



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ Γ.Ν.Α

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ. ΖΩΓΡΑΦΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ

ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΑ Β. ΔΕΛΗΓΙΩΡΓΗ

ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

“Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα”

(Σχετικές διατάξεις του άρθρου 50 του νόμου 1268/82, σε συνδυασμό με τις διατάξεις του Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202 παράγραφος 2 του νόμου 5343)

Ημερομηνία υποβολής αίτησης υποψήφιου διδάκτορα: 07/10/2011

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 14/11/2011

Ημερομηνία καθορισμού του θέματος: 14/03/2012

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: 23/05/2018

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Γεώργιος Κ. Ζωγράφος, Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Μανούσος Μ. Κωνσταντουλάκης, Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Ε. Θεοδωρόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ (επιβλέπων)

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Γεώργιος Κ. Ζωγράφος, Καθηγητή Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Μανούσος Μ. Κωνσταντουλάκης, Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Ε. Θεοδωρόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Νικόλαος Αλεξάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Γ. Τούτουζας, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Δημήτριος Θεοδώρου, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Δημήτριος Τραφαλής, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας ΕΚΠΑ

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Άριστα

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω από καρδιάς τις ευχαριστίες μου και την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στον Διευθυντή της Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής, καθηγητή Χειρουργικής και αναπληρωτή πρύτανη του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Γεώργιο Κ. Ζωγράφο για την ενθάρρυνση του να αναλάβω το φιλόδοξο αυτό εγχείρημα. Το ειλικρινές ενδιαφέρον του και η αμέριστη κατανόηση του για τη βαθύτατη επιθυμία μου να υλοποιήσω την αρχική ερευνητική ιδέα αποτέλεσαν ισχυρότατο κίνητρο αέναης εργασίας με στόχο να φανώ αντάξια των προσδοκιών του. Η συνεχής πνευματική και ψυχική συμπαράσταση που μου προσέφερε λειτούργησαν ως πηγή αστείρευτης έμπνευσης. Το ήθος, η συνέπεια και το αίσθημα της υπέρτατης ευθύνης απέναντι στον Ασθενή που διέπουν το δικό του έργο και που μεταλαμπαδεύει ανιδιοτελώς σε εμάς τους μαθητές του είναι ανεκτίμητης αξίας.

Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μανούσο Μ. Κωνσταντουλάκη που αποτέλεσε όχι μόνο κοινών των ερευνητικών μου ανησυχιών κατά τον σχεδιασμό της διατριβής αλλά και αρωγό σε όλη την πορεία ολοκλήρωσης του παρόντος πονήματος. Πολύτιμη ήταν η συμβολή του ώστε να υπερκεραστούν οι αντιξοότητες αυτής της ερευνητικής διαδρομής. Η αμέριστη και ουσιαστική καθοδήγηση του διαδραμάτισε καταλυτικό ρόλο στην επίτευξη των ερευνητικών στόχων που μαζί θέσαμε.

Η πραγμάτωση του παρόντος εγχειρήματος θα ήταν ανέφικτη χωρίς την πολύτιμη επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Γεώργιου Ε. Θεοδωρόπουλου. Τον ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή, επιστημονική και ψυχική, υποστήριξη που μου παρείχε καθώς και για την “από μηχανής” παρέμβαση του που επέλυε κάθε δυσκολία που ανέκυπτε.

Ειλικρινείς ευχαριστίες εκφράζω στη διευθύντρια-συντονίστρια του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών κ. Γεωργία Καφίρη, η οποία διαδραμάτισε θεμελιώδη ρόλο στην υλοποίηση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας.

Ολόψυχα ευχαριστώ την προσφάτως αφυπηρετήσασα διευθύντρια-συντονίστρια του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του νοσοκομείου ΚΑΤ κ. Ελένη Μαχαίρα για την επιστημονική υποστήριξη που απλόχερα μου προσέφερε και την ουσιαστική συμβολή της στην περάτωση της παρούσας διατριβής. Άριστη ήταν η συνεργασία μου με τον επιμελητή Α΄ του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του νοσοκομείου ΚΑΤ κ. Ευτυχιάδη Χρήστο, τον οποίο ευχαριστώ θερμά.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Γεωργία Γεωργίου, ειδικευόμενη Χειρουργικής στην Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική για τη συμβολή της στην άρτια στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της παρούσας διατριβής.

Αθήνα, 2018

Μαρία Β. Δεληγιώργη

Αφιερώνεται

*Στους γονείς μου
Βασίλειο και Αναστασία*

*Στον αδερφό μου
Δρ Νικόλαο Δεληγιώργη
Νευρολόγο*

*Στους καθηγητές μου της
Βαρβακείου Προτύπου Σχολής*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδες

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	9
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1.1. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	11
1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	11
1.1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	16
1.1.2.1. ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ: ΜΥΘΟΣ Ή ΑΛΗΘΕΙΑ;	19
1.1.2.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	20
1.1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	24
1.1.4. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΟΖΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	27
1.1.5. ΑΝΤΙΓΝΩΜΙΕΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	27
1.1.5.1. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	27
1.1.5.2. ΟΛΙΚΗ ΘΥΡΕΟΙΔΕΚΤΟΜΗ Ή ΛΟΒΕΚΤΟΜΗ;	33
1.1.5.3. ΧΟΡΗΓΗΣΗ RAI (Radioactive Iodine)	34
1.1.5.4. ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ TSH	35
1.1.5.5. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΗ ΑΦΑΙΡΕΣΗ	35
1.2. ΤΟ ΑΙΝΙΓΜΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ	39
1.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	41
1.3.1. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΜΑΡΚ	41
1.3.2. Ras ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	41
1.3.2.1. ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ras	41
1.3.2.2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ras	42
1.3.2.3. Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ Ras ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	43
1.3.2.4. Ras ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	45
1.3.3. BRAF ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	45
1.3.4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ	46
1.3.5. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΡΙ3Κ/Akt	47
1.3.6. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ Wnt	48
1.3.7. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ EIF1AΧ	48
1.3.8. TERT ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	48
1.3.9. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	49
1.3.10. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ c-Fos	49

1.3.10.1. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΩΣ ΘΕΜΕΛΙΩΔΕΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΤΟΥ AP 1	50
1.3.10.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ c-Fos ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	51
1.3.10.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ c-Fos ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	51
1.3.10.4. Ο ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	51
1.3.10.5. Ο ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	51
1.3.10.6. Η ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ	52
1.3.10.7. ΤΟ STATUS ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ c-Fos ΣΤΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	52
1.3.11. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	53
1.3.11.1. Η ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ p53	53
1.3.11.2. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TP53 ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53	54
1.3.11.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ p53	54
1.3.11.4. Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53	54
1.3.11.5. ΠΡΩΤΕΪΝΗ p53 : “ Ο ΦΡΟΥΡΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ”	55
1.3.11.6. “ΕΥ ΕΧΕΙΝ” VERSUS “ ΕΓΚΛΗΜΑ ΚΑΙ ΤΙΜΩΡΙΑ”	55
1.3.11.7. “ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ Ή ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ;”	57
1.3.11.8. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ TP 53	58
1.3.11.9. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ TP53 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	58
1.3.11.10. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53 ΣΤΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	60
1.3.12. Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NFκΒ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ	61
1.3.13. Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ORG/ RANKL /TRAIL ΩΣ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ NFκΒ	61
1.3.13.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ ORG/ RANKL/ RANK	61
1.3.14. RANKL	62
1.3.14.1. RANK	63
1.3.14.2. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ RANKL	63
1.3.14.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ	64
1.3.14.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΚΝΣ)	65
1.3.14.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΟΝ ΜΑΣΤΟ	65
1.3.14.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	65
1.3.15. ORG	69

1.3.15.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ OPG ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	70
1.3.16. TRAIL: TNF-RELATED APOPTOSIS INDUCING LIGAND	73
1.3.16.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ TRAIL/TRAILR: Ο ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	74
1.3.16.2. Η ΜΗ ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΟΔΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ TRAIL ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ	75
1.3.17. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ OPG/ RANKL/ RANK/ TRAIL ΣΤΟΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΙΣΤΟ	77
1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ	78
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	81
2.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	82
2.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟ	83
2.3. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	83
2.3.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	83
2.3.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	84
2.3.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ	84
2.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	85
2.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
2.5.1. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης	87
2.5.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων ανά ιστολογικό υπότυπο PTC	90
2.5.3. Συσχέτιση των εκφράσεων RANKL, TRAIL, OPG, p53, KRas, c-Fos με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης	92
2.5.4. Συσχέτιση των εκφράσεων RANKL, OPG, TRAIL με το status των λεμφαδενικών μεταστάσεων ανά ιστολογικό υπότυπο	96
2.5.5. Εφαρμογή μοντέλων λογαριθμικής παλινδρόμησης	97
2.5.6. Συσχέτιση των ζευγών των συνεκφράσεων των μορίων με το status των λεμφαδενικών μεταστάσεων	98
2.5.7. Συσχέτιση των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών με το λεμφαδενικό status	99
2.6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
2.7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	114
2.8. ΕΝΑΥΣΜΑ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	115
2.9. ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ	116
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	117
SUMMARY	119
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	124

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αξιοσημείωτη διεύρυνση των οριζόντων της Θεραπευτικής του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς εξελίσσεται την τελευταία δεκαετία χάρη στη σημαντική πρόοδο που συντελείται στην αποκρυπτογράφηση της “μοριακής υπογραφής” των όγκων. Η εφαρμογή των ερευνητικών δεδομένων στην κλινική πράξη αποσκοπεί στην επίλυση καίριων διαγνωστικών και θεραπευτικών διλημμάτων. Εικάζεται ότι η διαλεύκανση του μοριακού υπόβαθρου του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς με εν δυνάμει επιθετική βιολογική συμπεριφορά θα αναδείξει μοριακούς βιοδείκτες ικανούς να κατευθύνουν την εξατομίκευση της Θεραπευτικής, στοχεύοντας στη μείωση του κινδύνου υποτροπής της νόσου. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην εξατομίκευση της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης, χειρουργικής προσέγγισης που αποτελεί προς το παρόν αντικείμενο διχογνωμιών.

