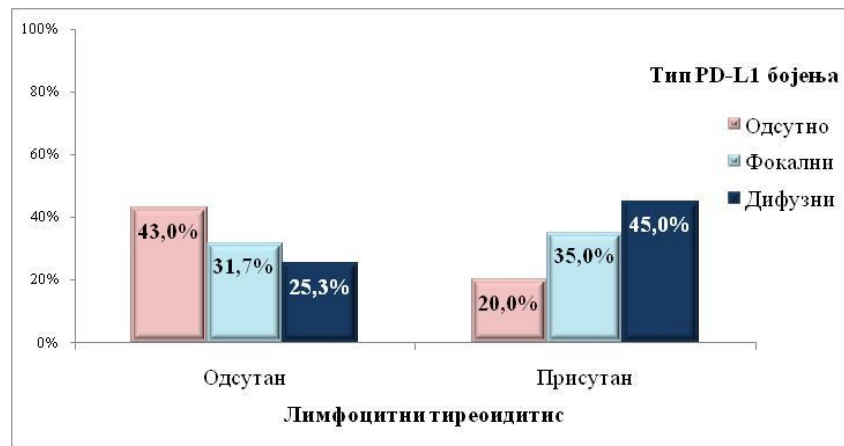
а

б

Слика 4.4.2.11.1. PD-L1 експресија у ШЖ код болесника са ЛТ. (а) m-PTC у ШЖ са ЛТ, присутна је позитивност за PD-L1 у више од 50% ћелија тумора различитог интензитета; (б) Уочава се експресија у нетуморским ћелијама/тиреоцитима и мањим групама лимфоцита у ШЖ са ЛТ; Детаљи скенираних микрофотографија (x400). Имунохистохемијска детекција PD-L1.

Већи број испитаних тумора (79,8%; n=79) није показао присуство ЛТ. У овој групи, присуство PD-L1 је показано у 57% (n=45) узорак, уз већу заступљеност фокалног облика PD-L1 позитивности (31,6%; n=25) у поређењу са дифузним типом бојења (25,2%; n=20) (графикон 4.4.2.11.1.).

Није постојала статистички значајна разлика у експресији PD-L1 протеина у узорцима m-PTC са и без ЛТ ($p=0,102$).

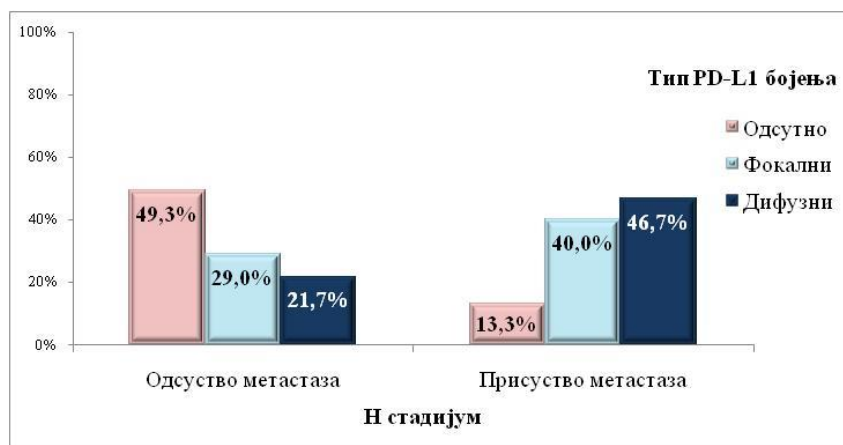


Графикон 4.4.2.11.1. Типови експресије PD-L1 у ћелијама m-PTC ШЖ са и без присуства ЛТ.

4.4.3 Присуство метастаза у лимфним чворовима врата и експресија PD-L1 протеина у ћелијама m-PTC

Метастазе у ЛЧ врата су постојале у 30,3% ($n=30$) болесника. У m-PTC узорцима ових пацијената показано је доминантно присуство PD-L1 у ткиву тумора (86,7%; $n=26$), док у само 13,3% ($n=4$) m-PTC са метастазама у ЛЧ није детектована позитивна реакције за PD-L1 молекул. У поређењу са овим, у ткиву тумора болесника у чијим ЛЧ врата није било метастаза (69,7%; $n=69$), у 49,3% ($n=34$) испитаних m-PTC није забележено присуство PD-L1 позитивности, док је позитивност забележена у 50,7% ($n=35$). Упоредивањем укупног броја PD-L1 позитивних m-PTC са и без метастаза показана је статистички значајна разлика у експресији PD-L1 у ћелијама метастатских m-PTC (86,7% vs 50,7%; $p=0,002$).

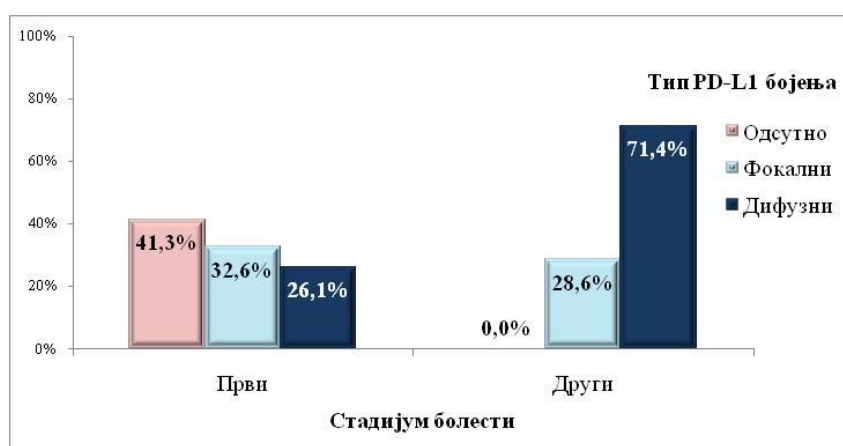
Већи проценат m-PTC са метастазама у ЛЧ показивао је дифузни облик позитивности (46,7%; $n=14$) у поређењу са фокалним обликом (40%; $n=12$). Насупрот томе, у групи m-PTC без метастаза у ЛЧ детектована је PD-L1 позитивност, више у форми фокалне обојености (29%; $n=20$) него по типу дифузног бојења (21,7%; $n=15$) (графикон 4.4.3.1).



Графикон 4.4.3.1 Типови експресије PD-L1 у ћелијама m-PTC са и без присуства метастаза у ЛЧ врата.

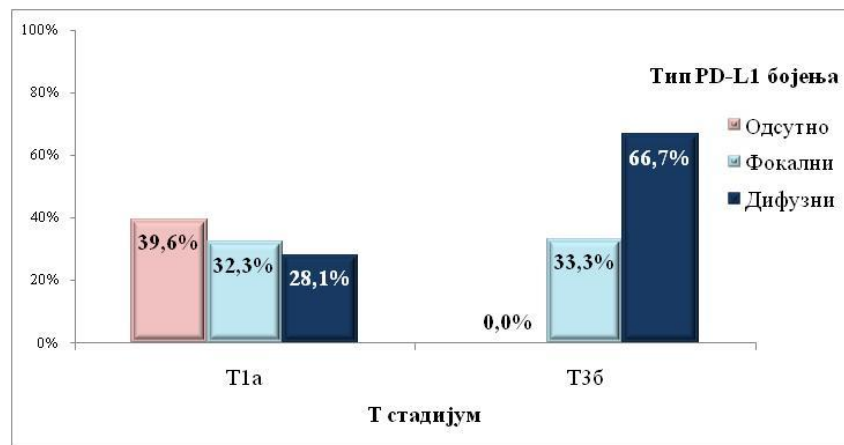
4.4.4. Патолошки и клинички стадијуми болести и експресија PD-L1

Већина испитаника се налазила у првом стадијуму болести (92,9%; n=92). Испољеност PD-L1 молекула у анализираним m-PTC ових пацијената је износила 58,7% (n=54), при чему је детектовани образац позитивности фокални vs. дифузни износио 32,6%; n=30 vs. 26,1%; n=24. Само 7,1% (n=7) пацијената се налазило у другом стадијуму болести. Код свих је у ткиву тумора детектовано присуство PD-L1 (100%) што се показало статистички значајним (100% vs 58,7%; $p=0,002$). У овој групи је уочена значајно већа заступљеност дифузног облика PD-L1 бојења (71,4%; n=5) у поређењу са фокалним (28,6%; n=2). Описани резултати су приказани на графикону 4.4.4.1.



Графикон 4.4.4.1. Типови експресије PD-L1 у m-PTC код болесника у првом и другом клиничком стадијуму болести.

Резултати испитивања експресије PD-L1 молекула у туморима различитих патолошких T стадијума су приказани на графикону 4.4.4.2. Уочава се да се већина пацијената налазила у T1a стадијуму (97%; n=96). Присуство PD-L1 молекула у ткиву испитиваног тумора је у овој групи пацијената показано у 60,4% (n=58) узорака, што се није показало статистички значајним у односу на групу тумора без присуства PD-L1 (39.6%; n=38) ($p=0,283$). Дистрибуција типова PD-L1 позитивности је износила 32,3% (n=31) фокални тип наспрам 28,1% (n=27) дифузни тип. У T3b стадијуму болести налазило се 3% (n=3) испитаних пацијената. Код свих је у ткиву тумора детектовано присуство PD-L1 и нађено је веће присуство дифузног облика PD-L1 бојења (66,7%; n=2) у поређењу са фокалним (33,3%; n=1).



Графикон 4.4.4.2. Типови експресије PD-L1 у m-PTC код болесника у различитим патолошким T стадијумима болести.

5. ДИСКУСИЈА

У последње три деценије дијагностика и лечење m-PTC су у центру интересовања тиреолога различитих профила. Разлози оваквог интересовања су последица вишеструког пораста учесталости m-PTC који данас чине половину новодијагностикованих карцинома ШЖ [3, 14, 23]. Са друге стране m-PTC најчешће показује бенигно клиничко понашање. Само мањи број m-PTC испољава елементе агресивности као што су: присуство метастаза у ЛЧ врата, локалних рецидива или удаљене метастазе [23, 24]. Ради издвајања мање групе тумора са биолошким потенцијалом агресивности до данас је учињен велики број морфолошких, клиничких и молекуларних истраживања m-PTC. Резултати истраживања стратификације ризика биолошког понашања тумора имају циљ да омогуће примену одговарајућег типа хируршког и постоперативног лечења болесника са дијагностикованим m-PTC [18, 38, 48, 56, 92].

Резултати већег броја студија показали су позитивну корелацију појединих клиничких и морфолошких карактеристика m-PTC са током болести раном појавом метастаза у ЛЧ врата и настанком рецидива болести. У ове клиничко-патолошке параметре спадају: стадијум болести, мушки пол, старост болесника (<45 година), величина тумора, класична и морфолошка форма високих ћелија, инфилтративни раст, МТФ/ИГШ, билатералност, присуство назначене ИТФ и ЕТШ. Ипак сви појединачно наведени параметри присутни су чешће у дијагностикованим m-PTC од броја m-PTC који ће временом испољити неповољни клинички ток, због чега се не могу узети као сигурни, појединачни и независни клиничко-патолошки елементи агресивности m-PTC [18, 49, 51, 52, 55, 56, 61, 62, 68-71, 136]

У само неколико студија као фактор ризика агресивности m-PTC наводи се периферна/субкапсуларна локализација тумора [55, 66, 137]. Резултати анализе Сиобани и сар. показали су да су код m-PTC периферне локализације чешће метастазе у ЛЧ врата, ЕТШ и лимфоваскуларна инвазија [66]. Утицај периферне локализације на агресивност m-PTC, истраживали су и Niemeier LA и сар. који су показали значај периферне локализације на појаву метастаза у ЛЧ метастаза и рецидива болести, код

тумора са присутном назначеном ИТФ, МТФ/ИГШ и мутацијом V600E *BRAF* гена кроз одређивање патолошко-морфолошког скорa [55].

Периферна локализација m-PTC наводи се као место честе појаве m-PTC [3, 4]. Постоје само две студије о значају учесталости m-PTC периферне локализације [66, 138], а само у једној од њих анализиране су морфолошке специфичности и разлике периферно локализованих и интрапаренхимски локализованих m-PTC [138].

Због свега наведеног, један од циљева ове дисертације био је испитивање значаја периферне локализације m-PTC на појаву метастаза у ЛЧ врата и повезаност локализације m-PTC (периферне и интрапаренхимске) са раније потврђеним клиничко-патолошким карактеристикама агресивности ове варијанте PTC.