Η θεώρηση της φλεγμονής ως ακρογωνιαίου λίθου της γένεσης και εξέλιξης του καρκίνου αποτελεί το έρεισμα της διερεύνησης του ρόλου των κυτταροκινών ως εννοχρηστωτών και, άρα, εν δυνάμει βιοδεικτών ενός φαύλου κύκλου όπου η φλεγμονή δίνει το έναυσμα της ογκογένεσης και το επαγόμενο από τα καρκινικά κύτταρα φλεγμονώδες μεταγραφικό πρόγραμμα ευοδώνει την εξέλιξη των όγκων. Πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων υποστηρίζουν την εξέχουσα θέση των πλειοτροπικών κυτταροκινών RANKL, OPG και TRAIL στο φλεγμονώδες milieu του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου. Οι μεταλλάξεις της KRas πρωτεΐνης και η υπερέκφραση της c-Fos πρωτεΐνης διαδραματίζουν *bona fide* ρόλο στη γένεση και εξέλιξη των όγκων ο οποίος μεταξύ άλλων, ενέχεται στην επαγόμενη από τα μόρια RANKL, OPG, TRAIL σηματοδότηση. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα φέρνουν στο προσκήνιο τις μεταλλάξεις αλλά και την υπερέκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 –ορόσημο της αποδιαφοροποίησης– ως εν δυνάμει βιοδεικτών των διαφοροποιημένων όγκων.

Παρά την εδραιωμένη συμβολή των μορίων RANKL, OPG, TRAIL, KRas, p53, c-Fos σε πληθώρα καρκίνων, η σημασία τους στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς παραμένει αινιγματική. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, διατυπώθηκε στην παρούσα μελέτη η υπόθεση ότι η έκφραση των εν λόγω μορίων χαρακτηρίζει ένα υποσύνολο του πληθυσμού των ασθενών με θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς που παρουσιάζει νόσο με επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Με σκοπό τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής αναλύθηκε η συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μορίων RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas, c-Fos με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς που θεωρούνται προγνωστικοί παράγοντες καθώς και με τη συνύπαρξη θυρεοειδίτιδας Hashimoto, η προγνωστική σημασία της οποίας παραμένει αμφιλεγόμενη. Δευτερεύων σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς που μεθίσταται στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα.

Η ερμηνεία των ευρημάτων της παρούσας μελέτης επιχειρείται υπό το πρίσμα της κριτικής θεώρησης των σύγχρονων βιβλιογραφικών δεδομένων, ενώ υποδεικνύει τη διατύπωση νέων επιστημονικών υποθέσεων η διαλεύκανση των οποίων αναμένεται να αποτελέσει το έναυσμα για μελλοντική έρευνα.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί σπάνια ογκολογική οντότητα¹, αλλά συνιστά το συχνότερο νεόπλασμα του ενδοκρινικού συστήματος και το συχνότερο αίτιο θανάτου οφειλόμενου σε νεόπλασμα του ενδοκρινικού συστήματος². Αξιοσημείωτο είναι το κλινικό φορτίο που επιφέρει στη δημόσια υγεία η δραματική αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς σχεδόν σε παγκόσμιο επίπεδο τις τελευταίες δεκαετίες³. Ανησυχία εγείρει η πρόβλεψη ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) ο καρκίνος του θυρεοειδούς αναμένεται να αποτελέσει το 2019 την τρίτη συχνότερη διάγνωση καρκίνου στις γυναίκες ανεξαρτήτως ηλικίας³.

Αντικείμενο διαμάχης μεταξύ των ερευνητών αποτελεί η διάκριση μεταξύ της αληθούς επιδημίας του καρκίνου του θυρεοειδούς και της θεώρησης της αύξησης της επίπτωσης ως επιφαινόμενου της διάγνωσης μορφών της νόσου με απουσία συμπτωμάτων που ενδέχεται να μην υπονομεύουν την επιβίωση των ασθενών^{3,4}. Υπό το πρίσμα αυτό, η ευοίωνη πρόγνωση της πλειοψηφίας του καρκίνου του θυρεοειδούς⁵ επιτάσσει την κατά το δυνατόν ακριβέστερη εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου.

Το επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάζεται στην ετερογένεια της βιολογικής συμπεριφοράς των διακριτών ιστολογικών τύπων του καρκίνου του θυρεοειδούς^{5,6}, γεγονός που αντανακλά τη “μοριακή υπογραφή” των όγκων⁷. Το σημαντικότερο επίτευγμα της επιστημονικής επανάστασης στην έρευνα του καρκίνου του θυρεοειδούς αποτελεί η αναγνώριση του γενετικού υπόβαθρου στο 96% του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς, του συχνότερου ιστολογικού τύπου. Η αποσαφήνιση της άρρηκτης σύνδεσης του φαινότυπου των όγκων με τον γονότυπο αυτών αναμένεται να θεμελιώσει την εξατομίκευση της Θεραπευτικής⁷.

1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Σύμφωνα με την ταξινόμηση του καρκίνου του θυρεοειδούς που έχει θεσπιστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO: World Health Organization) και έχει εμπλουτιστεί από το Ινστιτούτο AFIP (Armed Forces Institute of Pathology)⁸, οι όγκοι θυρεοειδούς κατατάσσονται σε πρωτοπαθείς, οι οποίοι διακρίνονται περαιτέρω σε επιθηλιακούς και μη επιθηλιακούς, και σε δευτεροπαθείς. Βάσει της προέλευσης των κυττάρων, οι επιθηλιακοί όγκοι ταξινομούνται στους θυλακιοκυτταρικούς, που αποτελούν την πλειοψηφία των όγκων του θυρεοειδούς⁹, στα μυελοειδή καρκινώματα, προερχόμενα από τα παραθυλακίωδη κύτταρα C, που αποτελούν το 3%–5% του συνόλου¹⁰, και στους μικτούς, θυλακιοκυτταρικούς και μυελοκυτταρικούς, όγκους. Οι θυλακιοκυτταρικοί όγκοι περιλαμβάνουν το θυλακιδώδες αδένωμα, που αποτελεί καλοήγη βλάβη, και τους κακοήθεις όγκους που διαχωρίζονται σε διαφοροποιημένους, χαμηλής διαφοροποίησης και αδιαφοροποίητους. Τα κακοήγη λεμφώματα, τα σαρκώματα και άλλοι σπάνιοι όγκοι απαρτίζουν τους μη επιθηλιακούς όγκους. Ο θυρεοειδής αποτελεί εξαιρετικά σπάνια μεταστατική εστία. Οι συνηθέστεροι πρωτοπαθείς όγκοι που μεθίστανται στον θυρεοειδή είναι τα καρκινώματα νεφρού^{11,12}, πνεύμονα^{11,12}, γαστρεντερικής οδού¹², μαστού¹², κεφαλής και τραχήλου¹¹.

ΘΗΛΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς είναι ο συχνότερος ιστολογικός τύπος των όγκων του θυρεοειδούς θυλακιδώδους προέλευσης¹³, συνιστώντας το 80⁷–85%¹³ του συνόλου των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Η ευοίωνη πρόγνωση της πλειοψηφίας του θηλώδους καρκινώματος^{5,7} δεν επιτρέπει

εφησυχασμό, καθώς υποτροπή της νόσου συμβαίνει στο 15-30% των ασθενών¹⁴, ακόμη και 40 χρόνια μετά την αρχική εκδήλωση¹⁵.

Τυπικό χαρακτηριστικό της ιστολογικής εικόνας του θηλώδους καρκινώματος είναι οι θηλώδεις σχηματισμοί που αντιπροσωπεύουν την παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων επί αγγειοσυνδετικού άξονα. Η διάγνωση τίθεται βάσει των παθολογικών πυρηνικών χαρακτηριστικών που αφορούν αλλοιώσεις στο μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα (μεγέθυνση, συνωστισμός, αλληλοεπικάλυψη, επιμήκυνση πυρήνων) καθώς και μεταβολές της πυρηνικής μεμβράνης (ανώμαλα όρια, ψευδοέγκλειστα, αυλακώσεις) και της χρωματίνης (διαυγείς, υαλοειδείς πυρήνες)¹⁶. Το θηλώδες καρκίνωμα μεθίσταται κατεξοχήν λεμφογενώς, με αποτέλεσμα λεμφαδενικές μεταστάσεις να ανευρίσκονται στο 20–50% του συνόλου κατά την αρχική χειρουργική προσέγγιση της νόσου, ποσοστό το οποίο ανέρχεται στο 90%, εάν συμπεριληφθούν οι μεταστάσεις μεγέθους μικρότερου από 2 χιλιοστά (χιλ.) που αναφέρονται ως μικρομεταστάσεις⁹. Σπάνιο χαρακτηριστικό του θηλώδους αποτελεί η αγγειακή διήθηση, που παρατηρείται στο 5-10% του συνόλου. Διήθηση είτε της κάψας του όγκου είτε λεμφαδενικής κάψας ανευρίσκεται στο 5–35% των χειρουργικών παρασκευασμάτων του θηλώδους, ενώ απομακρυσμένες μεταστάσεις επισυμβαίνουν στο 2–10% των ασθενών¹³.

Βάσει ιστολογικών κριτηρίων διακρίνονται ποικίλοι υπότυποι του θηλώδους με ιδιαίτερο κλινικοπαθολογοανατομικό προφίλ. Εκτιμάται ότι το κλασσικό θηλώδες καρκίνωμα αποτελεί το ήμισυ του συνόλου των θηλώδων καρκινωμάτων^{17,18}. Δυσμενής έκβαση της νόσου θεωρείται ότι προμηνύει η παρουσία των εξής ιστολογικών υπότυπων: του υπότυπου “υψηλών κυττάρων (“tall cell”), του υπότυπου διάχυτου σκληρυντικού τύπου (“diffuse sclerosing”), του υπότυπου κυλινδρικών κυττάρων (“columnar”) και του υπότυπου συμπαγούς τύπου (solid)¹⁹⁻²¹.