Анализирали смо селектовану групу болесника са учињеном тоталном тиреоидектомијом и дијагностикованим m-PTC најмањег промера 5 mm. Овај промер тумора изабран је као параметар селекције због тога што је у више студија показано да представља један од ризика агресивности m-PTC [18, 24]. У нашој хируршкој серији, коју за испитивани период чине 446 случаја узастопно дијагностикованих m-PTC, тумори са најмањом величином од 5 mm чине само 26%. Овакви резултати углавном нису у складу са резултатима већег броја хируршких серија и мета-анализе из 2017. године у којима се чешће пријављују m-PTC већи од 5 mm [18, 68, 74,] али постоје и студије у којима већину m-PTC чине тумори мањих димензија [24, 56,82].

Разлог оваквог резултата може бити последица начина макроскопске обраде ткива која у нашем Институту укључује већи број серијских пресека кроз ткиво ШЖ као и већи број обрађених узоракa за патохистолошку дијагнозу. Разлика у пријављивању величине m-PTC може бити и условљена дијагностичким приступом и/или искуством патолога у детекцији најмањих туморских фокуса, често субмилиметарских димензија. Детаљнија обрада ткива утиче и на детекцију броја издвојених туморских микрофокуса, односно присуство МТФ/ИГШ [6, 18].

У нашој анализираној групи m-PTC, МТФ/ИГШ дијагностиковали смо код 82,8% болесника што представља већу учесталост од до сада објављених резултата који се налазе у распону од 15,5% до 40% [18, 49, 51, 52, 55, 61, 62]. Могући разлог литературно нижих пријављивања учесталости МТФ/ИГШ у m-PTC односи се на примењену методологију којом није учињено разликовање мултицентричности m-PTC

од ИГШ . Резултати наше анализе су у складу са резултатима анализе Niemeier LA и сар. чију смо методологију применили, а који су МТФ/ИГШ детектовали у 90% групе агресивних m-PTC [55]. Поред начина обраде ткива, висока учесталост МТФ/ИГШ може се објаснити и тиме што селектовану групу наше серије чине m-PTC већих димензија који чешће показују МТФ/ИГШ. У случајевима PTC већих димензија пријављивање мултифокалности иде и до 87% [139].

Резултат наше студије показују да је у селектованој групи болесника m-PTC чешће био локализован у периферном делу ШЖ али без статистичке значајности. Овај резултат има ограничен значај јер обухвата само групу m-PTC најмање величине од 5 mm и не односи се на укупан број дијагностикованих тумора. Полазећи од чињенице да је од укупног броја дијагностикованих m-PTC само 26% имало најмању величину од 5 mm, може се закључити да се периферно локализовани m-PTC чешће налазе у групи тумора већих димензија. Са друге стране, од укупног броја узастопно дијагностикованих m-PTC за анализирани период периферно локализовани m-PTC чине 27,35% (n=122/446; 27,35%; необјављени резултати из архиве Института за патологију и судску медицину, Војномедицинске академије), односно значајније мањи број тумора у односу на m-PTC интрапаренхимске локализације. Студије које су анализирале учесталост m-PTC у различитим локализацијама одређеним према површини ШЖ, такође налазе да је већи број тумора локализован у несубкапсуларном, односно интрапаренхимском делу ШЖ [66, 138].

Поред већих димензија, макроскопску детекцију m-PTC периферне локализације омогућује и морфолошка различитост периферно локализованих тумора. Слично резултатима наших истраживања и Tallini G и сар. [138] су показали да периферно локализовани m-PTC чешће имају назначену ИТФ. Због присуства назначене ИТФ m-PTC са периферном локализацијом имају карактеристичан, лако препознатљив макроскопски изглед налик ожиљку. Оваква макроскопска и микроскопске слика тумора историјски су давно описани, а пратио их је и стари назив „субкапсуларна склерозирајућа варијанта m-PTC” [7, 8, 81].

Због свега наведеног, може се закључити да је често детектовање m-PTC у периферним деловима жлезде [4] није последица настанка већег броја тумора у овој зони већ њиховог лакшег макроскопског и микроскопског препознавања.

Резултати наше анализе показали су да периферна локализација m-PTC представља независан клиничко-патолошки параметар повезан са чешћим метастазирањем m-PTC у ЛЧ врата, и да су m-PTC периферне локализације морфолошки различити од интрапаренхимских m-PTC. Морфолошке разлике обухватају значајније чешћу појаву описаних морфолошких елемената агресивности m-PTC као што су класична морфолошка форма, инфилтративни раст тумора са инвазијом лимфатика и крвних судова, назначена ИТФ. Присуство ПТ и МЦЋ је такође значајније присутно у периферно локализованим m-PTC. Присуство ПТ у РТС је у неколико студија повезано са неоповољним клиничким праматрима РТС као што су присуство метастаза у регионалним ЛЧ, удаљених метастаза, стадијум болести и мултифокалност [130, 141]. Повезаност клиничко-патолошких карактеристика РТС и присуства МЦЋ је ретко анализирано у РТС, а нарочито у m-PTC. У нашој анализи присуство МЦЋ детектовано је у 54,5% случајева m-PTC. Ова заступљеност је нешто виша од резултата анализе Virk и сар. где је заступљеност МЦЋ износила 41,3% и била је детектована чешће код m-PTC са мутацијом V600E *BRAF* [81]. У студији Brooks и сар. МЦЋ су детектоване у 58,1% анализираних РТС свих величина укључујући и m-PTC са тенденцијом чешћег присуства у класичној варијанти РТС. Резултатима ове анализе показали су и хистиоцитно порекло МЦЋ и њихово испољавање функције колоидофага. Такође, показано је да се већи број интратуморских МЦЋ налази у позитивној корелацији са величином РТС и појавом ЕТШ [133]. У анализи Gulubova и сар. утврђена је позитивна корелација између густине МЦЋ и узрапредовалог стадијума болести, односно прогресије РТС [141]. Имунохистохемијским анализама Brooks и сар. су у већини РТС са МЦЋ доказали експресију CD163 молекула у МЦЋ. Због тога што се CD163 молекул сматра једним од маркера макрофага М2 типа са доказаним протуморогеним ефектом [142], може се претпоставити утицај МЦЋ на прогресију и опстанак периферно локализованих m-PTC.

У периферно локализованим m-PTC у односу на туморе са интрапаренхимском локализацијом утврдили смо да се чешће детектују, МТФ/ИГШ, ЕТШ као и богата инфилтрација ТИЛ али без статистичке значајности. Ови резултати о морфолошкој различитости периферно и интрапаренхимски локализованих m-PTC у сагласности су са резултатима других аутора [138] и упућују на то да морфологија и биолошко понашање m-PTC не зависе само од типа генетичких измена већ и од локализације тумора у ШЖ. Tallini и сар. су такође детектовали значајније чешћу појаву мутације V600E *BRAF* у туморима периферне локализације [138]. Због тога се може претпоставити да

комбиновани утицај ове генетичке измене и специфичности микросредине периферне/субкапсуларне зоне ШЖ одређују морфолошке карактеристике и клиничко понашање m-PTC што је у потпуности у складу са резултатима рада Niemeier и сар. [55].

Периферна локализација m-PTC препозната је и као важан клинички параметар у селекцији болесника код којих постоји могућност активног праћења болести [136]. Према протоколу о активном праћењу болесника са m-PTC, присуство тумора уз постериорну страну или непосредно уз део ШЖ према душнику носи повећани ризик инфилтрације суседних структура пре свега рекурентног нерва и представља индикацију за хируршко лечење [136, 143]. Генерално, карциноми ШЖ димензија испод 10 mm, у случајевима регуларне или увећане ШЖ могу показати ЕТШ најчешће или искључиво у случајевима периферне локализације. Изузетак могу представљати микрокарциноми у ШЖ са значајнијом редукцијом волумена, као што се може видети у случајевима атрофичне варијанте ЛТ или завршне фазе Хашимотовог тиреоидитиса [144]. Разматрајући нормалну анатомску грађу ШЖ, истмус и горњи полови режњева ШЖ имају реалтивно малу количину ткива због чега се m-PTC, нарочито они већих димензија налазе непосредно уз површину жлезде, односно задовољавају критеријуме дефиниције периферно локализованих m-PTC. Значај „раног“ метастазирања m-PTC у околностима њихове истмичне локализације или локализације у горњем полу режњева ШЖ показан је у неколико студија [145, 146].

У нашој анализираној групи код три m-PTC утврђено је макроскопско ЕТШ од којих су два тумора била периферне локализације. Налаз једног случаја интрапаренхимски локализованог m-PTC са макроскопским ЕТШ је последица примењене методологије. У овом случају карцином је био издуженог, овалног облика, са највећом димензијом од 10 mm и попречно постављен у односу на површину жлезде. Због тога што је његов субкапсуларни део обухватао мање од 20% обима тумора, m-PTC је класификован као интрапаренхимски. Због малог броја m-PTC са макроскопским ЕТШ није доказана статистичка значајност овог типа ЕТШ у односу на локализацију m-PTC. Са друге стране статистички значајним показало се присуство минималног ЕТШ у групи m-PTC периферне локализације. Овакви резултати су у складу са резултатима Jiang и сар. по којима субкапсуларни m-PTC статистички значајније показују обе форме ЕТШ [143]. Значај макроскопског ЕТШ за прогнозу болести је показан у великом броју студија. Макроскопски ЕТШ утиче на стадијум болести, проширеност хируршког лечења и примену пост оперативне терапије радиоактивним јодом [38, 48, 72, 136]. Насупрот

макроскопском ЕТШ значај микроскопског ЕТШ није још увек у потпуности разјашњен. Према резултатима одређеног броја истраживања, микроскопско ЕТШ не утиче на прогнозу лечења болести [147, 148]. Због тога, према најновијој АЈСС/ТНМ класификацији продор туморских ћелија у перитиреоидно масно и везивно ткиво не утиче на одређивање вишег стадијума болести који би последично захтевао примену радикалнијег лечења. Према томе тумачење агресивности m-РТС са периферном локализацијом и микроскопским ЕТШ, односно вишим стадијумом болести није оправдано важећом АЈСС/ТНМ класификацијом стадијума болести. Са друге стране, већи број публикација истиче значај микроскопског ЕТШ у појаву метастаза РТС и m-РТС у регионалним ЛЧ уз или без додатног утицаја на појаву рецидива [74, 149-151]. Чињеница да периферно локализовани m-РТС чешће метастазирају у регионалне ЛЧ може се објаснити инфилтративним растом тумора ове локализације са последичном појавом лимфатичке инвазије и инвазије васкуларних простора, као и анатомским карактеристикама лимфатичког система ШЖ. Лимфни судови ШЖ настају у интерфоликуларним просторима и формирају богату интрагландуларну мрежу лимфатика која се шири путем интерлобуларних септи ШЖ и нарочито је изражена у периферној зони ШЖ где се формирају крупни сабирни лимфатички дуктуси. Ова богата мрежа лимфатика налази се и унутар перитиреоидног масног и везивног ткива, одакле се лимфа дренира у регионалне ЛЧ [152, 153]. Ширење малигнитета путем лимфатика могуће је инфилтрацијом новоформираних или претходно присутних лимфних судова, а већа густина перитуморских лимфатика је блиско повезана са појавом нодалних метастаза различитих малигнитета укључујући и РТС [154]. Због густине лимфатика периферне зоне ШЖ и перитиреоидног ткива, њихове величине и њихове блиске повезаности са венским системом, периферно локализовани m-РТС инфилтративног раста имају могућност брже и лакше инфилтрације лимфатика и васкуларних простора што је основни предуслов интра- и екстрагландуларне лимфогене дисеминације туморских ћелија [67, 153].

Присуство васкуларне и лимфатичке инвазије m-РТС пријављено је у широком распону од 2,5% до 67% [66, 81, 155-158]. Овакве разлике у резултатима највероватније су последица отежане идентификације инвазије лимфатика, разликама у примењеним критеријумима за процену лимфатичке и васкуларне инвазије и различитом заступљеношћу интрапаренхимских и периферно локализованих m-РТС у анализираним серијама. У нашем истраживању лимфатичка и васкуларна инвазија постојале су чешће код периферно локализованих m-РТС што је у сагласности са

результатима претходних студија [66, 138]. У анализи нисмо користили имунохистохемијске маркере ендотелних ћелија лимфатика и васкуларних простора. Због овакве методологије, у појединим случајевима није могуће искључити погрешну интерпретацију инвазије лимфатика од њених хистолошких имитатора као и разликовање инвазије лимфатика и малих васкуларних простора што представља лимитацију наших резултата [80, 158].