ΘΥΛΑΚΙΩΔΗΣ ΥΠΟΤΥΠΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΔΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Ο θυλακιδώδης υπότυπος του θηλώδους περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Grile και Hazard το 1953²², ενώ αναγνωρίστηκε ως διακριτή κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα το 1977²³. Αποτελεί όγκο ο οποίος εκδηλώνεται συνήθως σε νεαρότερη ηλικία και παρουσιάζει μεγαλύτερο μέγεθος συγκριτικά με το κλασσικό θηλώδες. Συνιστά τον δεύτερο σε συχνότητα ιστολογικό υπότυπο του θηλώδους²⁴. Διακρίνονται δύο επιμέρους τύποι αυτού: ο εγκαψωμένος και ο διηθητικός. Αξιοσημείωτο είναι ότι η επίπτωση του εγκαψωμένου υπότυπου έχει τριπλασιαστεί τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, με αποτέλεσμα ο υπότυπος αυτός να αποτελεί το 10–20% των καρκινωμάτων θυρεοειδούς που διαγιγνώσκονται στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική¹⁶. Η ευνοϊκή πρόγνωση του, που αντανακλάται σε ποσοστό υποτροπής μικρότερο από 1% κατά την παρακολούθηση για 15 έτη, οδήγησε το 2012 στην αναθεώρηση του χαρακτηρισμού του ως καρκίνου και στη μετονομασία του σε “μη διηθητικό θυλακιδώδες θυρεοειδικό νεόπλασμα με πυρηνικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά του θηλώδους” (NIFTP: noninvasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features), για την αντιμετώπιση του οποίου συνιστάται ογκεκτομή ή λοβεκτομή.

Έξι ιστολογικά χαρακτηριστικά θεσπίστηκαν ως διαγνωστικά κριτήρια του “μη διηθητικού θυλακιδώδους θυρεοειδικού νεοπλασματος με πυρηνικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά του θηλώδους”:

- i) η εγκαψωμένη μορφή, ii) το θυλακιδώδες πρότυπο ανάπτυξης με παρουσία θηλών σε ποσοστό μικρότερο από 1%, iii) η απουσία ψαμμωδών σωμάτων, iv) η παρουσία σε ποσοστό μικρότερο από 30% συμπαγούς, δοκιδώδους ή νησιδιακού πρότυπου ανάπτυξης, v) πυρηνικό score ίσο με 2-3 το οποίο υπολογίζεται βαθμολογώντας κάθε πυρηνικό χαρακτηριστικό-ορόσημο του θηλώδους βάσει ενός εδραιωμένου αλγόριθμου, vi) η απουσία διήθησης κάψας ή αγγείων, η απουσία νέκρωσης και αυξημένης μιτωτικής δραστηριότητας¹⁶. Ωστόσο, τον Ιούνιο του 2017 δημοσιεύτηκαν στο διαδίκτυο αυστηρότερα

κριτήρια διάγνωσης από το Αμερικάνικο Κολλέγιο Παθολογοανατόμων, σύμφωνα με τα οποία η παρουσία θηλώδους δομής αποκλείει τη διάγνωση NIFTP²⁵.

Η δυσχέρεια διαφορικής διάγνωσης μεταξύ του εγκαψωμένου και του διηθητικού τύπου βάσει των κυτταρολογικών χαρακτηριστικών²⁶ έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην ανίχνευση των υπερηχογραφικών χαρακτηριστικών²⁷ και του μοριακού προφίλ αυτών των όγκων¹⁶ με στόχο την έγκαιρη αναγνώριση του διηθητικού τύπου, για την αντιμετώπιση του οποίου συνιστάται επιθετικότερη χειρουργική προσέγγιση συγκριτικά με τον εγκαψωμένο τύπο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι ο εγκαψωμένος θυλακιδώδης υπότυπος του θηλώδους αποτελεί το ήμισυ των καρκινωμάτων θυρεοειδούς που φέρουν Ras μεταλλάξεις²⁸.

ΥΠΟΤΥΠΟΣ “ΥΨΗΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ”

Το 1978 οι Hawk και Hazard περιέγραψαν για πρώτη φορά έναν υπότυπο του θηλώδους καρκινώματος που χαρακτηρίστηκε ως όγκος “υψηλών κυττάρων” λόγω της παρουσίας κυττάρων των οποίων το ύψος είναι διπλάσιο από το πλάτος²⁹. Απαραίτητο στοιχείο για να τεθεί η διάγνωση είναι τα κύτταρα αυτά να αποτελούν το 30–50% του συνόλου³⁰. Άφθονο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και πυρηνές κείμενοι στη βάση των κυττάρων χαρακτηρίζουν επίσης τον υπότυπο αυτό. Υπολογίζεται ότι οι όγκοι “υψηλών κυττάρων” αποτελούν το 3.8–10.4% του συνόλου του θηλώδους. Σχετίζονται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά που αντανακλάται στη συχνή παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και στο υψηλό ποσοστό τοπικής υποτροπής και θνησιμότητας³¹. Στη δυσμενή πρόγνωση του υπότυπου αυτού ενέχονται η συχνή ανεύρεση των γενετικών ανασυνδυασμών RET/PTC (rearranged during transfection)/(papillary thyroid cancer) 3³² καθώς και η υψηλότερη επίπτωση των BRAF μεταλλάξεων^{7,33} και η αυξημένη έκφραση της τύπου IV κολλαγενάσης, ενζύμου μοριακού βάρους 72 kDa που αναφέρεται και ως MMP (matrix metalloproteinase) 2, συγκριτικά με το κλασσικό θηλώδες καρκίνωμα³⁴.

ΘΥΛΑΚΙΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το θυλακιδώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αποτελεί τον δεύτερο κατά σειρά συχνότητας ιστολογικό τύπο διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς, που απαρτίζει το 12% του συνόλου σε περιοχές με επάρκεια ιωδίου. Απαντάται σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης σε σύγκριση με το θηλώδες καρκίνωμα – 40 εως 60 ετών, έναντι 30 εως 50 ετών, αντίστοιχα³⁵. Το θυλακιδώδες καρκίνωμα μεθίσταται κατά κύριο λόγο αιματογενώς, οδηγώντας στην ανεύρεση απομακρυσμένων μεταστάσεων στο 10–15% των ασθενών. Συνήθεις μεταστατικές εστίες αποτελούν τα οστά και οι πνεύμονες, ενώ μεταξύ των σπανιότερων συγκαταλέγονται ο εγκέφαλος, το ήπαρ, η ουροδόχος κύστη και το δέρμα. Λεμφαδενική διήθηση παρατηρείται στο 8–13% αυτού του ιστολογικού τύπου¹³.

Κριτήριο της κλασσικής ταξινόμησης του θυλακιδώδους καρκινώματος σε τρεις υπότυπους αποτελεί η διήθηση της κάψας και των αγγείων¹³:

- i. Ο “ελάχιστα διηθητικός” εγκαψωμένος όγκος χαρακτηρίζεται από μικροσκοπική διήθηση της κάψας του όγκου ή των αγγείων και παρουσιάζει χαμηλό κίνδυνο υποτροπής.
- ii. Ο “αγγειοδιηθητικός” θυλακιδώδης καρκίνος παρουσιάζει ελάσσονα διήθηση των αγγείων (≤ 4 εστίες διήθησης αγγείων μέσα στον όγκο ή στην κάψα του όγκου) με ή χωρίς διήθηση της κάψας, χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν χαμηλό κίνδυνο υποτροπής.
- iii. Ο “ευρέως διηθητικός” όγκος παρουσιάζει εκτεταμένη διήθηση της κάψας, πολυοζώδη μορφή με απουσία σαφώς καθορισμένης κάψας που διηθεί τον φυσιολογικό ιστό γύρω

από τον όγκο και/ή εκτεταμένη διήθηση αγγείων (>4 εστίες), χαρακτηριστικά που σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο υποτροπής.

Παρατηρείται συσχέτιση της συνύπαρξης αγγειακής διήθησης και εκτεταμένης διήθησης της κάψας με την εκδήλωση απομακρυσμένων μεταστάσεων στο 50% των ασθενών¹³. Ως υπότυποι του θυλακιδώδους καρκινώματος με δυσμενή κλινική έκβαση περιγράφονται το ογκοκυτταρικό θυλακιδώδες καρκίνωμα – όγκος “εκ κυττάρων Hurthle”– και το νησιδιακό καρκίνωμα (insular)¹³.

ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο όρος “καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης” εισήχθη στην κλινική πράξη από τον Rosai πριν από περισσότερα από 30 έτη³⁶, ενώ ο όγκος αυτός αναγνωρίστηκε ως διακριτή κλινική οντότητα το 2004. Σύμφωνα με τον WHO, το καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης ορίζεται ως “νεόπλασμα προερχόμενο από το θυλακιδώδες επιθήλιο του θυρεοειδούς, το οποίο παρουσιάζει περιορισμένα στοιχεία διαφοροποίησης και κατέχει ενδιάμεση θέση μεταξύ των διαφοροποιημένων και των αδιαφοροποίητων καρκινωμάτων όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τη βιολογική συμπεριφορά”³⁷.

Τρία χαρακτηριστικά που αντλούνται από την ιστολογική εξέταση συνθέτουν τα διαγνωστικά κριτήρια των όγκων “χαμηλής διαφοροποίησης”³⁸:

- I. Συμπαγές ή δοκιδώδες ή νησιδιακό πρότυπο ανάπτυξης.
- II. Απουσία των πυρηνικών χαρακτηριστικών – ορόσημο του θηλώδους καρκινώματος.
- III. Παρουσία τουλάχιστον ενός από τα εξής χαρακτηριστικά: περιελισσόμενοι πυρήνες, παρουσία νέκρωσης, τρεις ή περισσότερες από τρεις μιτώσεις ανά δέκα οπτικά πεδία.