Насупрот морфологији периферно локализованих m-PTC, интрапаренхимски m-PTC су чешће ограничене/експанзивне форме раста, оскудне ИТФ, фоликуларне морфологије и ретко захватају перитуморске лимфатике. За разлику од периферно локализованих m-PTC интрапаренхимски тумори наше серије нису показали васкуларну инвазију. Наведене морфолошке карактеристике интрапаренхимски локализованих m-PTC често одговарају хистолошким карактеристикама NIFTP и представљају параметре повољног и готово бенигног клиничког понашања [12, 13, 68]. Показана инвазија лимфатика код само 17% интрапаренхимске групе тумора упућује да је присуство већег броја туморских фокуса детектованих у 37,8% случајева интрапаренхимских m-PTC последица пре свега мултицентричног раста, односно синхроног појављивања већег броја туморских поља а не интрагландуларног лимфатичког ширења карцинома. Овакав налаз је у складу са резултатима претходне анализе Tallini и сар. који су показали чешће мултицентрични раст интрапаренхимских m-PTC, док је ИГШ било чешће код микрокарцинома субкапсуларне локализације [138].

Поред фоликуларне морфологије у нашим резултатима интрапаренхимски m-PTC су чешће показивали и солидну морфологију. Хистолошком анализом интрапаренхимских m-PTC показано је одсуство или само фокално присуство ИТФ, док се у значајније мањем броју тумора уочавало присуство ПТ, МЦЋ и мањи број ТИЛ.

У анализи присуства и заступљености малих ћелија, као морфолошке карактеристике m-PTC, нисмо утврдили значајну разлику у односу на m-PTC (значај малих ћелија у m-PTC анализиран је у делу дискусије везаном за присуство генетичког *EWSR1* реанжмана у m-PTC).

Присуство високих ћелија нађено је у 16 m-PTC наше серије, од којих ниједан није у потпуности испуњавао критеријуме дефиниције високоћелијске хистолошке варијанте m-PTC. Због малог броја случајева m-PTC са високим и/или онкоцитним или ћелијама богате ружичасте цитоплазме (енг. *Plump pink cells*) нисмо анализирали процентуалну заступљеност ових ћелија у m-PTC различитих локализација. У нашем претходном раду о морфолошким карактеристикама m-PTC код болесника са учињеном тоталном

тиреоидектомијом због Грејвсове болести, сви m-PTC са карактеристикама високих ћелија били су периферно локализовани али како се радило о малом броју анализираних случајева није показана статистичка значајност [159]. Статистички значајније присуство m-PTC високоћелијске морфологије у субкапсуларном делу жлезде показано је и у резултатима мултицентричне студије аутора из Италије што је била још једна потврда морфолошке различитости и последичне агресивности m-PTC периферне локализације [138].

Наши резултати показују већу заступљеност m-PTC код болесника старијих од 55 година, што је у сагласности са резултатима мета-анализа и хируршких серија у којима је дијагностика m-PTC чешћа код болесника старијих од 45 година [18, 24, 74]. За разлику од PTC већих димензија код којих је неоповољни клинички ток везан за популацију са 55 и више година старости [160, 161], агресивније биолошко понашање m-PTC налази се код болесника млађих од 45 година [136, 162]. У нашим резултатима показана је већа учесталост m-PTC са најмањим промером од 5 mm у периферној зони ШЖ год болесника <55 година. Полазећи од показаног утицаја периферне локализације на агресивност m-PTC може се претпоставити да барем део групе m-PTC периферне локализације припада старосној популацији са повећаним ризиком неповољног клиничког понашања m-PTC. Резултати о учесталости m-PTC у хируршким студијама разликују се од резултата аутопсијских студија у којима постоји уједначеност учесталости m-PTC у свим старосним декадама испитаника [24].

Настанак, развој и биолошко понашање m-PTC разликује се од осталих хуманих малигнитета епителног порекла. Већина хуманих малигнитета епителног порекла је ретка у детињству и раној одраслој доби и њихова учесталост расте са годинама. Карциноми ШЖ пре свега PTC не показују овакво биолошко понашање. Већина PTC настаје током детињства и адолесценције и показује пораст учесталости до око 45 године, након чега, осим мањих варијација, показује константну заступљеност [10, 163]. Због ових специфичности, данас је опште прихваћено да већина дијагностикованих m-PTC не представља новонастале туморе већ старе лезије које нису стекле способност прогресије или чак подлежу регресивним променама [14, 163]. Настанак и развој m-PTC је повезан са специфичним биолошким карактеристикама тироцита, растом и развојем ШЖ. Познато је да су тироцити ћелије високог степена диференцијације и ниског пролиферативног потенцијала са ограниченим бројем ћелијских деоба. Једини период повећане пролиферативне активности тироцита је

период развоја ШЖ који се завршава у раном одраслом добу. У периоду раста, ШЖ масе 1 g након рођења достиже регуларну тежину од обично 16 g до максимално 30 g (уз одређене варијације у зависности од присуства јода у исхрани). Због тога што највећи број мутација гена настаје у току деобе ћелија, повећан број митоза тироцита у периоду раста и развоја ШЖ омогућава чешћу појаву генетичких измена по типу тачкастих мутација у млађем животном добу [163]. Значај развоја и прогресије m-PTC код популације са мање од 40 година показан је и на примеру морфолошких промена у m-PTC код болесника са клиничком историјом активног праћења [136]. У овој студији, активно праћење је показало значајније чешћи пораст величине m-PTC и појаву метастаза код болесника млађих од 40 година, док је у случајевима хируршког лечења због прогресије болести у овим m-PTC, патохистолошким анализама показана повећана пролиферативна активност туморских ћелија [136, 164]. Током активног праћења болесника са m-PTC показан је значај присуства богате интра- и перитуморске васкуларизације за прогресију тумора, као и њена редукција у случајевима када m-PTC не показују прогресију или подлежу регресивним променама [165]. Раст, прогресија и опстанак туморских ћелија не зависе само од новостворене васкуларизације већ и од карактеристика микросредине, односно специфичности тзв. периваскуларне нише, условљене хистолошким и анатомском грађом органа [166]. Због свега наведеног можемо претпоставити да преживљавање и евентуална прогресија периферно локализованих m-PTC може бити стимулирана непосредним присуством богате васкуларне (артеријске и венске) мреже, у периферном делу ШЖ и њеној површини [167]. Богата васкуларизација на тај начин формира повољну микро средину са опстанак туморских ћелија и њихову евентуално пролиферацију [166].

Детекција m-PTC у хируршким серијама чешћа је код болесника женског пола, као што је показано и нашим резултатима [18, 24]. Оваква разлика у учесталости m-PTC међу половима не одговара налазима аутопсијских студија по којима постоји уједначена заступљеност m-PTC у оба пола [19, 24]. Разлози веће заступљености постоперативно детектованих m-PTC код болесница женског пола нису у потпуности разјашњени. Углавном, болести ШЖ су генерално чешће код жена. Учесталост УЗ прегледа и оперативног лечења ШЖ због различитих патолошких процеса утиче и на учесталост дијагностике m-PTC у овим стањима. До данас не постоје конзистентни резултати клиничких и епидемиолошких студија о утицају полних хормона на постојеће разлике учесталости PTC међу половима [168]. Сматра се да естроген, прогестерон и њихови

рецептори могу утицати на прогресију тумора ШЖ и на метастатски потенцијал РТС [168, 169], што је делимично показано описаним растом m-РТС током трудноће [170, 171]. Супротно учесталости, мушки пол је у резултатима већег броја студија у позитивној корелацији са агресивнијим клиничким понашањем m-РТС што се углавном манифестује раном појавом локалних метастаза [61, 68, 74]. Сматра се да нормално повећани базални метаболизам код мушкараца има утицај на пролиферативну активност ћелија m-РТС и њихов метастаски потенцијал [73], док је у експерименталном моделу показан утицај тестостерона на прогресију ДТС [172]. Насупрот овом, значај мушког пола на појаву рецидива m-РТС и преживљавање болесника је нејасан. Истовремено, објављени су и резултати у којима се не потврђује значај пола као независног прогностичког параметра рецидива болести [73, 173]. Наши резултати су показали да је периферна локализација m-РТС била чешћа код болесника оба пола, уз значајнију разлику у дистрибуцији m-РТС различитих локализација код болесника мушког пола. Од укупног броја m-РТС са периферном локализацијом код болесника мушког пола у 68,2% случајева m-РТС је детектован у периферном делу ШЖ. Због релативно малог броја болесника мушког пола у нашој серији, будуће студије на већем броју узорака могле би да укажу на значајнију појаву периферно локализованих m-РТС и евентуално утицај ове локализације на агресивност m-РТС код болесника мушког пола.

Дуго проучавана и још увек актуелна анализа удружености ЛТ и РТС је и даље без сагласности о патогенетском моделу који би повезивао ове две примарне болести ШЖ. У мета-анализи из 2017. године која је укључивала резултате 27 студија различитог типа (студије на учињеним тиреоидектомијама, селективним FNA и FNA биопсијама) на укупном броју од 76281 болесника показано је да присуство ЛТ предиспонира настанак РТС [174]. Насупрот значају ЛТ у настанку РТС објављени резултати већег броја истраживања показују да болесници са РТС и ЛТ имају бољу прогнозу, ређу појаву ЕТШ, локалних и удаљених метастаза, а овакви резултати се описују и у серијама које су анализирале повезаност ЛТ и m-РТС [23, 74, 132, 151 175].

У нашој анализи није показан значај присуства ЛТ на локализацију m-РТС. Присуство ЛТ постојало је код 20,2%, док је код 79,8% узорака ШЖ било без ЛТ. Због релативно малог броја болесника осим значајнијег присуства ЛТ у старосној групи испод 55 година,

нисмо утврдили статистички значајан резултат између ЛТ и других клиничко-патолошких карактеристика m-PTC.

Новија истраживања усмерена су и на значај активације тумором индукованих механизма имunosупресије у биолошком току DTC. Међу идентификованим биолошким маркерима посебан значај заузима протеин PD-L1 због чега је један од циљева ове студије био анализа утицаја експресије PD-L1 у m-PTC на појаву метастаза у регионалним ЛЧ. Поред тога анализирана је и удруженост експресије PD-L1 са клиничко-патолошким карактеристикама повезаним са неоповољним клиничким током m-PTC. Према до сада објављеним резултатима експресија PD-L1 молекула у PTC детектована је у распону од 6,1% до 82,5% [119-121]. Велике разлике у добијеним резултатима експресије PD-L1 протеина у PTC тумаче се пре свега применом различите методологије. У већини објављених студија разликовале су се граничне вредности процентуалне заступљености ћелија са експресијом PD-L1 протеина којима су PTC класификовани као PD-L1 позитивни или PD-L1 негативни. На добијене резултате утицао је и начин тумачења имуноекспресије PD-L1. У студијама у којима је као имунореактивност туморских ћелија за PD-L1 тумачена само мембранска експресија протеина, добијен је најмањи број PD-L1 позитивних тумора од 6,1% [176]. Са друге стране резултати истраживања у којима је примењеним методологијама као имунореактивност туморских ћелија за PD-L1 тумачена и као цитоплазматска експресија PD-L1 молекула утврђена је значајнија заступљеност PD-L1 позитивних тумора [177]. Експресија PD-L1 протеина у туморским ћелијама је хетерогена због чега постоје разлике у добијеним резултатима студија које су анализирале само делове тумора применом ткивних микронизова (енг. *tissue microarray*, ТМА) и студија које су присуство PD-L1 протеина анализирале на целом пресеку тумора. Због релативно мале количине ткива и наведене хетерогене експресије PD-L1 резултате студија на ТМА треба разматрати са опрезом због могућности добијања пре свега лажно негативних резултата. И на крају значајан утицај на експресију PD-L1 протеина показала је примена различитих антитела као и интеројсервационе разлике у тумачењу добијених налаза [176].

Због пријављивања различитих резултата постоје проблеми у њиховом тумачењу приликом упоређивања резултата из различитих истраживања. Због свега наведеног, ради могућности упоређивања наших резултата са претходно објављеним, у нашој

студији користили смо исто антитело и систем вредновања резултата експресије PD-L1 које су користили Aghajani и сар. У студији поменутих аутора био је заступљен и значајни број (52,0%) m-PTC [122]. У нашим резултатима, експресија PD-L1 протеина детектована је у 61,6% m-PTC што одговара објављеним резултатима претходно наведене студије у којој је експресија PD-L1 детектована у 66,7% случајева PTC [122]. Наши резултати су у сагласности и са резултатима још једне студије у којој су готово половину испитиваних тумора чинили m-PTC. Резултати ове студије показали су да је цитоплазматска позитивност у ћелијама m-PTC присутна у 62,6% случајева, а мембранска експресија PD-L1 протеина у 52,2% случајева. Ови резултати нису показали значајнију разлику експресије PD-L1 у m-PTC у односу на PTC са величином изнад 10 mm [123].