Πρόκειται για σπάνια κλινική οντότητα με επίπτωση 0.23–2.6% στο σύνολο του καρκίνου του θυρεοειδούς³⁹. Απαντάται συχνότερα στις γυναίκες κατά την έκτη δεκαετία της ζωής⁴⁰⁻⁴². Η ανεύρεση εξωθυρεοειδικής επέκτασης στο 30–59% των όγκων και η παρουσία μεταστατικής νόσου στο 13–33% των ασθενών συντελούν στη χαμηλότερη πενταετή επιβίωση και στο υψηλότερο ποσοστό υποτροπής και εμμόνης της νόσου που χαρακτηρίζουν το καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης σε σύγκριση με το διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς⁴³. Η αποκρυπτογράφηση του διακριτού γενετικού προφίλ του καρκινώματος χαμηλής διαφοροποίησης, το οποίο φαίνεται να περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, αλλαγές στα γονίδια TP53, ERBB (Receptor tyrosine-protein kinase erbB) 1,4, APC (adenomatous polyposis coli), SMAD4 και KIT, αναμένεται να ανοίξει νέους ορίζοντες στη διάγνωση και τη θεραπεία του ιστολογικού αυτού υπότυπου⁴⁴.

ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το αναπλαστικό καρκίνωμα αποτελεί όγκο με επιθετική βιολογική συμπεριφορά και πλήρη αποδιαφοροποίηση των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων, ο οποίος συνιστά το 0.9–9.8% όλων των όγκων θυρεοειδούς σε παγκόσμιο επίπεδο. Απαντάται συνηθέστερα σε ασθενείς μέσης ηλικίας 65 ετών⁴⁵. Η επιβίωση καθορίζεται από το στάδιο της νόσου και εκτιμάται 9 μήνες, 4.8 μήνες και 3 μήνες σε ασθενείς με νόσο σταδίου IVA (ενδοθυρεοειδικός όγκος με απουσία μεταστάσεων), IVB (εξωθυρεοειδική επέκταση του όγκου με απουσία μεταστάσεων) και IVC (όγκος οποιουδήποτε σταδίου T σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης AJCC (American Joint Committee on Cancer)/ TNM (Tumor-Node-Metastasis) με παρουσία μεταστάσεων), αντίστοιχα⁶. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το αναπλαστικό καρκίνωμα προέρχεται συνήθως από την αποδιαφοροποίηση προϋπάρχοντος διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς, ενώ εστίες αναπλαστικού ενδέχεται να ανευρίσκονται στο θηλώδες, στο θυλακιδώδες και στο Hurthle cell καρκίνωμα⁴⁵. Ως προγνωστικοί παράγοντες

θεωρούνται το κοινωνικο-οικονομικό status του ασθενούς, το στάδιο της νόσου, η ηλικία, με επιδείνωση της πρόγνωσης προϊούσης της ηλικίας, και το φύλο⁴⁶. Εκτεταμένη τοπική διήθηση και απομακρυσμένες μεταστάσεις απαντώνται στο 15–50% των ασθενών. Συνηθέστερη μεταστατική εστία είναι οι πνεύμονες, ενώ ακολουθούν κατά σειρά φθίνουσας συχνότητας τα οστά και ο εγκέφαλος. Σπανιότατα παρατηρούνται μεταστάσεις στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο πάγκρεας και στα επινεφρίδια⁴⁷. Παράγοντες που έχουν σχετιστεί με αύξηση της επιβίωσης είναι η εκτεταμένη χειρουργική επέμβαση, η υψηλότερη δόση ακτινοθεραπείας, το μικρότερο μέγεθος του όγκου, η απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων, η συνύπαρξη διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς και η πολύπλευρη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου^{48,49}.

ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς συνιστά νευροενδοκρινή όγκο, προερχόμενο από τα παραθυλακίωδη κύτταρα C, ο οποίος παράγει κατεξοχήν καλσιτονίνη (Ct) αλλά και πλειάδα λοιπών πεπτιδίων, όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο CEA, η σεροτονίνη, το VIP (vasoactive intestinal polypeptide), η ACTH (adrenocorticotrophic hormone), η σωματοστατίνη, η χρωμογρανίνη και η ισταμινάση, δεδομένου ότι τα C κύτταρα προέρχονται από την εμβρυϊκή νευρική ακρολοφία. Διακρίνονται 2 μορφές μυελοειδούς, η σποραδική και η κληρονομούμενη, που αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα το 75% και 25% του συνόλου του μυελοειδούς¹⁰.

Το κληρονομούμενο μυελοειδές εκδηλώνεται ως μέρος ενός από τα σύνδρομα πολλαπλών ενδοκρινικών νεοπλασιών, τα οποία μεταβιβάζονται με τον επικρατή αυτοσωματικό τρόπο¹⁰:

- I. MEN (multiple endocrine neoplasia) 2A (Σ.Sipple): Μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, φαιοχρωμοκύττωμα, πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός.
- II. MEN2B: Μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, φαιοχρωμοκύττωμα.
- III. Οικογενές μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς (FMTC: familial medullary thyroid cancer): Έκφραση του MEN2A που περικλείει εκδήλωση μυελοειδούς σε πολλές γενιές ενός γενεολογικού δένδρου, υπό την προϋπόθεση της απουσίας φαιοχρωμοκυτώματος και πρωτοπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού.

Το γενετικό υπόβαθρο των συνδρόμων MEN συνθέτουν μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο RET, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 10.q.11.2 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RET, έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με δράση τυροσινικής κινάσης, υπεύθυνο για τον έλεγχο της επιβίωσης, της αύξησης, της διαφοροποίησης και της μετανάστευσης των κυττάρων σε ιστούς προερχόμενους από τη νευρική ακρολοφία. Σωματικές μεταλλάξεις του ογκογονιδίου RET ανευρίσκονται στο 50% των σποραδικών μορφών μυελοειδούς, αλλά ο ρόλος τους στην έκβαση της νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος¹⁰.

Το μυελοειδές εκδηλώνεται συνήθως ως ψηλαφητή μάζα τραχήλου που αντιπροσωπεύει είτε τον όγκο *per se* είτε λεμφαδενικές μεταστάσεις, η επίπτωση των οποίων προσεγγίζει το 80%. Σε νόσο σταδίου I, διήθηση κεντρικών και πλάγιων λεμφαδενικών διαμερισμάτων ανευρίσκεται, αντίστοιχα, στο 14% και στο 11% του συνόλου, ενώ σε νόσο σταδίου IV τα ποσοστά αυτά ανέρχονται στο 86% και στο 93%, αντίστοιχα. Τραχηλικές και απομακρυσμένες μεταστάσεις παρατηρούνται στο 70% και στο 10%, αντίστοιχα, των ασθενών που εκδηλώνουν ψηλαφητή θυρεοειδική μάζα¹⁰.

Η δεκαετής επιβίωση των ασθενών με μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς παρουσιάζει ευρύ φάσμα, εκτεινόμενο από 100%, 93% και 71% μέχρι 21%, αντίστοιχα, σε νόσο σταδίου I, II, III, IV σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης TNM¹⁰.

Ιδιαίτερη θεραπευτική στρατηγική επιβάλλει η διακριτή φύση του μυελοειδούς καρκινώματος θυρεοειδούς, αλλά το θέμα αυτό εκτείνεται πέραν του αντικειμένου του παρόντος πονήματος.

1.1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

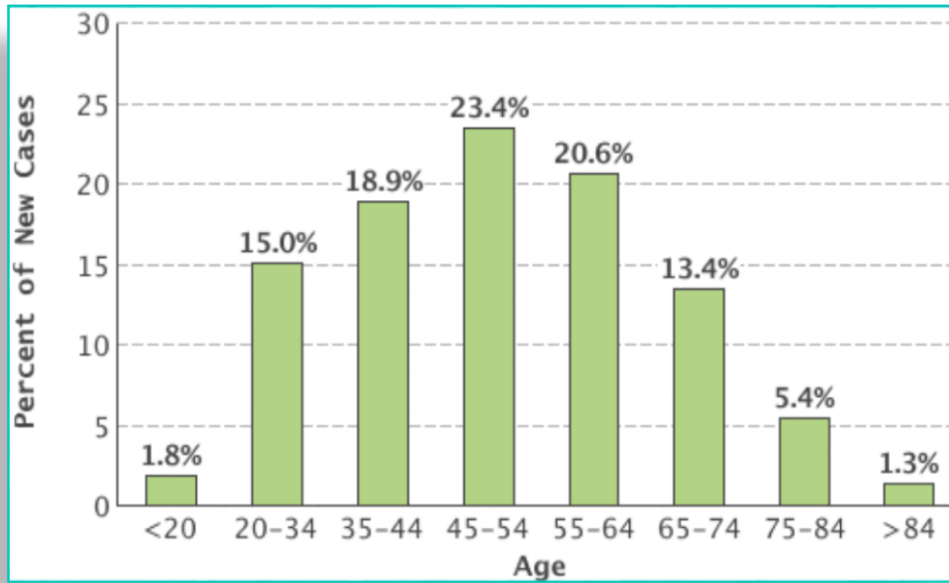
Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί το 2.1% του συνόλου των καρκίνων και στα δύο φύλα, ποσοστό που ανέρχεται στο 3.5% όσον αφορά τον γυναικείο πληθυσμό, σύμφωνα με δεδομένα που συλλέχθηκαν το 2012 από 184 χώρες παγκοσμίως και συμπεριλαμβάνονται στην πέμπτη έκδοση της βάσης δεδομένων GLOBOCAN¹. Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι ο αθροιστικός κίνδυνος νόσησης μέχρι την ηλικία των 75 ετών είναι 0.4 όσον αφορά και τα 2 φύλα, ειδικότερα 0.2 για τους άνδρες και 0.6 για τις γυναίκες¹. Στις ΗΠΑ, κατά το χρονικό διάστημα 2012-2014 καταγράφηκε επί τοις εκατό πιθανότητα νόσησης ίση με 1.8% (1/56) στις γυναίκες και 0.6% (1/160) στους άνδρες².

Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου (American Cancer Society) εκτιμάται ότι στο σύνολο 56,430 νέων περιπτώσεων καρκίνων του ενδοκρινικού συστήματος που αναμένεται να διαγνωστούν το 2018 στις ΗΠΑ οι 53,990 θα αφορούν τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Από τους 3,080 θανάτους που αναμένεται να αποδοθούν σε καρκίνο του ενδοκρινικού συστήματος το 2018 εκτιμάται ότι η πλειοψηφία – οι 2,060 εξ' αυτών – θα οφείλονται στον καρκίνο του θυρεοειδούς².

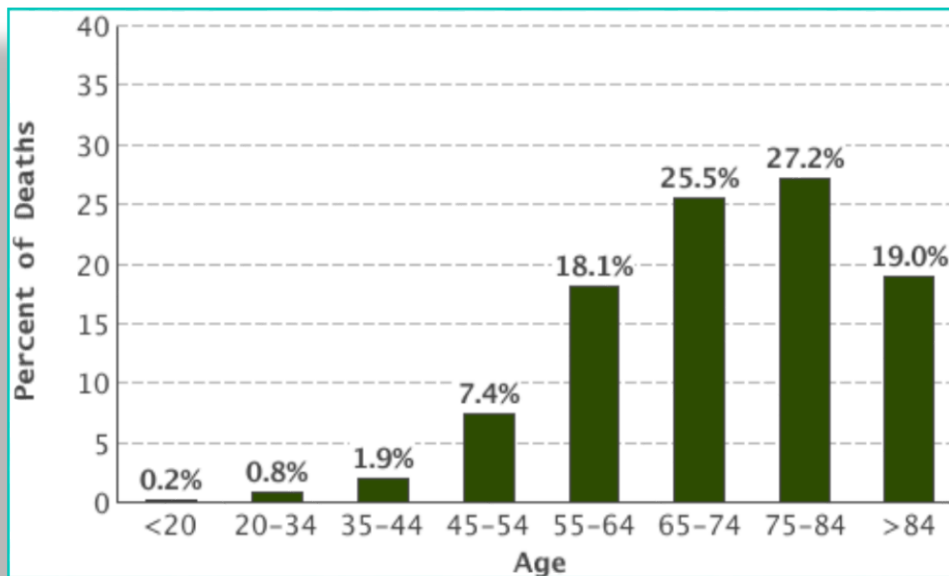
Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων GLOBOCAN 2012, οι υψηλότερες συχνότητες του καρκίνου του θυρεοειδούς παγκοσμίως καταγράφηκαν στη Βόρεια Αμερική (6.3 ανά 100,000 ανδρών και 20 ανά 100,000 γυναικών) και στην Ωκεανία (3.4 ανά 100,000 ανδρών και 11.3 ανά 100,000 γυναικών) και οι χαμηλότερες στη Δυτική Αφρική (0.3 ανά 100,000 ανδρών και 1 ανά 100,000 γυναικών), ενώ στην Ευρώπη καταγράφηκε συχνότητα ίση με 2.5 ανά 100,000 ανδρών και 7.8 ανά 100,000 γυναικών. Οι συχνότητες του καρκίνου του θυρεοειδούς που απαντώνται στις αναπτυσσόμενες χώρες (3.6 ανά 100,000 ανδρών και 11.1 ανά 100,000 γυναικών) υπερέρχουν έναντι των αντίστοιχων των αναπτυσσόμενων χωρών (1.4 ανά 100,000 ανδρών και 4.7 ανά 100,000 γυναικών)¹.

Αξιοσημείωτες είναι οι μεταβολές της μέσης ετήσιας επί τοις εκατό αύξησης της επίπτωσης στις ΗΠΑ τόσο στους άνδρες (1.9, 5.5 και -1.5 αντίστοιχα για το χρονικό διάστημα 1980-1997, 1997-2012 και 2012-2014) όσο και στις γυναίκες (2.3, 7.1 και 1.3 αντίστοιχα για το χρονικό διάστημα 1980-1993, 1999-2009 και 2009-2014)³. Εικάζεται ότι η πρόσφατη επιβράδυνση της αύξησης της επίπτωσης αντανακλά την εξατομίκευση του ελέγχου των θυρεοειδικών όζων που προτάθηκε από τις κατευθυντήριες οδηγίες της ATA το 2009².

Σύμφωνα με το πρόγραμμα δεδομένων που αφορούν την επιτήρηση, την επιδημιολογία και την έκβαση του καρκίνου στις ΗΠΑ –SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results)– επικρατέστερη ηλικία διάγνωσης καρκίνου θυρεοειδούς για το χρονικό διάστημα 2010-2014 σε όλες τις φυλές και στα δύο φύλα ήταν τα 45-54 έτη, ενώ η πλειοψηφία των θανάτων οφειλόμενων στον καρκίνο θυρεοειδούς αφορούσε ασθενείς ηλικίας 75-84 ετών⁵⁰.

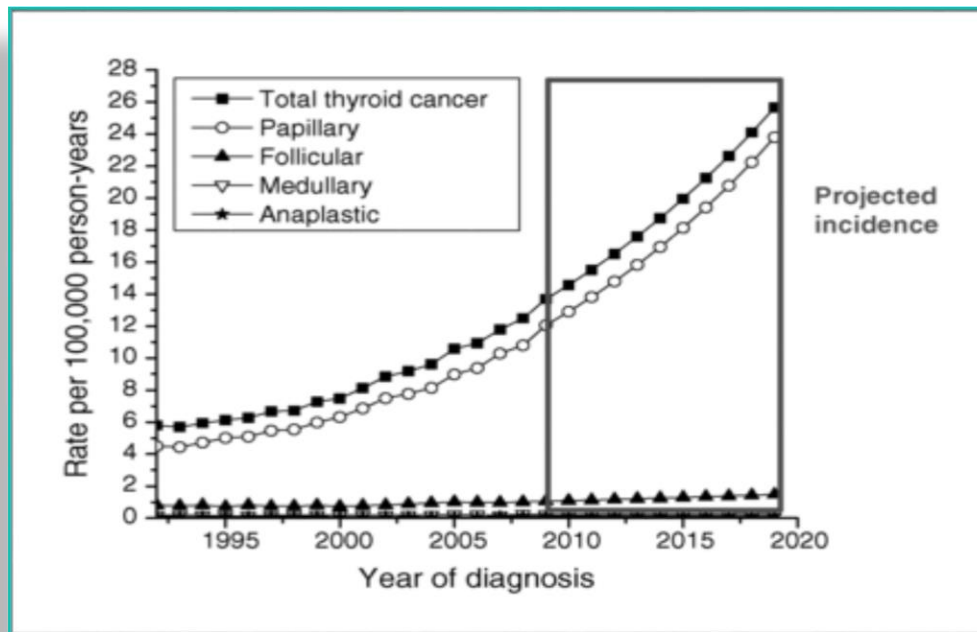


Εικόνα 1.1. Νέες περιπτώσεις (ποσοστό%) καρκίνου θυρεοειδούς στρωματοποιημένες ανά ηλικιακή ομάδα για όλες τις φυλές και τα δύο φύλα (U.S. 2010-2014. Πηγή: National Cancer Institute, Surveillance, epidemiology and end Results program (SEER). Cancer stat facts: Thyroid cancer <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>. Accessed February 2018.



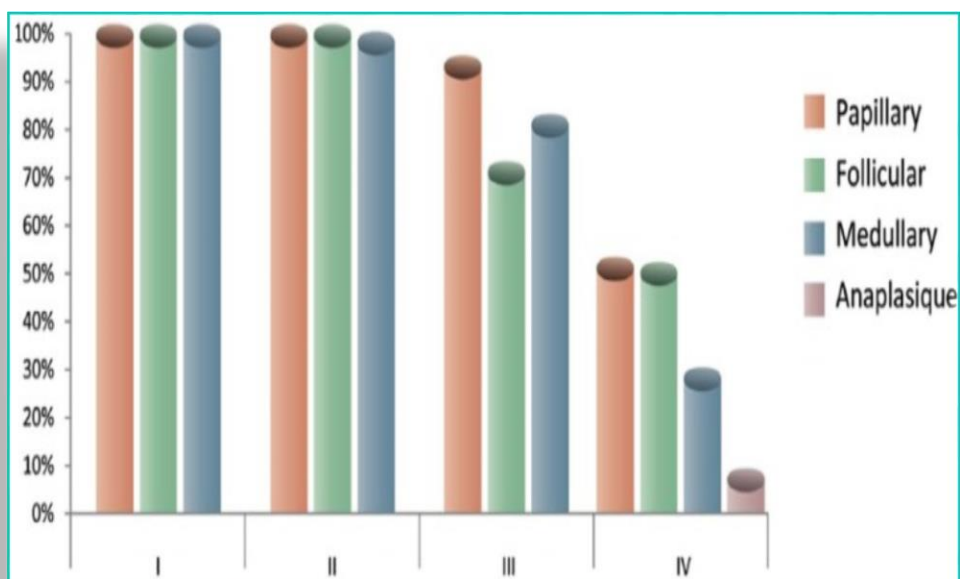
Εικόνα 1.2. Ποσοστό % θανάτων οφειλόμενων στον καρκίνο θυρεοειδούς στρωματοποιημένο ανά ηλικιακή ομάδα βάσει του προγράμματος SEER 18 (2010-2014) που αφορά όλες τις φυλές και τα δύο φύλα. Πηγή: National Cancer Institute, Surveillance, epidemiology and end Results program (SEER). Cancer stat facts: Thyroid cancer <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>. Accessed February 2018.

Αναλύοντας τη βάση δεδομένων NCI SEER 13 (1992-2008), οι Aschebrook-Kilfoy και συνεργάτες³ υπολόγισαν ότι η ολική επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς το χρονικό αυτό διάστημα ήταν 8.7 ανά 100,000 άνθρωπο-έτη –12.7 ανά 100,000 γυναίκες-έτη και 4.5 ανά 100,000 άνδρες-έτη– και παρουσίαζε ετήσια αύξηση κατά 7.0%, 1.0%, 2.0% και 1.0% όσον αφορά αντίστοιχα το θηλώδες, το θυλακιώδες, το μυελοειδές και το αναπλαστικό καρκίνωμα. Οι ερευνητές αυτοί προέβλεψαν ότι το 2019, η επίπτωση θα ανέλθει σε 23.8, 1.5, 0.26 και 0.12, αντίστοιχα, για το θηλώδες, το θυλακιώδες, το μυελοειδές και το αναπλαστικό καρκίνωμα. Επίσης, το θηλώδες καρκίνωμα αναμένεται να αποτελέσει στις ΗΠΑ το 2019 την τρίτη συχνότερη διάγνωση καρκίνου στις γυναίκες ανεξαρτήτως ηλικίας, μετά τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα, με επίπτωση 37.0 ανά 100,000 άνθρωπο-έτη, επιφέροντας στη δημόσια υγεία κόστος που υπολογίζεται 18 έως 21 εκατομμύρια δολάρια.