Присуство дифузне експресије PD-L1 протеина у нашим резултатима било је значајно веће у m-PTC другог клиничког стадијума. Овакав резултат је делимично у сагласности са резултатима мета-анализе из 2018. године [120] према којој је повећана експресија PD-L1 протеина у позитивној корелацији са вишим стадијумом болести али без статистичке значајности. Већина студија које су анализирале значај експресије PD-L1 протеина у PTC су у одређивању стадијума болести примењивале претходно VII издање AJCC/TNM. У нашој студији примењено је VIII издање AJCC/TNM класификације што је могло утицати на разлику у интерпретацији добијених резултата. Само мали број болесника у нашој серији налази се у другом стадијуму болести, док је већина болесника била у првом клиничком стадијуму. У случају примене критеријума одређивања стадијума болести PTC према VII издању AJCC/TNM већи број m-PTC би се класификовао као други или трећи стадијум болести због чега би и наши резултати били другачији.

У нашој анализи, због кратког периода праћења оперисаних болесника и/или недостатка података о пост оперативном клиничком току болести, није анализиран утицај експресије PD-L1 протеина на појаву рецидива и дужину преживљавања. Највећи број до сада објављених резултата указује да је присуство PD-L1 у PTC повезано са повећаним ризиком за појаву рецидива и неповољним клиничким током [119-121]. Исти резултати су пријављени и у истраживањима којима су обухваћени и болесници са дијагностикованим m-PTC [122, 123]. У овим студијама није било могуће изоловано пратити групу болесника са m-PTC и експресијом PD-L1 и њихову повезаност са неповољним клиничким током, односно дужином периода без појаве рецидива. Полазећи од чињенице да је у наведеним истраживањима значајан број

болесника имао дијагностикован m-PTC и да је у анализираним туморима више од половине показивало експресију PD-L1 може се претпоставити да је експресија овог молекула значајна и за појаву рецидива код болесника са m-PTC [122, 123].

Анализирајући утицај експресије PD-L1 протеина у m-PTC на појаву метастаза у ЛЧ, наши резултати су показали статистички значајну удруженост експресије PD-L1 са присуством метастаза у ЛЧ. Овакав резултат није описан у већини претходних студија и у резултатима две мета-анализе [122-124, 132, 176-181]. Утицај експресије PD-L1 на појаву метастаза у PTC Aghajani и сар. показали су у групи PTC која се поред експримирања PD-L1 на туморским ћелијама одликује и присуством ниског броја интратуморских цитотоксичних CD8+ Т лимфоцита [122]. У раду Chowdhury и сар. значај експресије PD-L1 молекула на метастатски потенцијал показан је само у PTC у четвртој стадијуму болести и мембранским типом експресије овог молекула [123]. Bastman и сар. пријавили су да је PD-L1 експресија на туморским и ћелијама имунског система већа код болесника са метастазама у ЛЧ [135]. Такође, Ulisse и сар. су пријавили статистички значајну удруженост високог нивоа iRNA PD-L1 са метастазама у ЛЧ и ЕТШ [182]. Могући разлог позитивне корелације експресије PD-L1 у m-PTC на појаву метастаза у ЛЧ у нашим резултатима може се објаснити значајнијом појавом инфилтративног раста и инвазије лимфатика m-PTC са експресијом PD-L1 молекула. Према до сада доступним подацима у литератури није анализиран утицај експресије PD-L1 протеина у PTC на појаву инвазије лимфатика што се у нашој серији узорака показало статистички значајним. За разлику од инвазије лимфатика, утицај експресије PD-L1 на инвазивност PTC документован је у неколико студија које су анализирале дијагностички значај PD-L1 протеина у разликовању NIFTP од инвазивне фоликуларне варијанте PTC [179]. Насупрот инвазији лимфатика наши резултати нису показали значајну удруженост експресије PD-L1 протеина са васкуларном инвазијом, ЕТШ и МТФ/ИГШ микрокарцинома. Објављени резултати из студије Shi и сар. указују на позитивну корелацију експресије PD-L1 и ЕТШ PTC, иако већина других студија није показала ову повезаност [120, 132, 178]. Повезаност МТФ/ИГШ и експресије PD-L1 није разјашњена у туморима ШЖ порекла фоликуларних ћелија [120]. Shi и сар. показали су позитивну корелацију експресије PD-L1 и МТФ/ИГШ у PTC [180] али она није нађена у истраживањима Bai и сар. из 2017 и 2018 године [132, 178]. Недостатак повезаности ЕТШ и МТФ/ИГШ у m-PTC наше серије може се тумачити и малим бројем тумора са ЕТШ и са друге стране заступљеношћу МТФ/ИГШ у више од 80% случајева.

Према до сада доступним сазнањима хронични ЛТ представља погодну имунску/инфламаторну микросредину која индукује експресију PD-L1 не само на туморским већ и ћелијама имунског система. Овакав налаз је потврђен и нашим резултатима као и резултатима претходно публикованих студија које се анализирале повезаност ЛТ и експресије PD-L1 у РТС [121-124, 132, 177, 179].

Наши резултати показују и да је експресија PD-L1 значајније присутна код периферно локализованих m-РТС у односу на интрапаренхимску локализацију. Овакав налаз подржава тезу да на микросредину тумора значајно утиче и локализација тумора. У периферно локализованим m-РТС постоји већи број PD-L1 позитивних ТИЛ који могу утицати на антитуморски имунски одговор активирањем сигналне путање PD-1/PD-L1 [183]. Такође, група PD-L1 позитивних периферних m-РТС има већи број МЦЋ чији је протуморогени ефекат већ показан [133, 141, 142]. Разликама у микросредини тумора доприноси и присуство назначене ИТФ. Присуство назначене ИТФ повезано је са већим димензијама m-РТС, инвазивним растом и присуством метастаза у ЛЧ [155, 184]. Овакви налази сугеришу активну улогу ИТФ у прогресији m-РТС. Карциномима придружени фибробласти (енг. *cancer-associated fibroblasts*; CAF) као једне од најзначајних ћелија туморске микросредине поседују различите имуномодулаторне функције. На основу актуелног консензуса се сматра да CAF имају предоминатно имуносупресивни ефекат који испољавају тако што „утишавају“ антитуморско деловање Т ћелијског имунског одговора [185]. Поред тога, Inoue и сар. су показали значај потенцијала CAF у индукцији експресије PD-L1 у ћелијама аденокарцинома плућа [186] што би мога бити претпостављени механизам и у m-РТС. Са друге стране, способност туморских ћелија m-РТС да експримирају PD-L1 омогућава њихово преживљавање и дуготрајну еволуцију. Дуготрајном еволуцијом тумора обезбеђено је неопходно време за развој ИТФ и ПТ чешће присутних у периферним и PD-L1 позитивним m-РТС.

Већа заступљеност морфолошких карактеристика m-РТС удружених са биолошком агресивношћу код периферно локализованих тумора који експримирају PD-L1 упућује на могућност издавајања ове групе тумора као туморе са потенцијално неоповљним клиничким током [187].

Морфолошке карактеристике PD-L1 позитивних m-РТС које смо описали у нашим резултатима одговарају претходно описаним морфолошким особинама m-РТС са мутацијом V600E *BRAF* гена и класичној варијанти РТС [80, 81, 138]. Због тога што је PD-L1 експресија у РТС удружена са мутацијом V600E *BRAF* гена [120, 121, 123, 178]

може се очекивати да је ова удруженост присутна и у m-PTC. Будуће студије којима би се анализирале удружености мутације V600E *BRAF* гена и имуносупресивне микросредине m-PTC могу дати одговор о значају имуноекспресије PD-L1 у туморским ћелијама m-PTC на клинички ток болести.

У даљем раду истраживали смо повезаност генетичког реаранжмана *EWSR1* са клиничко-патолошким карактеристикама m-PTC и анализирали његов потенцијални значај као биомаркера агресивности тумора. Методом FISH, било је могуће детектовати две врсте генетичких мутација, монозомију *EWSR1* гена (делеције) и полизомију *EWSR1* гена (амплификација), као и хромозомске реаранжмане по типу транслокације. Анализа је обухватала детекцију транслокације (11;22) која за последицу има фузију гена *EWSR1* са геном *FLII*. Поред ове транслокације било је могуће детектовати и друге транслокације у којима учествује регион хромозома 22 у коме је лоциран ген *EWSR1* са непознатим генима партнерима.

Наши резултати показали су да је регион хромозома 22 у коме је лоциран ген *EWSR1* изузетно подложен изменама не само по типу балансираних реципрочних транслокација, већ и мутација по типу монозомија, док је амплификација гена била присутна само у једном случају. Слично резултатима студије Oliveira и сар., и наши резултати су показали да су реаранжмани *EWSR1* гена једна од најчешћих генетичких измена у PTC [106]. Значај ових молекуларних измена није јасан али се према до сада добијеним резултатима из наше и претходне студије чини да немају посебан клинички значај [106]. Клинички значај није потврђен пре свега услед недостатка повезаности присуства измена у *EWSR1* гену са присуством удаљених и локалних метастаза у ЛЧ. Овакав налаз високе заступљености реаранжмана *EWSR1* гена у m-PTC је у сагласности са постојећим сазнањима да не постоји појединачна генетичка измена која самостално може предвидети агресивност и метастатски потенцијал m-PTC [14, 77].

Рearанжмани гена *EWSR1* представљају једну од најчешћих генетичких изменама у мезенхимним неоплазмама [96, 97]. Ова генетичка измена је у немезенхимним туморима ретка, али се последњих година повећава број пријављених епителних тумора са реаранжманима гена *EWSR1* [98-106]. У нашој анализи, реаранжмани гена *EWSR1* постојали су у свим m-PTC са класичном морфологијом. Насупрот m-PTC са класичном морфологијом, реаранжмани *EWSR1* су значајније мање били заступљени у туморима фоликуларне грађе, а нису детектовани у микрокарциномима солидне морфологије. Овакав налаз подржава значај и утицај реаранжмана *EWSR1* на појаву

класичног – папиларног фенотипа тумора. Претходним истраживањима показано је да су класична морфолошка форма m-PTC и класична варијанта PTC повезане са присуством мутације V600E *BRAF* гена и *RET-PTC* реаранжманима [80, 81, 89]. Због тога што у овој студији нисмо анализирали друге генетичке измене и њихову повезаност са присуством реаранжмана гена *EWSR1*, не можемо искључити могућност да различите комбинације генетичких измена утичу на појаву класичног фенотипа m-PTC.

Изузев класичног фенотипа m-PTC, присуство *EWSR1* реаранжмана није показало повезаност са стандарним клиничко-патолошким карактеристикама тумора, укључујући и локализацију m-PTC. Овакав налаз се може објаснити пре свега високом заступљеношћу *EWSR1* реаранжмана у узорцима m-PTC наше серије, који је детектован у преко 90% анализираних тумора.

Поред *EWSR1* реаранжмана, ни висока заступљеност монозомије гена *EWSR1* у ћелијама m-PTC, није показала значајну повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама тумора. Овакав резултат може сугерисати да губитак гена *EWSR1* у неопластичним ћелијама представља секундарну молекуларно-генетичку измену која настаје у току еволуције и старења тумора, вероватно као последица нестабилности генома. Поред тога у m-PTC који су показивали присуство метастаза у ЛЧ и инвазију лимфатика није утврђена *EWSR1* монозомија. Уколико се узме у обзир да су сви случајеви m-PTC без детектоване *EWSR1* монозомије показивали високу заступљеност фузије *EWSR1* са неопознатим генима пратнерима, може се претпоставити да одређени типови хромозомских реаранжмана могу упућивати на биолошку агресивност m-PTC. Због тога будуће студије којима би се идентификовали непознати гени који учествују у фузији са геном *EWSR1*, могу открити специфичне транслокације повезане са метастатским потенцијалом m-PTC.

Удруженост *EWSR1* реаранжмана, а пре свега транслокације *EWSR1-FLII* на појаву ситноћелијског фенотипа у мезенхимним неоплазмама је одавно препознат [96]. Транслокација *EWSR1-FLII* присутна је и у примарном ситноћелијском тумору ШЖ - SEFTE који показује удруженост са PTC [106, 107]. Због тога смо у нашем раду анализирали повезаност *EWSR1* реаранжмана и транслокације *EWSR1-FLII* са присуством „малих ћелија“ у m-PTC. Наши резултати су показали значајну позитивну корелацију између присуства „малих“ ћелија и процентуалне заступљености реаранжмана *EWSR1* и транслокације *EWSR1-FLII*. Овакав резултат је у сагласности и са

результатима које смо добиле након мерења величине нуклеуса туморских ћелија са и без присуства анализираних генетичких измена. Добијени резултати су показали да су ћелије са реаранжманом *EWSR1* и посебно са транслокацијом *EWSR1-FLI1* значајније мање од ћелија m-PTC без реаранжмана. Овакав налаз је у сагласности са тезом да транслокација *EWSR1-FLI1* има утицај на стицање ситноћелијског фенотипа не само у мезенхимним туморима већ и у туморима ШЖ као што су CEFTE и m-PTC [106, 107]. Ситноћелијски фенотип може бити присутан у различитим примарним и секундарним малигнитетима ШЖ као што су медуларни карцином ШЖ, PDTC и лимфоми [3, 188]. Уопштено, означавање примарних малигнитета ШЖ као ситноћелијских карцинома је повезано са неповољним клиничким током [189]. Ситноћелијска варијанта медуларног карцинома показује агресивније биолошко понашање у односу на конвенционални тип медуларног карцинома [3]. У случајевима PDTC, присуство малих ћелија показује различити значај. У групи онкоцитних PDTC присуство малих ћелија је повезано са агресивнијим биолошким понашањем и неповољном прогнозом, док у конвенционалној форми PDTC присуство малих ћелија не утиче на прогнозу болести [190].