Εικόνα 1.3. Προβλεπόμενη επίπτωση του συνόλου του καρκίνου του θυρεοειδούς και των επιμέρους ιστολογικών τύπων βάσει των δεδομένων του προγράμματος SEER³

Χαμηλή παραμένει παγκοσμίως η θνησιμότητα της νόσου όπως καταγράφεται στη GLOBOCAN 2012: 0.6/100,000 γυναικών και 0.3/100,000 ανδρών¹. Η επιβίωση των ασθενών με καρκίνο θυρεοειδούς καθορίζεται από τον ιστολογικό τύπο και το στάδιο της νόσου σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης AJCC/TNM. Ασθενείς με νόσο σταδίου I ή II παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά επιβίωσης αναφορικά με καθέναν από τους τρεις ιστολογικούς τύπους – θηλώδες, θυλακιώδες, μυελοειδές – ενώ σε ασθενείς με νόσο σταδίου III το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης καταγράφεται για το θηλώδες και ακολουθούν κατά σειρά φθίνοντος ποσοστού το μυελοειδές και το θυλακιώδες. Σε νόσο σταδίου IV το χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης που καταγράφεται αφορά το αναπλαστικό καρκίνωμα⁵¹.



Εικόνα 1.4. Εκατοστιαίο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης ασθενών με διακριτούς ιστολογικούς τύπους καρκίνου θυρεοειδούς στρωματοποιημένο ανά στάδιο νόσου. Πηγή: National Cancer Institute, Surveillance, epidemiology and end Results program (SEER). Cancer stat facts: Thyroid cancer <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>.

1.1.2.1. ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ: ΜΥΘΟΣ Ή ΑΛΗΘΕΙΑ;

Δυσεπίλυτο αίνιγμα αποτελεί η ερμηνεία της αύξησης της επίπτωσης του θυρεοειδούς, το έναυσμα της οποίας δόθηκε στο πρώτο ήμισυ του προηγούμενου αιώνα και αποδόθηκε αρχικά στην εν δυνάμει ογκογόνο επίδραση της εξωτερικής ακτινοβολήσης της κεφαλής και του τραχήλου για τη θεραπεία καλοηθών νοσημάτων^{3,52,53}. Η συνέχιση της αύξησης της επίπτωσης ακόμη και μετά την κατάργηση της θεραπευτικής αυτής στρατηγικής υποδεικνύει την πολυπλοκότητα του φαινομένου.

Ενδιαφέρουσα είναι η υπόθεση ότι η αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς αποτελεί επιφαινόμενο της αύξησης της συχνότητας της διάγνωσης μορφών της νόσου με απουσία κλινικών εκδηλώσεων^{54,55}. Δεδομένου ότι το 60% των θυρεοειδικών όζων μεγέθους μικρότερου από 1.5 εκατοστά (εκ.) διαλάθουν της κλινικής εξέτασης, η ευρεία εφαρμογή του υπερηχογραφικού ελέγχου και της βιοψίας δια λεπτής βελόνας (FNAB: fine-needle aspiration biopsy) οδηγούν πράγματι στη συχνότερη διάγνωση θυρεοειδικών όζων προερχόμενων από τη δεξαμενή την οποία συγκροτεί ο υψηλός επιπολασμός των θυρεοειδικών όζων στην όψιμη ενήλικη ζωή (30-50%)⁵⁶.

Επιχειρήματα των υποστηρικτών της φαινομενικής αύξησης της επίπτωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς αποτελούν το μικρό μέγεθος της πλειοψηφίας των καρκινωμάτων καθώς και η αποκάλυψη των καρκινωμάτων ως τυχαίου ευρήματος λόγω συχνότερης διενέργειας ολικής θυρεοειδεκτομής και ενδελεχέστερης παθολογοανατομικής εξέτασης των χειρουργικών παρασκευασμάτων⁵⁷. Η συχνή παρουσία μικρών, ασυμπτωματικών, θυρεοειδικών όγκων υπογραμμίζεται από την ανάδειξη αυτών ως νεκροτομιακού ευρήματος σε ποσοστό 2.8-39%^{58,59}.

Ωστόσο, οι υπέρμαχοι της αληθούς αύξησης της επίπτωσης επισημαίνουν ότι η αύξηση της επίπτωσης δεν αφορά μόνο τους μικρούς όγκους αλλά και τους όγκους μεγάλου μεγέθους καθώς και εκείνους με έκδηλη μεταστατική νόσο. Ειδικότερα, ανάλυση δεδομένων του SEER για το χρονικό διάστημα 1973-2006 αποκαλύπτει διπλασιασμό της επίπτωσης των διαφοροποιημένων καρκινωμάτων θυρεοειδούς των όγκων μεγέθους μεγαλύτερου από 4 ή 6 εκ. καθώς και των όγκων με εξωθυρεοειδική επέκταση και τραχηλικές λεμφαδενικές μεταστάσεις⁶⁰. Σύμφωνα με την ίδια βάση δεδομένων, αξιοσημείωτη θεωρείται η αύξηση της επίπτωσης των καρκινωμάτων μεγέθους μικρότερου από 1 εκ. κατά 441%, ειδικότερα κατά 19.3% ανά έτος, στο χρονικό διάστημα 1983-2006. Εντούτοις, όγκοι μεγέθους 1.1–2 εκ., 2.1–5 εκ. και μεγαλύτερου από 5 εκ. παρουσίασαν επίσης αύξηση της επίπτωσης κατά 12.3%, 10.3% και 12%, ανά έτος, αντίστοιχα, στο ίδιο χρονικό διάστημα⁶¹. Πληθώρα επιδημιολογικών μελετών υποστηρίζει ότι η αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου θυρεοειδούς αντανακλά τη συνισταμένη της διάγνωσης της νόσου πριν την εμφάνιση κλινικών σημείων και συμπτωμάτων με την επίδραση πλειάδας περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου ανάπτυξης καρκινώματος θυρεοειδούς, γνωστών αλλά και άλλων, προς το παρόν, ανεξερεύνητων⁶².

1.1.2.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Η έκθεση στην ακτινοβολία αποτελεί τεκμηριωμένο παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του θυρεοειδούς⁵⁷, με κορύφωση του κινδύνου 30 έτη μετά την έκθεση⁶³. Εικάζεται ότι ο διπλασιασμός της δόσης της ακτινοβολίας στην οποία εκτέθηκε ο πληθυσμός των ΗΠΑ κατά το χρονικό διάστημα από το 1980 έως το 2006 λόγω της ευρύτερης εφαρμογής διαγνωστικών τεχνικών⁶⁴ ενέχεται στην αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς. Για παράδειγμα, η διενέργεια ολόενα αυξανόμενου αριθμού αξονικών τομογραφιών κατά την παιδική ηλικία έχει σχετιστεί με την ανάπτυξη 390 περιπτώσεων καρκίνου του θυρεοειδούς ανά 10⁶ ασθενών εκτεθέντων στην οφειλόμενη στην αξονική τομογραφία ακτινοβολία⁶⁵. Η εξωτερική ακτινοβολία αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του θυρεοειδούς κατά 7.7 φορές ανά Gray (Gy), ιδιαίτερα στα παιδιά με σχέση αντιστρόφως ανάλογη προς την ηλικία μέχρι την ηλικία των 15 ετών⁶⁶. Το εύρος της δόσης της ακτινοβολίας που σχετίζεται με ανάπτυξη καρκίνου θυρεοειδούς σε παιδιά που έχουν ακτινοβοληθεί στα πλαίσια της θεραπείας καλοήθων ή κακοήθων νοσημάτων εκτείνεται από 0.10 έως 60 Gy⁶⁷ με γραμμική σχέση δόσης-απόκρισης⁶⁶. Αύξηση κατά 15 έως 53 φορές του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του θυρεοειδούς στον πληθυσμό που έχει εκτεθεί σε ακτινοβολία σε σύγκριση με τον πληθυσμό που δεν έχει εκτεθεί παρατηρήθηκε στη μελέτη των Jereczek-Fossa και συνεργατών⁶⁸.

Ισχυρό επιχείρημα υπέρ της ογκογόνου επίδρασης της ακτινοβολίας στον θυρεοειδή αποτελεί η συσχέτιση του πυρηνικού ατυχήματος στο Chernobyl το 1986 με τη διάγνωση 4,000 νέων περιπτώσεων καρκίνου θυρεοειδούς στη Λευκορωσία, στη Ρωσία και στην Ουκρανία σε ασθενείς που ήταν παιδιά ή έφηβοι κατά το πυρηνικό ατύχημα⁶⁹. Λόγω της αυξημένης ευαισθησίας του θυρεοειδούς στην έκθεση στο ραδιενεργό ιώδιο κατά την παιδική και εφηβική ηλικία, εκτιμάται ότι ο θυρεοειδής των παιδιών και των εφήβων κατά το πυρηνικό ατύχημα προσέλαβε δόση ακτινοβολίας υψηλότερη κατά 500 έως 1000 φορές από το υπόλοιπο σώμα μετά την απελευθέρωση στην ατμόσφαιρα συνολικής δόσης 1.7.10¹⁸ Bq I¹³¹.⁵⁷. Ως συνέπεια, η επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς σε αυτό τον πληθυσμό εκτοξεύθηκε από 0.3/10⁶ πριν το ατύχημα (1981-1985) σε 4/10⁶ κατά το χρονικό διάστημα 1986-1990 και ανήλθε

περαιτέρω σε $30.6/10^6$ κατά το χρονικό διάστημα 1991-1994⁷⁰. Αύξηση του σχετικού κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου θυρεοειδούς κατά 5.25 ανά Gy στη Λευκορωσία, στη Ρωσία και στην Ουκρανία υπολογίστηκε βάσει του ελέγχου κατά το χρονικό διάστημα 1998-2000 32,385 ατόμων των οποίων η ηλικία ήταν μικρότερη από τα 18 έτη κατά το πυρηνικό ατύχημα. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε ότι διαγνώστηκαν στο προαναφερθέν χρονικό διάστημα 45 νέες περιπτώσεις καρκίνου θυρεοειδούς έναντι των 11.2 που εκτιμάται ότι θα είχαν διαγνωστεί εάν δεν είχε συμβεί το ατύχημα⁷¹.