Најзначајнију морфолошку карактеристику PTC и m-PTC чине карактеристичне промене на нуклеусима без обзира на величину и изглед ћелије [3]. Присуство „малих“ ћелија у PTC до сада није описано у литератури. У неколико студија које анализирају морфологију PTC описано је присуство ћелија различите морфологије. Према нашој методологији барем део ћелија које смо дефинисали као „мале“ одговарају претходно описаним необичним ћелијским формама PTC, као што су ћелије са „тамним“ нуклеусима [191], „успаване“ ћелије [192] или ћелије са некомплетно израженим нуклеарним карактеристикама PTC [60, 193].

Значај претходно описаних необичних ћелијских форми у PTC је нејасан. Због одсуства пролиферативне активности претпоставља се да се ради о ћелијама које су искључене из регуларног ћелијског циклуса [192]. Према резултатима Bell и сар., присуство ћелија са „тамним“ нуклеусима чешће је у малигним туморима ШЖ него у бенигним лезијама, због чега су аутори закључили да налаз ових ћелија у нодусима ШЖ може бити користан у разликовању малигнух од бенигнух нодуса, а нарочито у дијагностици тумора суспектних на фоликуларну варијанту PTC [191].

У нашој анализи, m-PTC са „малим“ ћелијама су чешће показивали инвазивни раст, лимфатичку инвазију и назначену ИТФ. Овакав налаз упућује на могућу улогу „малих“ ћелија у појави агресивност m-PTC као што је претходно показано за инвазију лимфатика и ИТФ [184, 187]. Развој ИТФ је дуготрајан процес за који је неопходно

време. Због тога што већина m-PTC представља старе промене, удруженост ИТФ и присуства малих ћелија може сугеристи да је развој ситноћелијског фенотипа последица старења m-PTC. Будућа истраживања малих ћелија у серијама са већим бројем m-PTC и адекватним праћењем болесника уз компарација резултата о значају „малих“ ћелија у PTC, може бити корисно у процени њиховог клиничког значаја.

У мезенхимним туморима присуство транслокације *EWSR1-FLII* удружено је са агресивним клиничким током [96, 97], за разлику од добијених резултата и показаног значаја ове транслокације у m-PTC наше студије. Овакав резултат може се објаснити чињеницом да је у m-PTC транслокација *EWSR1-FLII* присутна у малом броју ћелија које немају довољно потенцијала да утичу на биолошко понашање тумора и последично неповољан клинички ток. За разлику од m-PTC, транслокација *EWSR1-FLII* налази се у свим ћелијама SEFTE, ситноћелијски фенотип је комплетно развијен, а према досадашњим сазнањима клинички ток је повољан [106-108]. Насупрот овим резултатима, ретки случајеви неуроендокриних тумора панкреаса са детектованом транслокацијом *EWSR1-FLII* нису показали ситноћелијски фенотип и друге клиничко патолошке карактеристике ESFT [194]. Због свега наведеног може се закључити да специфични фенотип тумора не зависи само од присуства транслокације *EWSR1-FLII*. Велике разлике у фенотипу тумора који настају из различитих типова ћелија са идентичним генским изменама указују да постојање одређеног типа транслокације у нашем случају *EWSR1-FLII* може индуковати специфичан фенотип само у одговарајућем ћелијском контексту. Такође, додатне епигенетичке и генетичке измене које могу утицати на протеинску активност *EWSR1-FLII* су неопходне јер је континуирана експресија гена *EWSR1-FLII* предуслов развоја онкогеног фенотипа ћелија ESFT, стицање специфичног фенотипа тумора и клиничког понашања [96, 97, 195, 196].

ЗАКЉУЧЦИ

1. Имунохистохемијска експресија PD-L1 протеина и периферна локализација m-PTC представљају предиктивне маркере који указују на чешћу појаву метастаза у регионалним лимфним чворовима оболелих.
2. Рearанжмани *EWSR1* гена једна су од најчешћих генетичких измена у m-PTC јер се детектују у више од 90% тумора.
3. Присуство генетичког реаранжмана *EWSR1* у m-PTC у позитивној је корелацији са класичном морфолошком формом и присуством ситноћелијског фенотипа, али не и са локализацијом тумора и појавом метастаза у регионалним лимфним чворовима врата.
4. Експресија PD-L1 протеина детектује се код више од 61% болесника са m-PTC и показује високу статистичку значајност у односу на појаву метастаза у регионалним лимфним чворовима врата.
5. Анализирана кроз локализацију тумора, експресија PD-L1 протеина статистички је значајно чешћа у периферним/субкапсуларним m-PTC у односу на интрапаренхимске m-PTC.
6. Периферна локализација m-PTC представља независан клиничко-патолошки параметар повезан са чешћим метастазирањем m-PTC у ЛЧ врата.
7. Периферно локализовани m-PTC морфолошки су различити од интрапаренхимских m-PTC због статистички значајне заступљености параметара као што су: класична морфолошка форма, инфилтративни раст, инвазија лимфатика и крвних судова, микроскопско и макроскопско ЕТШ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. CA Cancer J Clin 2020;70:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
2. Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019;48(1):23-35. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.10.002>.
3. Lloyd RV, Osamura RY, Klöpel G, Rosai J (eds). World Health Organization Classification of Tumours of Endocrine Organs. IARC: Lyon, 2017.
4. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of endocrine organs. IARC, Lyon; 2004.
5. Hedinger C, Williams E D, Sobin L H 1988 Histological typing of thyroid tumors. WHO international histological classification of tumors, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin.
6. Harach HR, Franssila KO, Wasenius VM. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study. *Cancer.* 1985;56(3):531-538. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19850801\)56:3<531::aid-cnrcr2820560321>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19850801)56:3<531::aid-cnrcr2820560321>3.0.co;2-3).
7. Hazard JB. Small papillary carcinoma of the thyroid. A study with special reference to so-called nonencapsulated sclerosing tumor. *Lab Invest.* 1960; 9:86-97.
8. Klinck GH, Winship T. Occult sclerosing carcinoma of the thyroid. *Cancer* 1955; 8: 701–706. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1955\)8:4<701::AID-CNCR2820080412>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1955)8:4<701::AID-CNCR2820080412>3.0.CO;2-V).
9. Neuhold N, Kaiser H, Kaserer K. Latent carcinoma of the thyroid in Austria: A systematic autopsy study. *Endocr Pathol* 12, 23–31 (2001). <https://doi.org/10.1385/EP:12:1:23>.
10. Rosai J, LiVolsi VA, Sobrinho-Simoes M, Williams ED. Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. *Int J Surg Pathol.* 2003 ;11(4):249-251. <https://doi.org/10.1177/106689690301100401>.
11. Kakudo K, Bai Y, Liu Z, Li Y, Ito Y, Ozaki T. Classification of thyroid follicular cell tumors: with special reference to borderline lesions. *Endocr J.* 2012;59(1):1-12. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej11-0184>.
12. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol.* 2016 1;2(8):1023-1029. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0386>.
13. Shafique K, LiVolsi VA, Montone K, Baloch ZW. Papillary Thyroid Microcarcinoma: Reclassification to Non-Invasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear

- Features (NIFTP): a Retrospective Clinicopathologic Study. *Endocr Pathol.* 2018;29(4):339-345. <https://doi.org/10.1007/s12022-018-9546-3>.
14. Soares P, Celestino R, Gaspar da Rocha A, Sobrinho-Simões M. Papillary thyroid microcarcinoma: how to diagnose and manage this epidemic? *Int J Surg Pathol.* 2014;22(2):113-9. <https://doi.org/10.1177/1066896913517394>.
 15. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140:317–22. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2014.1>.
 16. Wiltshire JJ, Drake TM, Uttley L, Balasubramanian SP. Systematic Review of Trends in the Incidence Rates of Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(11):1541-1552. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0100>.
 17. Ahn HS, Kim HJ, Welch HG. Korea’s thyroid-cancer “epidemic”—screening and overdiagnosis. *N Engl J Med* 2014;371(19):1765–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1409841>.
 18. Dideban S, Abdollahi A, Meysamie A, Sedghi S, Shahriari M. Thyroid Papillary Microcarcinoma: Etiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, Follow-up, Histopathology and Prognosis. *Iran J Pathol.* 2016 Winter;11(1):1-19.
 19. Lee YS, Lim H, Chang HS, Park CS. Papillary thyroid microcarcinomas are different from latent papillary thyroid carcinomas at autopsy. *J Korean Med Sci.* 2014;29(5):676-679. <https://doi.org/10.3346/jkms.2014.29.5.676>.
 20. Fink A, Tomlinson G, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasms. *Mod Pathol.* 1996;9(8):816-820.
 21. Sakorafas GH, Stafyla V, Kolettis T, Tolumis G, Kassaras G, Peros G. Microscopic papillary thyroid cancer as an incidental finding in patients treated surgically for presumably benign thyroid disease. *J Postgrad Med.* 2007;53(1):23-26. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.30323>.
 22. Slijepcevic N, Zivaljevic V, Marinkovic J, Sipetic S, Diklic A, Paunovic I. Retrospective evaluation of the incidental finding of 403 papillary thyroid microcarcinomas in 2466 patients undergoing thyroid surgery for presumed benign thyroid disease. *BMC Cancer.* 2015;15:330. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1352-4>.
 23. Noguchi S, Yamashita H, Uchino S, Watanabe S. Papillary microcarcinoma. *World J Surg.* 2008;32(5):747-753. <https://doi.org/10.1007/s00268-007-9453-0>.
 24. Roti E, degli Uberti EC, Bondanelli M, Braverman LE. Thyroid papillary microcarcinoma: a descriptive and meta-analysis study. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(6):659-673. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0896>.

25. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol.* 2013;2013:965212. <https://doi.org/10.1155/2013/96521>.
26. Brenner AV, Tronko MD, Hatch M, Bogdanova TI, Oliynik VA, Lubin JH et al. I-131 dose response for incident thyroid cancers in Ukraine related to the Chernobyl accident. *Environ Health Perspect.* 2011;119(7):933-9. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002674>.
27. Yamamoto H, Hayashi K, Scherb H. Association between the detection rate of thyroid cancer and the external radiation dose-rate after the nuclear power plant accidents in Fukushima, Japan. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(37):e17165. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017165>.
28. Zhao ZG, Guo XG, Ba CX, Wang W, Yang YY, Wang J et al. Overweight, obesity and thyroid cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *J Int Med Res.* 2012;40(6):2041-50. <https://doi.org/10.1177/030006051204000601>.
29. Schmid D, Behrens G, Jochem C, Keimling M, Leitzmann M. Physical activity, diabetes, and risk of thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(12):945-958. <https://doi.org/10.1007/s10654-013-9865-0>.
30. Dagdelen S, Cinar N, Erbas T. Increased thyroid cancer risk in acromegaly. *Pituitary.* 2014;17(4):299-306. <https://doi.org/10.1007/s11102-013-0501-5>.
31. Hoffman K, Lorenzo A, Butt CM, Hammel SC, Henderson BB, Roman SA et al. Exposure to flame retardant chemicals and occurrence and severity of papillary thyroid cancer: A case-control study. *Environ Int.* 2017;107:235-242. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.021>.
32. Preston-Martin S, Franceschi S, Ron E, Negri E. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned?. *Cancer Causes Control.* 2003;14(8):787-789. <https://doi.org/10.1023/a:1026312203045>.
33. Lai X, Xia Y, Zhang B, Li J, Jiang Y. A meta-analysis of Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma risk. *Oncotarget.* 2017; 8(37):62414-62424. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18620>.
34. Chen YK, Lin CL, Chang YJ, Cheng FT, Peng CL, Sung FC, et al. Cancer risk in patients with Graves' disease: a nationwide cohort study. *Thyroid.* 2013; 23(7):879-84. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0568>.
35. Kitahara CM, Linet MS, Beane Freeman LE, Check DP, Church TR, Park Y et al. Cigarette smoking, alcohol intake, and thyroid cancer risk: a pooled analysis of five

prospective studies in the United States. *Cancer Causes Control*. 2012 ;23(10):1615-24. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-0039-2>.

36. Russ G, Leboulleux S, Leenhardt L, Hegedüs L. Thyroid incidentalomas: epidemiology, risk stratification with ultrasound and workup. *Eur Thyroid J* 2014; 3:154–163. <https://doi.org/10.1159/000365289>.

37. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review [published correction appears in *JAMA*. 2018; 319(15):1622]. *JAMA*. 2018;319(9):914-924. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.0898>.

38. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016; 26:1–133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.

39. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Kampas L, Valeri RM, Kyriakoulis D et al. Papillary thyroid microcarcinoma presenting as lymph node metastasis-adiagnostic challenge: case report and systematic review of literature. *Hormones (Athens)*. 2012;11(4):419-427. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1373>.

40. Xu YH, Song HJ, Qiu ZL, Luo QY. Brain metastases with exceptional features from papillary thyroid carcinoma: report of three cases. *Hell J Nucl Med*. 2011;14(1):56-59.

41. Jouhar FS, Quadri A, Afandi B, Al Rawi S. Occult papillary thyroid carcinoma metastasis to the sacrum and the skull: an unusual presentation. *Case Rep Med*. 2014;2014:516549. <https://doi.org/10.1155/2014/516549>.

42. Chen W, Lei J, You J, Lei Y, Li Z, Gong R et al. Predictive factors and prognosis for recurrent laryngeal nerve invasion in papillary thyroid carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2017; 11;10:4485-4491. <https://doi.org/10.2147/OTT.S142799>.

43. Wada N, Duh QY, Sugino K, Iwasaki H, Kameyama K, Mimura T et al. Lymph node metastasis from 259 papillary thyroid microcarcinomas: frequency, pattern of occurrence and recurrence, and optimal strategy for neck dissection. *Ann Surg*. 2003;237(3):399-407. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000055273.58908.19>.

44. Lyu YJ, Shen F, Yan Y, Situ MZ, Wu WZ, Jiang GQ et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules <10 mm in the maximum diameter: does size matter? *Cancer Manag Res*. 2019;11:1231-1236. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S189358>.

45. Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association guidelines for ultrasound malignancy risk stratification of thyroid nodules in

- adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J.* 2017;6(5): 225-237. <https://doi.org/10.1159/000478927>.
46. Takami H, Ito Y, Okamoto T, Onoda N, Noguchi H, Yoshida A. Revisiting the guidelines issued by the Japanese Society of Thyroid Surgeons and Japan Association of Endocrine Surgeons: a gradual move towards consensus between Japanese and western practice in the management of thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2014;38(8):2002-2010. <https://doi.org/10.1007/s00268-014-2498-y>.
47. Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules-2016 update. *Endocr Pract.* 2016 ;22(5):622-39. <https://doi.org/10.4158/EP161208.GL>.
48. Haymart MR, Esfandiari NH, Stang MT, Sosa JA. Controversies in the Management of Low-Risk Differentiated Thyroid Cancer. *Endocr Rev.* 2017;38(4):351-378. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00067>.
49. Lee YD. Surgical Strategy for Papillary Thyroid Microcarcinoma. *J Korean Thyroid Assoc.* 2014; 7(1): 48-56. <http://dx.doi.org/10.11106/jkta.2014.7.1.48>.
50. Ito Y, Uruno T, Nakano K, et al. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid.* 2003;13(4):381-387. <https://doi.org/10.1089/105072503321669875>.
51. Xue S, Wang P, Liu J, Chen G. Total thyroidectomy may be more reasonable as initial surgery in unilateral multifocal papillary thyroid microcarcinoma: a single-center experience. *World Journal of Surgical Oncology.* 2017; 15:62. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1130-7>.
52. Kaliszewski K, Diakowska D, Wojtczak B, Forkasiewicz Z, Pupka D, Nowak Ł et al. Which papillary thyroid microcarcinoma should be treated as "true cancer" and which as "precancer"? *World J Surg Oncol.* 2019;17(1):91. <https://doi.org/10.1186/s12957-019-1638-0>.
53. Amin MB, Edge S, Greene FL, Schilsky RL, Byrd DR, Gaspar LE, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, eds. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG; 2016.
54. Kim K, Kim JH, Park IS, Rho YS, Kwon GH, Lee DJ. The Updated AJCC/TNM Staging System for Papillary Thyroid Cancer (8th Edition): From the Perspective of Genomic Analysis. *World J Surg.* 2018;42(11):3624-3631. <https://doi.org/10.1007/s00268-018-4662-2>.

55. Niemeier LA, Kuffner Akatsu H, Song C, Carty SE, Hodak SP, Yip L, et al.k. A combined molecular-pathologic score improves risk stratification of thyroid papillary microcarcinoma. *Cancer*. 2012; 118: 2069–2077;4:2185. <https://doi.org/10.1002/cncr.26425>.
56. Bradley NL, Wiseman SM. Papillary thyroid microcarcinoma: the significance of high risk features. *BMC Cancer*. 2017; 16;17(1):142. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3120-0>.
57. Sak SD. Variants of Papillary Thyroid Carcinoma: Multiple Faces of a Familiar Tumor. *Turk Patoloji Derg*. 2015;31 Suppl 1:34-47. <https://doi.org/10.5146/tjpath.2015.01313>.
58. Baloch ZW, LiVolsi VA. Special types of thyroid carcinoma. *Histopathology*. 2018;72(1):40-52. <https://doi.org/10.1111/his.13348>.
59. Kuo EJ, Goffredo P, Sosa JA, Roman SA. Aggressive variants of papillary thyroid microcarcinoma are associated with extrathyroidal spread and lymph-nodemetastases: a population-level analysis. *Thyroid*. 2013; 23(10):1305-11. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0563>.
60. Albores-Saavedra J, Wu J. The many faces and mimics of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol*. 2006 Spring;17(1):1-18. <https://doi.org/10.1385/ep:17:1:1>.
61. Wu X, Li B, Zheng C, He X. Risk factors for central lymph node metastases in patients with papillary thyroid microcarcinoma. *Endocr Pract*. 2018;24(12):1057-1062. <https://doi.org/10.4158/EP-2018-0305>.
62. Liu C, Wang S, Zeng W, Guo Y, Liu Z, Huang T. Total tumour diameter is superior to unifocal diameter as a predictor of papillary thyroid microcarcinoma prognosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1846. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02165-6>.
63. Marzouki HZ, Aldajani A, Merdad M, Saber W, Amer I. Papillary Microcarcinoma of Sublingual Thyroid Gland: A Case Report. *Cureus*. 2020 29;12(1):e6810. <https://doi.org/10.7759/cureus.6810>.
64. Wei S, LiVolsi VA, Baloch ZW. Pathology of thyroglossal duct: an institutional experience. *Endocr Pathol*. 2015;26(1):75-79. <https://doi.org/10.1007/s12022-015-9354-y>.
65. Pineyro MM, Pereda J, Schou P, de Los Santos K, de la Peña S, Caserta B et al. Papillary Thyroid Microcarcinoma Arising Within a Mature Ovarian Teratoma: Case Report and Review of the Literature. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2017 6;10:1179551417712521. <https://doi.org/1177/1179551417712521>.
66. Ciobanu Apostol D, Giușcă SE, Căruntu ID, Lozneanu L, Andriescu EC, Moscalu M. Relationships between clinicopathological prognostic factors in papillary thyroid microcarcinoma: a refined analysis based on 428 cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(8):8944-8956.

67. Katoh R, Sasaki J, Kurihara H, Suzuki K, Iida Y, Kawaoi A. Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. *Cancer*. 1992;70(6):1585-1590. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920915\)70:6<1585::aid-cnrc2820700623>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920915)70:6<1585::aid-cnrc2820700623>3.0.co;2-z).
68. Zhi J, Zhao J, Gao M, Pan Y, Wu J, Li Y et al. Impact of major different variants of papillary thyroid microcarcinoma on the clinicopathological characteristics: the study of 1041 cases. *Int J Clin Oncol*. 2018;23(1):59-65. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1170-6>.
69. Kuo EJ, Goffredo P, Sosa JA, Roman SA. Aggressive variants of papillary thyroid microcarcinoma are associated with extrathyroidal spread and lymph-nodemetastases: a population-level analysis. *Thyroid*. 2013; 23(10):1305-11. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0563>.
70. Chung YJ, Lee JS, Park SY, Park HJ, Cho BY, Park SJ, Lee SY, Kang KH, Ryu HS. Histomorphological factors in the risk prediction of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Histopathology*. 2013;62(4):578-88. <https://doi.org/10.1111/his.12025>.
71. Chung MK, Kim JH, Ko YH, Son YI. Correlation of lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor with nodal metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. *Head Neck*. 2012;34(6):846-51. <https://doi.org/10.1002/hed.21822>.
72. Youngwirth LM, Adam MA, Scheri RP, Roman SA, Sosa JA. Extrathyroidal Extension Is Associated with Compromised Survival in Patients with Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2017;27(5):626-631. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0132>.
73. Xu Y, Xu L, Wang J. Clinical predictors of lymph node metastasis and survival rate in papillary thyroid microcarcinoma: analysis of 3607 patients at a single institution. *J Surg Res*. 2018;221:128-134. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.08.007>.
74. Kim SK, Park I, Woo JW, Lee JH, Choe JH, Kim JH et al. Predictive Factors for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(9):2866-73. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5225-0>.
75. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(3):184-199. <https://doi.org/10.1038/nrc3431>.
76. Brajušković G. Metode molekularne biologije. In: Brajušković G. Molekularna biologija 2. Beograd: Savremena administracija. 2012; p.41-74.
77. Rodrigues AC, Penna G, Rodrigues E, Castro P, Sobrinho-Simões M, Soares P. The Genetics of Papillary Microcarcinomas of the Thyroid: Diagnostic and Prognostic Implications. *Curr Genomics*. 2017 ;18(3):244-254. <https://doi.org/10.2174/1389202918666170105094459>.

78. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol.* 2008;21 Suppl 2(Suppl 2):S37-S43. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.10>.
79. Ma YJ, Deng XL, Li HQ. BRAF(V⁶⁰⁰E) mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid microcarcinoma: A meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2015;35(4):591-599. <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1476-4>.
80. Tallini G, de Biase D, Durante C, Acquaviva G, Bisceglia M, Bruno R et al. BRAF V600E and risk stratification of thyroid microcarcinoma: a multicenter pathological and clinical study. *Mod Pathol.* 2015;28(10):1343-1359. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.92>.
81. Virk RK, Van Dyke AL, Finkelstein A, Prasad A, Gibson J, Hui P et al. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a genotype-phenotype correlation. *Mod Pathol.* 2013;26(1):62-70. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.152>.
82. Liu C, Chen T, Liu Z. Associations between BRAFV600E and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology.* 2016;14(1):241. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0979-1>.
83. Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(10):3943-9. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0607>.
84. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014; 23;159(3):676-690. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>.
85. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist.* 2013;18(8):926-32. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0072>.
86. Fakhruddin N, Jabbour M, Novy M, Tamim H, Bahmad H, Farhat F et al. BRAF and NRAS Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma and Concordance in BRAF Mutations Between Primary and Corresponding Lymph Node Metastases. *Sci Rep.* 2017 5;7(1):4666. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04948-3>.
87. Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature.* 1987; 9-15;328(6126):170-2. <https://doi.org/10.1038/328170a0>.

88. Romei C, Elisei R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;11;3:54. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00054>.
89. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simões M (1998) Sporadic re-arranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 185(1):71-8. [https://doi.org/10.1002/\(SICD\)1096-9896\(199805\)185:1<71::AID-PATH42>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICD)1096-9896(199805)185:1<71::AID-PATH42>3.0.CO;2-S).
90. Song Y, Fu L, Li H, Qui X. Evaluation of MEDAG gene expression in papillary thyroid microcarcinoma: associations with histological features, regional lymph node metastasis and prognosis. *Sci Rep*. 2019; 9, 5800. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41701-4>.
91. Perera D, Ghossein R, Camacho N, et al. Genomic and Transcriptomic Characterization of Papillary Microcarcinomas With Lateral Neck Lymph Node Metastases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(10):4889-4899. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00431>.
92. Castro B, Rodrigues E. Molecular biology of papillary thyroid microcarcinomas: What is new?. *Revista portuguesa de endocrinologia, diabetes e metabolismo*. 2016; 11(2):287-295. <https://doi.org/10.1016/j.rpedm.2016.04.003>.
93. de Biase D, Gandolfi G, Ragazzi M, Eszlinger M, Sancisi V, Gugnoni M et al. TERT Promoter Mutations in Papillary Thyroid Microcarcinomas. *Thyroid*. 2015; 25(9):1013-9. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0101>.
94. Lee J, Nguyen PT, Shim HS, Hyeon SJ, Im H, Choi MH et al. EWSR1, a multifunctional protein, regulates cellular function and aging via genetic and epigenetic pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(7):1938-1945. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.042>.
95. Paronetto MP. Ewing Sarcoma Protein: A Key Player in Human Cancer. *International Journal of Cell Biology*. 2013, Article ID 642853, 12 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/642853>.
96. Thway K, Fisher C. Mesenchymal Tumors with EWSR1 Gene Rearrangements. *Surg Pathol Clin*. 2019;12(1):165-190. <https://doi.org/10.1016/j.path.2018.10.007>.
97. Romeo S, Dei Tos AP. Soft tissue tumors associated with EWSR1 translocation. *Virchows Arch*. 2010;456(2):219-34. <https://doi.org/10.1007/s00428-009-0854-3>.
98. Skálová A, Weinreb I, Hyrcza M, Simpson RH, Laco J, Agaimy A, Vazmitel M et al. Clear cell myoepithelial carcinoma of salivary glands showing EWSR1 rearrangement: molecular analysis of 94 salivary gland carcinomas with prominent clear cell component. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(3):338-48. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000364>.

99. Ni H, Zhao PY, Wang XT, Xia QY, Wang X, Wu N, Shi SS et al. EWSR1 rearrangement is present in a subset of myoepithelial tumors of salivary glands with variable morphology and does not correlate with clinical behavior. *Ann Diagn Pathol.* 2017; 28:19-23. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2017.02.007>.
100. Antonescu CR, Katabi N, Zhang L, Sung YS, Seethala RR, Jordan RC et al. EWSR1-ATF1 fusion is a novel and consistent finding in hyalinizing clear-cell carcinoma of salivary gland. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50(7):559–70. <https://doi.org/10.1002/gcc.20881>.
101. Möller E, Stenman G, Mandahl N, Hamberg H, Mölne L, van den Oord JJ et al. POU5F1, encoding a key regulator of stem cell pluripotency, is fused to EWSR1 in hidradenoma of the skin and mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *J Pathol.* 2008;215(1):78-86. <https://doi.org/10.1002/path.2327>.
102. Santana T, de Andrade FL, de Sousa Melo MC, da Rocha GBL, Trierweiler M. Clear Cell Odontogenic Carcinoma Harboring the EWSR1-ATF1 Fusion Gene: Report of a Rare Case. *Head Neck Pathol.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01103-4>.
103. Porubsky S, Rudolph B, Rückert JC, Küffer S, Ströbel P, Roden AC et al. EWSR1 translocation in primary hyalinising clear cell carcinoma of the thymus. *Histopathology.* 2019;75(3):431-436. <https://doi.org/10.1111/his.13890>.
104. Krystel-Whittemore M, Taylor MS, Rivera M, Lennerz JK, Le LP, Dias-Santagata D et al. Novel and established EWSR1 gene fusions and associations identified by next-generation sequencing and fluorescence in-situ hybridization. *Hum Pathol.* 2019 17;93:65-73. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.08.006>.
105. Fukuda H, Kato I, Furuya M, Tanaka R, Takagi T, Kondo T et al. A novel partner of TFE3 in the Xp11 translocation renal cell carcinoma: clinicopathological analyses and detection of EWSR1-TFE3 fusion. *Virchows Arch.* 2019;474(3):389-393. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2509-8>.
106. Oliveira G, Polónia A, Cameselle-Teijeiro JM, Leitão D, Sapia S, Sobrinho-Simões M et al. EWSR1 rearrangement is a frequent event in papillary thyroid carcinoma and in carcinoma of the thyroid with Ewing family tumor elements (CEFTE). *Virchows Arch.* 2017;470(5):517-525. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2095-1>.
107. Eloy C, Oliveira M, Vieira J, Teixeira MR, Cruz J, Sobrinho-Simões M. Carcinoma of the thyroid with ewing family tumor elements and favorable prognosis: report of a second case. *Int J Surg Pathol.* 2014;22(3):260-5. <https://doi.org/10.1177/1066896913486696>.
108. Taccogna S, Guglielmi R, Persichetti A, Morano C, Angelini F, Ienzi S et al. Carcinomas of the Thyroid with Ewing Family Tumor Elements (CEFTEs): A Diagnostic Challenge

- Before Surgery. *Head Neck Pathol.* 2021;15(1):254-261. <https://doi.org/10.1007/s12105-020-01145-z>.
109. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 2005;6(6):223. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-6-223>.
110. Guan J, Lim KS, Mekhail T, Chang CC. Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in the Programmed Death Receptor-1 (PD-1)/PD-L1 Blockade: A Key Player Against Various Cancers. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(6):851-861. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0361-RA>.
111. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity.* 2018; 20;48(3):434-452. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>.
112. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3384-3391. <https://doi.org/10.1172/JCI80011>.
113. Varricchi G, Loffredo S, Marone G, Modestino L, Fallahi P, Ferrari SM, de Paulis A, Antonelli A, Galdiero MR. The Immune Landscape of Thyroid Cancer in the Context of Immune Checkpoint Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):3934. <https://doi.org/10.3390/ijms20163934>.
114. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther.* 2016;9:5023-5039. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105862>.
115. Guo W, Zhang F, Shao F, Wang P, Li Z, Yang X et al. PD-L1 expression on tumor cells associated with favorable prognosis in surgically resected esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2019;84:291-298. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.09.014>.
116. Zhu Q, Cai MY, Chen CL, Hu H, Lin HX, Li M et al. Tumor cells PD-L1 expression as a favorable prognosis factor in nasopharyngeal carcinoma patients with pre-existing intratumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2017;27;6(5):e1312240. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1312240>.
117. Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2016;141(2):293-302. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.03.008>.
118. Kintsler S, Cassataro MA, Drosch M, Holenya P, Knuechel R, Braunschweig T. Expression of programmed death ligand (PD-L1) in different tumors. Comparison of several current available antibody clones and antibody profiling. *Ann Diagn Pathol.* 2019;41:24-37. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2019.05.005>.

119. Zhang GQ, Wei WJ, Song HJ, Sun ZK, Shen CT, Zhang XY, Chen XY, Qiu ZL, Luo QY. PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND 1 OVEREXPRESSION IN THYROID CANCER. *Endocr Pract.* 2019;25(3):279-286. <https://doi.org/10.4158/EP-2018-0342>.
120. Aghajani M, Graham S, McCafferty C, Shaheed CA, Roberts T, DeSouza P et al. Clinicopathologic and Prognostic Significance of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Patients with Non-Medullary Thyroid Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid.* 2018;28(3):349-361. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0441>.
121. Girolami I, Pantanowitz L, Mete O, Brunelli M, Marletta S, Colato C et al. Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Is a Potential Biomarker of Disease-Free Survival in Papillary Thyroid Carcinoma: a Systematic Review and Meta-Analysis of PD-L1 Immunoexpression in Follicular Epithelial Derived Thyroid Carcinoma. *Endocr Pathol.* 2020;31(3):291-300. <https://doi.org/10.1007/s12022-020-09630-5>.
122. Aghajani MJ, Yang T, McCafferty CE, Graham S, Wu X, Niles N. Predictive relevance of programmed cell death protein 1 and tumor-infiltrating lymphocyte expression in papillary thyroid cancer. *Surgery.* 2018;163(1):130-136. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2017.04.033>.
123. Chowdhury S, Veyhl J, Jessa F, Polyakova O, Alenzi A, MacMillan C et al. Programmed death-ligand 1 overexpression is a prognostic marker for aggressive papillary thyroid cancer and its variants. *Oncotarget.* 2016;7(22):32318-28. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8698>.
124. Lubin D, Baraban E, Lisby A, Jalali-Farahani S, Zhang P, Livolsi V. Papillary Thyroid Carcinoma Emerging from Hashimoto Thyroiditis Demonstrates Increased PD-L1 Expression, Which Persists with Metastasis. *Endocr Pathol.* 2018; 29(4):317-323. <https://doi.org/10.1007/s12022-018-9540-9>.
125. Robbins KT, Samant S, Ronen O. Neck Dissection. In: Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, et al, eds. *Cummings Otolaryngology: Head and Neck Surgery.* 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005:1702-1725.
126. Rosai J, Kuhn E, Carcangiu ML. Pitfalls in thyroid tumour pathology. *Histopathology.* 2006;49(2):107-120. Review <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02451.x>.
127. Flamminio F, Tosi AL, Fellegara G. Crushing artifacts resulting in small blue cellular clusters that simulate small cell carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2011;19(4):487-491. <https://doi.org/10.1177/1066896911411187>.
128. Cheng SP, Lee JJ, Chien MN, Kuo CY, Jhuang JY, Liu CL. Lymphovascular invasion of papillary thyroid carcinoma revisited in the era of active surveillance. *Eur J Surg Oncol.* 2020; 46(10 Pt A):1814-1819. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.06.044>.

129. Mete O, Asa SL. Pathological definition and clinical significance of vascular invasion in thyroid carcinomas of follicular epithelial derivation. *Mod Pathol.* 2011; 24(12):1545-52. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.119>.
130. Bai Y, Zhou G, Nakamura M, Ozaki T, Mori I, Taniguchi E et al. Survival impact of psammoma body, stromal calcification, and bone formation in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 2009;22(7):887-94. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.38>.
131. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259-271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>.
132. Bai Y, Niu D, Huang X, Jia L, Kang Q, Dou F et al. PD-L1 and PD-1 expression are correlated with distinctive clinicopathological features in papillary thyroid carcinoma. *Diagn Pathol.* 2017;12(1):72. <https://doi.org/10.1186/s13000-017-0662-z>.
133. Brooks E, Simmons-Arnold L, Naud S, Evans MF, Elhosseiny A. Multinucleated giant cells' incidence, immune markers, and significance: a study of 172 cases of papillary thyroid carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2009;3(2):95-99. <https://doi.org/10.1007/s12105-009-0110-9>.
134. Mizukami Y, Michigishi T, Kawato M, Sato T, Nonomura A, Hashimoto T, Matsubara F. Chronic thyroiditis: thyroid function and histologic correlations in 601 cases. *Hum Pathol.* 1992;23(9):980-988. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90258-5).
135. Bastman JJ, Serracino HS, Zhu Y, Koenig MR, Mateescu V, Sams SB et al. Tumor-Infiltrating T Cells and the PD-1 Checkpoint Pathway in Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(7):2863-73. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-4227>.
136. Ito Y, Miyauchi A, Oda H. Low-risk papillary microcarcinoma of the thyroid: A review of active surveillance trials. *Eur J Surg Oncol.* 2018;44(3):307-315. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2017.03.004>.
137. Moghaddam PA, Virk R, Sakhdari A, Prasad ML, Cosar EF, Khan A. Five Top Stories in Thyroid Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(2):158-170. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0468-RA>.
138. Tallini G, De Leo A, Repaci A, de Biase D, Bacchi Reggiani ML, Di Nanni D et al. Does the Site of Origin of the Microcarcinoma with Respect to the Thyroid Surface Matter? A Multicenter Pathologic and Clinical Study for Risk Stratification. *Cancers (Basel).* 2020;12(1):246. <https://doi.org/10.3390/cancers12010246>.

139. Iacobone M, Jansson S, Barczyński M, Goretzki P. Multifocal papillary thyroid carcinoma--a consensus report of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). *Langenbecks Arch Surg.* 2014;399(2):141-54. <https://doi.org/10.1007/s00423-013-1145-7>.
140. Cai YF, Wang QX, Ni CJ, Guo GL, Li Q, Wang OC et al. The Clinical Relevance of Psammoma Body and Hashimoto Thyroiditis in Papillary Thyroid Carcinoma: A Large Case-control Study. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(44):e1881. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001881>.
141. Gulubova MV, Ivanova KV. The Expression of Tumor-Associated Macrophages and Multinucleated Giant Cells in Papillary Thyroid Carcinoma. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(23):3944-3949. <https://doi.org/10.3889/oamjms>.
142. Hu JM, Liu K, Liu JH, Jiang XL, Wang XL, Chen YZ et al. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predicte aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017; 28;8(13):21526-21538. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15630>.
143. Jiang J, Lu H. Immediate Surgery Might Be a Better Option for Subcapsular Thyroid Microcarcinomas. *Int J Endocrinol.* 2019; 2019:3619864. <https://doi.org/10.1155/2019/3619864>.
144. Kovacevic B, Kuzmic-Jankovic S, Milev B, Skuletic V. Multifocal papillary thyroid microcarcinoma in the end stage of Hashimoto's thyroiditis. *Serbian Archives of Medicine.* 2018; 146(11-12): 672-676. <https://doi.org/10.2298/SARH171114210K>.
145. Pontieri G, Urselli F, Peschi L, Liccardi A, Ruggiero AR, Vergara E et al. Is the Isthmus Location an Additional Risk Factor for Indeterminate Thyroid Nodules? Case Report and Review of the Literature. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;13;9:750. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00750>.
146. Back K, Kim JS, Kim JH, Choe JH. Superior Located Papillary Thyroid Microcarcinoma is a Risk Factor for Lateral Lymph Node Metastasis. *Ann Surg Oncol.* 2019;26(12):3992-4001. <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07587-2>.
147. Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, et al. Minimal extrathyroid extension does not affect the relapse-free survival of patients with papillary thyroid carcinoma measuring 4 cm or less over the age of 45 years. *Surg Today.* 2006; 36(1):12–18. <https://doi.org/10.1007/s00595-005-3090-8>.
148. Rivera M, Ricarte-Filho J, Tuttle RM, Ganly I, Shaha A, Knauf J et al. Molecular, morphologic, and outcome analysis of thyroid carcinomas according to degree of extrathyroid extension. *Thyroid.* 2010; 20(10):1085-93. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.0174>.

149. Park JS, Chang JW, Liu L, Jung SN, Koo BS. Clinical implications of microscopic extrathyroidal extension in patients with papillary thyroid carcinoma. *Oral Oncol.* 2017;72:183-187. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.008>.
150. Liu Z, Huang Y, Chen S, Hu D, Wang M, Zhou L et al. Minimal extrathyroidal extension affects the prognosis of differentiated thyroid cancer: Is there a need for change in the AJCC classification system? *PLoS One.* 2019;14(6):e0218171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218171>.
151. Moon HJ, Kim EK, Chung WY, Yoon JH, Kwak JY. Minimal extrathyroidal extension in patients with papillary thyroid microcarcinoma: is it a real prognostic factor?. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(7):1916-1923. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1556-z>.
152. Bychkov A. Anatomy. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidanatomy.html>. Accessed June 13th, 2020.
153. Russl WO, Ibanez ML, Clark RL, White EC. Thyroid carcinoma. Classification, intraglandular dissemination, and clinicopathological study based upon whole organ sections of 80 glands. *Cancer* 1963; 16: 1425-1460.
154. Chung MK, Kim JH, Ko YH, Son YI. Correlation of lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor with nodal metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. *Head Neck.* 2012;34(6):846-51. <https://doi.org/10.1002/hed.21822>.
155. Koperek O, Asari R, Niederle B, Kaserer K. Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma. *Histopathology.* 2011; 58(6):919-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03791.x>.
156. Kim BY, Jung CH, Kim JW, Lee SW, Kim CH, Kang SK et al. Impact of clinicopathologic factors on subclinical central lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. *Yonsei Med J.* 2012 ;53(5):924-930. <https://doi.org/10.3349/ymj.2012.53.5.924>.
157. Lim YC, Choi EC, Yoon YH, Kim EH, Koo BS. Central lymph node metastases in unilateral papillary thyroid microcarcinoma. *Br J Surg.* 2009; 96(3):253-257. <https://doi.org/10.1002/bjs.6484>.
158. Lee E, Jung W, Woo JS, Lee JB, Shin BK, Kim HK et al. Tumor sprouting in papillary thyroid carcinoma is correlated with lymph node metastasis and recurrence. *Korean J Pathol.* 2014; 48(2):117-125. <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2014.48.2.117>.
159. Kovacevic B, Kuzmic-Jankovic S, Milev B, Skuletic V. Multifocal papillary thyroid microcarcinoma in the end stage of Hashimoto's thyroiditis. *Serbian Archives of Medicine.* 2018; 146(11-12): 672-676. <https://doi.org/10.2298/SARH171114210K>.

160. Perrier ND, Brierley JD, Tuttle RM. Differentiated and anaplastic thyroid carcinoma: Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):55-63. <https://doi.org/10.3322/caac.21439>.
161. Kim K, Kim JH, Park IS, Rho YS, Kwon GH, Lee DJ. The Updated AJCC/TNM Staging System for Papillary Thyroid Cancer (8th Edition): From the Perspective of Genomic Analysis. *World J Surg.* 2018;42(11):3624-3631. <https://doi.org/10.1007/s00268-018-4662-2>.
162. Wu X, Li B, Zheng C, He X. Risk factors for central lymph node metastases in patients with papillary thyroid microcarcinoma. *Endocr Pract.* 2018;24(12):1057-1062. <https://doi.org/10.4158/EP-2018-0305>.
163. Williams D. Thyroid Growth and Cancer. *Eur Thyroid J.* 2015;4(3):164-73. <https://doi.org/10.1159/000437263>.
164. Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, Higashiyama T, Kobayashi K, Miya A. Patient age is significantly related to the progression of papillary microcarcinoma of the thyroid under observation. *Thyroid.* 2014; 24(1):27-34. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0367>.
165. Fukuoka O, Sugitani I, Ebina A, Toda K, Kawabata K, Yamada K. Natural History of Asymptomatic Papillary Thyroid Microcarcinoma: Time-Dependent Changes in Calcification and Vascularity During Active Surveillance. *World J Surg.* 2016;40(3):529-537. <https://doi.org/10.1007/s00268-015-3349-1>.
166. Winkler F. Hostile takeover: how tumours hijack pre-existing vascular environments to thrive. *J Pathol.* 2017;242(3):267-272. <https://doi.org/10.1002/path.4904>.
167. Arrangoiz R, Cordera F, Caba D, Muñoz M, Moreno E, de León E. Comprehensive Review of Thyroid Embryology, Anatomy, Histology, and Physiology for Surgeons. *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery.* 2018; 7: 160-188. <https://doi.org/10.4236/ijohns.2018.74019>.
168. Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncol.* 2010;6(11):1771-9. <https://doi.org/10.2217/fon.10.127>.
169. Eldien MMS, Abdou AG, Rageh T, Abdelrazek E, Elkholy E. Immunohistochemical expression of ER- α and PR in papillary thyroid carcinoma. *Ecancermedicalscience.* 2017; 13;11:748. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.748>.
170. Ito Y, Miyauchi A, Kudo T, Ota H, Yoshioka K, Oda H et al. Effects of Pregnancy on Papillary Microcarcinomas of the Thyroid Re-Evaluated in the Entire Patient Series at Kuma Hospital. *Thyroid.* 2016;26(1):156-60. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0393>.

171. Shindo H, Amino N, Ito Y, Kihara M, Kobayashi K, Miya A et al. Papillary thyroid microcarcinoma might progress during pregnancy. *Thyroid*. 2014;24(5):840-4. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0527>.
172. Zhang LJ, Xiong Y, Nilubol N, He M, Bommareddi S, Zhu X, Jia L, Xiao Z et al. Testosterone regulates thyroid cancer progression by modifying tumor suppressor genes and tumor immunity. *Carcinogenesis*. 2015;36(4):420-8. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv001>.
173. Lee YH, Lee YM, Sung TY, Yoon JH, Song DE, Kim TY et al. Is Male Gender a Prognostic Factor for Papillary Thyroid Microcarcinoma? *Ann Surg Oncol*. 2017;24(7):1958-1964. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5788-4>.
174. Lai X, Xia Y, Zhang B, Li J, Jiang Y. A meta-analysis of Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma risk. *Oncotarget*. 2017; 8(37):62414-62424. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18620>.
175. Sulaieva O, Seleznirov O, Shapochka D, Belemets N, Nechay O, Cheresheva Y et al. Hashimoto's thyroiditis attenuates progression of papillary thyroid carcinoma: deciphering immunological links. *Heliyon*. 2020;6(1):e03077. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03077>.
176. Ahn S, Kim TH, Kim SW, Ki CS, Jang HW, Kim JS, Kim JH, Choe JH, Shin JH, Hahn SY, Oh YL, Chung JH. Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(2):97-106. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0421>.
177. Cunha LL, Marcello MA, Morari EC, Nonogaki S, Conte FF, Gerhard R, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(1):103-10. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0313>.
178. Bai Y, Guo T, Huang X, Wu Q, Niu D, Ji X, Feng Q, Li Z, Kakudo K. In papillary thyroid carcinoma, expression by immunohistochemistry of BRAF V600E, PD-L1, and PD-1 is closely related. *Virchows Arch*. 2018; 472(5):779-787. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2357-6>.
179. Fu G, Polyakova O, MacMillan C, Ralhan R, Walfish PG. Programmed Death - Ligand 1 Expression Distinguishes Invasive Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma from Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features. *EBioMedicine*. 2017;18:50-55. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.031>.
180. Shi RL, Qu N, Luo TX, Xiang J, Liao T, Sun GH et al. , Programmed Death-Ligand 1 Expression in Papillary Thyroid Cancer and Its Correlation with Clinicopathologic Factors and Recurrence. *Thyroid*. 2017; 27(4):537-545. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0228>.

181. Angell TE, Lechner MG, Jang JK, Correa AJ, LoPresti JS, Epstein AL. BRAF V600E in papillary thyroid carcinoma is associated with increased programmed death ligand 1 expression and suppressive immune cell infiltration. *Thyroid*. 2014;24(9):1385-1393. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0134>.
182. Ulisse S, Tuccilli C, Sorrenti S, Antonelli A, Fallahi P, D'Armiento E et al. PD-1 Ligand Expression in Epithelial Thyroid Cancers: Potential Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(6):1405. <https://doi.org/10.3390/ijms20061405>.
183. Gibbons Johnson RM, Dong H. Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells. *Front Immunol*. 2017; 8:961. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00961>.
184. Liu X, Zhang S, Gang Q, Shen S, Zhang J, Lun Y, Xu D, Duan Z, Xin S. Interstitial fibrosis in papillary thyroid microcarcinoma and its association with biological behavior. *Oncol Lett*. 2018;15(4):4937-4943. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7928>.
185. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20(3):174-186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.
186. Inoue C, Miki Y, Saito R, Hata S, Abe J, Sato I et al. PD-L1 Induction by Cancer-Associated Fibroblast-Derived Factors in Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1257. <https://doi.org/10.3390/cancers11091257>.
187. Kovacevic B, Vucevic D, Cerovic S, Eloy C. Peripheral versus intraparenchymal papillary thyroid microcarcinoma: Different morphologies and PD-L1 expression. *Head Neck Pathol* 2021;Preprint. <https://doi.org/10.1007/s12105-021-01337-1>.
188. Eloy C, Cameselle-Teijeiro JM, Rousseau E, Sobrinho-Simões M. Small cell tumours of the thyroid gland: a review. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(3):197-201. <https://doi.org/10.1177/1066896913510029>.
189. Shi W, Zhao QY, Liu ZM, Wang ST, Liu CP. Small Cell Carcinoma: a Rare Subtype of Thyroid Cancer with Unanticipated Prognosis. *Curr Med Sci*. 2019;39(2):265-269. <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2029-z>.
190. Asioli S, Righi A, Volante M, Chiusa L, Lloyd RV, Bussolati G. Cell size as a prognostic factor in oncocytic poorly differentiated carcinomas of the thyroid. *Hum Pathol*. 2014 ;45(7):1489-95. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.02.027>.
191. Bell CD, Coire C, Treger T, Volpe R, Baumal R, Fornasier VL. The 'dark nucleus' and disruptions of follicular architecture: possible new histological aids for the diagnosis of the

- follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid. *Histopathology*. 2001;39(1):33-42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2001.01137.x>.
192. Sweeney E. Dormant cells in columnar cell carcinoma of the thyroid. *Hum Pathol*. 1995 ;26(6):691-693. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90180-9](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90180-9).
193. Albores-Saavedra J, Housini I, Vuitch F, Snyder WH 3rd. Macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma with minor insular component. *Cancer*. 1997;80(6):1110-6. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19970915\)80:6<1110::aid-cncr14>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19970915)80:6<1110::aid-cncr14>3.0.co;2-b).
194. Scarpa A, Chang DK, Nones K, Corbo V, Patch AM, Bailey P et al. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature*. 2017; 2;543(7643):65-71. <https://doi.org/10.1038/nature21063>.
195. Sankar S, Lessnick SL. Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet*. 2011;204(7):351-365. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2011.07.008>.
196. Herrero-Martin D, Fourtouna A, Niedan S, Riedmann LT, Schwentner R, Aryee DN. Factors Affecting EWS-FLI1 Activity in Ewing's Sarcoma. *Sarcoma*. 2011;2011:352580. <https://doi.org/10.1155/2011/352580>.