TSH ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΙΩΔΙΟΥ

Ανάλυση 28 μελετών που περιλαμβάνουν 42,032 άτομα – ειδικότερα, 5,786 ασθενείς με καρκίνο θυρεοειδούς – αποκαλύπτει θετική συσχέτιση του καρκίνου του θυρεοειδούς με τα υψηλά, ακόμη και εντός του φυσιολογικού εύρους, επίπεδα της TSH⁷². Παρά το γεγονός ότι η TSH (Thyroid-stimulating hormone) αποτελεί τροφικό παράγοντα των θυρεοειδικών κυττάρων, η αιτιολογική συσχέτιση των υψηλών επιπέδων της TSH με τη γένεση του καρκίνου του θυρεοειδούς δεν έχει τεκμηριωθεί επαρκώς.

Επιχειρήματα που αποδυναμώνουν τον ρόλο της TSH στον καρκίνο θυρεοειδούς είναι η διαπίστωση της έκφρασης της μετάλλαξης του TSHR (thyroid stimulating hormone receptor) στη μειοψηφία των ασθενών με καρκίνο θυρεοειδούς⁷³, η συμβολή άλλων αυξητικών παραγόντων, όπως ο IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), στην αύξηση του όγκου^{74,75} και η συσχέτιση του mRNA του TSHR με ευνοϊκή πρόγνωση των όγκων⁷⁶. Επιπλέον, η παρουσία καρκίνου θυρεοειδούς στον ετερόπλευρο λοβό επί εδάφους υπερλειτουργικών όζων θυρεοειδούς που καταστέλλουν την TSH⁷⁷ καθιστά μάλλον απίθανη τη δράση της TSH ως αποκλειστικού παράγοντα καρκινογένεσης στον θυρεοειδή. Ωστόσο, το εύρημα αυτό υποδεικνύει την εν δυνάμει ογκογόνο επίδραση της συνεχούς διέγερσης του TSHR, ο οποίος εκφράζεται τόσο σε καλοήθεις όζους όσο και στο καλώς διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς. Εντούτοις, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η κατεσταλμένη TSH ως απόρροια υπερλειτουργικών όζων θυρεοειδούς προσδίδει στους όζους αυτούς μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου λόγω ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από την υπομονάδα $S\alpha$ της πρωτεΐνης G ($G_s\alpha$) οδού του cAMP και συνακόλουθου αποκλεισμού των ογκογόνων οδών MAPK (Mitogen activated protein kinase) και PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) που διαμεσολαβούνται από την $G_{\beta,\gamma}$ ⁷⁸. Ωστόσο, η προαναφερθείσα υπόθεση αδυνατεί να ερμηνεύσει τη διαστρωμάτωση του κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου του θυρεοειδούς που παρατηρείται μέσα στο εύρος της φυσιολογικών επιπέδων της TSH⁷⁹.

Υπέρ της συσχέτισης της πρόσληψης του ιωδίου με την ανάπτυξη θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς συνηγορεί η αύξηση του λόγου του θηλώδους καρκινώματος προς το θυλακιδώδες^{80,81} καθώς και η αύξηση της επίπτωσης του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς που φέρει μετάλλαξη BRAF μετά την εφαρμογή της παγκόσμιας στρατηγικής αύξησης της διατροφικής πρόσληψης του ιωδίου⁸².

ΘΥΛΗ ΦΥΛΟ

Ο δυνητικός ρόλος των οιστρογόνων στην ευόδωση του καρκίνου του θυρεοειδούς αντικατοπτρίζεται στη συσχέτιση της αύξησης του κινδύνου νόσησης με παράγοντες που αντιπροσωπεύουν το status των οιστρογόνων, όπως η ηλικία εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης, η λήψη αντισυλληπτικών⁸³ και η εκδήλωση της υπεροχής της επίπτωσης στο θήλυ φύλο μετά την έναρξη της εφηβείας⁸⁴. Στην αύξηση του μεγέθους των θηλωδών καρκινωμάτων μεγέθους μικρότερου από 1 εκ. που έχει παρατηρηθεί κατά την εγκυμοσύνη ενέχονται, πέραν των αυξημένων επιπέδων των οιστρογόνων, η ανεπάρκεια ιωδίου και η διέγερση του υποδοχέα της TSH από την hCG (human chorionic gonadotropin)⁸⁵⁻⁸⁷. Υπερέκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων – ER α (estrogen receptor α) και ER β (estrogen receptor

β)– έχει διαπιστωθεί τόσο στον φυσιολογικό θυρεοειδή αδένα όσο και στα νεοπλάσματα του θυρεοειδούς⁸⁸. Με έναυσμα τη σύνδεση τους στον πυρηνικό υποδοχέα τους (γενωμική δράση) ή μέσω υποδοχών συνδεδεμένων στη μεμβράνη (μη γενωμική δράση), τα οιστρογόνα ενεργοποιούν τις εν δυνάμει ογκογόνες οδούς σηματοδότησης MAPK και PI3K⁸⁸. Πέραν του ελέγχου της αύξησης και του πολλαπλασιασμού, τα οιστρογόνα εμπλέκονται στη ρύθμιση της αγγειογένεσης και του μεταστατικού δυναμικού, δρώντας συνεργιστικά με τεκμηριωμένες ογκογόνες γενετικές αλλαγές, όπως οι αναδιατάξεις RET/PTC και οι μεταλλάξεις BRAF και Ras⁸⁹.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Ο οικογενής καρκίνος του θυρεοειδούς αντιπροσωπεύει το 5% του συνόλου του καρκίνου του θυρεοειδούς. Ειδικότερα, ο κληρονομούμενος τύπος του μυελοειδούς απαρτίζει το 25% του συνόλου του μυελοειδούς¹⁰ και ο οικογενής μη μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς το 5–10% του συνόλου του διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς⁹.

Ο οικογενής μη μυελοειδής καρκίνος θυρεοειδούς εκδηλώνεται είτε ως μέρος ενός από τα σύνδρομα πολλαπλών νεοπλασιών – Cowden, Werner, Mc Cune Albright, FAP, Gardner – είτε ως διακριτή κλινική οντότητα, που αφορά τη διάγνωση σε 3 ή περισσότερα από 3 μέλη μιας οικογένειας με συγγένεια πρώτου βαθμού. Η εκδήλωση της νόσου μόνο σε δύο μέλη μιας οικογένειας με συγγένεια πρώτου βαθμού περικλείει πιθανότητα σποραδικής νόσου ίση με 62%⁹. Όσον αφορά την παθογένεια του οικογενούς μη μυελοειδούς καρκίνου θυρεοειδούς, έχουν περιγραφεί πολυάριθμοι γενετικοί τόποι (8p23, 1p22, 8q24, 1q21, 6q22), αλλά το γενετικό υπόβαθρο της νόσου δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί⁹⁰.

ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Ασαφή είναι τα αποτελέσματα μελετών συσχέτισης ποικίλων διατροφικών παραγόντων, όπως η κατανάλωση θαλασσιών σε περιοχές με επάρκεια ιωδίου, με τον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου θυρεοειδούς. Εγγενείς αδυναμίες των μελετών αυτών αποτελούν η αναδρομική φύση τους, οι διαφορές στο πρότυπο διατροφής όσον αφορά την ποσότητα και τη συχνότητα της κατανάλωσης, η τροποποίηση του προτύπου διατροφής κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, η περιεκτικότητα άγνωστων, μη μετρήσιμων συστατικών σε τρόφιμα και ποτά, η έκθεση σε συγχυτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και η επίδραση του φύλου^{91,92}.

ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Πληθώρα επιδημιολογικών δεδομένων αναδεικνύουν τη θετική συσχέτιση της παχυσαρκίας με το διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς⁹³⁻⁹⁵. Ως ενορρηστρωτής της συσχέτισης αυτής προτείνεται η συνομιλία των θυρεοειδικών ορμονών με τον λιπώδη ιστό, η οποία ολοκληρώνεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), ρυθμίζοντας το ενεργειακό ισοζύγιο⁹⁶. Πρόσφατα, η μετα-ανάλυση των Renehan και συνεργατών έδειξε ότι αύξηση του BMI κατά 5 kg/m² σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου του θυρεοειδούς και στα δύο φύλα⁹⁷.

Η διαλεύκανση του παθοφυσιολογικού υπόβαθρου της συμβολής της παχυσαρκίας στην ανάπτυξη καρκίνου του θυρεοειδούς επικεντρώνεται στον ρόλο της αύξησης των επιπέδων της TSH⁹⁶, της υπερινσουλιναϊμίας⁹⁸⁻¹⁰⁰, της αύξησης της οιστραδιόλης¹⁰¹⁻¹⁰³ καθώς και της επαγόμενης από την λεπτίνη ενεργοποίησης ογκογόνων σηματοδοτικών οδών, όπως των διαμεσολαβούμενων από τις κινάσες JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription)¹⁰⁴ και PI3K/Akt¹⁰⁵, τον

μεταγραφικό παράγοντα NFκB (Nuclear factor κB) και τον αυξητικό παράγοντα VEGF (Vascular endothelial growth factor)¹⁰⁶. Επίσης, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην υποξία, το φλεγμονώδες *milieu* και το οξειδωτικό *stress* ενέχεται τόσο στην παχυσαρκία όσο και στη γένεση του διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς¹⁰⁷.

ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αναδεικνύει περισσότερους από 150 ενδοκρινικούς διαταράκτες με επίδραση στη θυρεοειδική λειτουργία και επακόλουθη μείωση των θυρεοειδικών ορμονών. *In vitro* και *in vivo* πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν δυνητικούς μηχανισμούς δράσης των ενδοκρινικών διαταρακτών, ορισμένοι εκ των οποίων επιβεβαιώνονται σε κλινικές μελέτες. Τα νιτρικά, νιτρώδη, υπερχλωρικά και θειοκυανικά ανιόντα, οι ισοφλαβόνες, τα πολυβρωμιωμένα διφαινύλια (PBBS:Polybrominated biphenyls), τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBS:polychlorinated biphenyls) και τα παρασιτοκτόνα στοχεύουν τον συμμεταφορέα νατρίου ιωδίου (NIS:sodium iodide symporter), τη θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO: thyroïd peroxidase), τα ηπατικά ένζυμα γλυκουρονιδίωσης και τους υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών¹⁰⁸. Περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για τη διαλεύκανση της συμβολής τους στην ογκογένεση.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΗΦΑΙΣΤΕΙΟΥ

Η αυξημένη επίπτωση του καρκίνου του θυρεοειδούς σε ηφαιστειογενείς περιοχές, όπως η Ισλανδία, η Χαβάη, η Σικελία, η Γαλλική Πολυνησία, και η απουσία επιβεβαίωσης του ευρήματος αυτού σε πληθυσμούς των αντίστοιχων εθνικοτήτων που ζουν σε μη ηφαιστειογενείς περιοχές υποδηλώνουν ότι η ηφαιστειακή δραστηριότητα ενέχεται στην ογκογένεση. Πολυάριθμες μελέτες δείχνουν ότι στοιχεία, μέταλλα και χημικές ουσίες που πηγάζουν από τις γεωλογικές διεργασίες αποτελούν δυνητικά τοξικές ουσίες, οι οποίες μολύνουν τη γη, το νερό και την τροφική αλυσίδα¹⁰⁹.

ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΤΙΔΑ HASHIMOTO: ΔΥΝΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΚΔΗΛΩΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ;

Μολονότι το φλεγμονώδες *milieu* θεωρείται αναπόσπαστο στοιχείο του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου¹¹⁰, η αιτιολογική συσχέτιση του καρκίνου του θυρεοειδούς με τη φλεγμονή δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Προσεγγίζεται υπό το πρίσμα δύο διακριτών αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενων σηματοδοτικών οδών: της “εξωγενούς” όπου η φλεγμονή πυροδοτεί την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου μέσω πληθώρας φλεγμονωδών παραγόντων και της “ενδογενούς” με κινητήρια δύναμη ένα φλεγμονώδες μεταγραφικό πρόγραμμα ευοδωτικό στον όγκο επαγόμενο από τα καρκινικά κύτταρα ως συνέπεια των ογκογόνων μεταλλάξεων¹¹¹. Εξαιρετικό πρότυπο μελέτης του φαύλου κύκλου που συνδέει την εξωγενή με την ενδογενή οδό θεωρείται η συνύπαρξη του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς με τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto.

Παρά το γεγονός ότι έχουν παρέλθει έξι δεκαετίες από την πρώτη περιγραφή της συσχέτισης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς από τους Dailley και συνεργάτες¹¹², το εύρημα αυτό παραμένει αντικείμενο διχογνωμίας καθώς δεν επιβεβαιώνεται στο σύνολο των μελετών¹¹³. Επιπλέον, αξιοσημείωτο εύρος χαρακτηρίζει τη συχνότητα της συνύπαρξης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto σε ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς: 0.5–38%¹¹³.

Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto αναγνωρίζεται ως προγνωστικός παράγοντας για την εκδήλωση θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς¹¹⁴⁻¹¹⁶. Πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε σχετικό κίνδυνο εκδήλωσης θυρεοειδίτιδας Hashimoto μεταξύ των ασθενών με θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς ίσο με 2.36 και σχετικό κίνδυνο εκδήλωσης θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς μεταξύ των ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto ίσο με 1.40¹¹⁷.

Γενετικές και μοριακές αλλαγές προσελκύουν το ενδιαφέρον ως το δυνητικό έναυσμα τόσο της ογκογένεσης όσο και της φλεγμονής, όπως οι γενετικοί ανασυνδυασμοί RET/PTC, η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών που διαμεσολαβούνται από τις πρωτεΐνες PI3K/Akt, Ras, ERK (extracellular regulated MAP kinase) και οι ογκογόνες μεταβολές των αρχέγονων πολυδύναμων εμβρυϊκών κύτταρων, κατάλοιπων στον θυρεοειδή, που εκφράζουν την πρωτεΐνη p63¹¹⁸⁻¹²⁵.

Από την άλλη πλευρά, η συσχέτιση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αποδείχθηκε σημαντική στις μελέτες που περιλαμβάνουν υλικό προερχόμενο από θυρεοειδεκτομές, γεγονός που ίσως αντανάκλα την *a priori* συχνότερη ανεύρεση καρκίνου θυρεοειδούς σε θυρεοειδεκτομή συγκριτικά με την FNAB¹²⁶⁻¹³⁰.

Πρόσφατα, το ενδιαφέρον εστιάστηκε στον αμφίσημο ρόλο της θυρεοειδίτιδας Hashimoto στην έκβαση του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς όταν οι δύο κλινικές οντότητες συνυπάρχουν¹³¹⁻¹³⁸ καθώς και στη προγνωστική σημασία των αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων^{139,140}. Από διαφορετική γωνία φωτίζει τη συσχέτιση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς η διαπίστωση των Fiore και συνεργατών ότι η υπερεπάρκεια ιωδίου ενδέχεται να πυροδοτεί μηχανισμούς αυτοανοσίας σε άτομα με γενετική προδιάθεση αποκαλύπτοντας κρυφούς επίτοπους της θυρεοσφαιρίνης (Tg: Thyroglobulin) με επακόλουθο την αύξηση της TSH η οποία πιθανότατα ενέχεται *per se* στην καρκινογένεση¹⁴¹.

Σε συνολική θεώρηση του θέματος, διαφαίνεται ότι τα μέχρι σήμερα δεδομένα δεν επαρκούν για να εδραιωθεί μία αιτιοπαθογενετική θεώρηση της συσχέτισης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Η διαπίστωση αυτή, όμως, δεν υποβαθμίζει τη σπουδαιότητα της συνέχισης της έρευνας με αντικείμενο το μοριακό υπόβαθρο της συνύπαρξης των δύο κλινικών οντοτήτων. Επίσης, επιβάλλεται επαγρύπνηση σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, με στόχο την έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση ενδεχόμενου καρκίνου.

1.1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Η συνηθέστερη κλινική εκδήλωση του καρκίνου του θυρεοειδούς είναι η πρόσφατη ανακάλυψη ενός όζου θυρεοειδούς ή η αύξηση του μεγέθους ενός προϋπάρχοντος όζου. Ωστόσο, τα συμπτώματα αυτά δεν είναι παθολογικά, καθώς στην πλειοψηφία των ασθενών, στο 95% του συνόλου, αναδεικνύουν καλοήγη νόσο. Από την άλλη μεριά, η απουσία συμπτωμάτων που προεξάρχει στους όζους θυρεοειδούς δεν επιτρέπει εφησυχασμό, δεδομένου ότι στο 5–10% αυτών υποκρύπτεται καρκίνος^{142,143}.

Η συχνότητα των ψηλαφητών όζων θυρεοειδούς υπολογίζεται ίση με 4–7% στον γενικό πληθυσμό, με υπεροχή στο θήλυ φύλο και αύξηση του επιπολασμού προϊούσης της ηλικίας, με αποτέλεσμα ψηλαφητοί όζοι να ανευρίσκονται στο 50% των ασθενών ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών^{144,145}. Η ευρεία χρήση εξελιγμένων διαγνωστικών τεχνικών, κυρίως του υπερηχογραφήματος, φέρνει στο προσκήνιο ολοένα αυξανόμενο αριθμό “τυχαιωμάτων” θυρεοειδούς, που αποτελούν όζους θυρεοειδούς οι οποίοι αποκαλύπτονται ως τυχαίο εύρημα σε απεικονιστικό έλεγχο κατά τη διερεύνηση παθολογικών καταστάσεων που δε σχετίζονται με νοσήματα του θυρεοειδούς. Το ποσοστό ανεύρεσης “τυχαιωμάτων” θυρεοειδούς σε υπερηχογραφικό έλεγχο ανέρχεται στο 67%, ενώ τα ποσοστά ανεύρεσης

“τυχαιωμάτων” σε αξονική (CT: computed tomography) ή μαγνητική τομογραφία (MRI: magnetic resonance imaging) και τομογραφία με εκπομπή ποζιτρονίων (PET: positron-emission tomography) εκτιμώνται 15% και 1-2%, αντίστοιχα¹⁴⁶.

Υπογραμμίζεται ότι η υψηλότερη επίπτωση κακοηθούς νόσου που περικλείεται σε έναν μονήρη όζο σε σύγκριση με έναν όζο επί εδάφους πολυοζώδους βρογχοκήλης –2.7–30% έναντι 1.4–10%, αντίστοιχα– δεν υποβαθμίζει την αναγκαιότητα επαγρύπνησης σε περίπτωση πολυοζώδους βρογχοκήλης, καθώς η άθροιση του κινδύνου των επιμέρους όζων οδηγεί σε συνολικό κίνδυνο που προσεγγίζει τον αντίστοιχο του μονήρους όζου^{147,148}.

Διαφαίνεται ότι αποτελεί επιτακτική ανάγκη η διαφορική διάγνωση ανάμεσα στη μειοψηφία των κακοηθών όζων και στους όζους που στερούνται κλινικής σημασίας. Προς την επίτευξη του στόχου αυτού, η διαγνωστική προσέγγιση των όζων θυρεοειδούς, το πρώτο και καθοριστικό βήμα για τον σχεδιασμό της θεραπευτικής παρέμβασης, συντίθεται από τις πληροφορίες που αποκομίζονται από τη λήψη του ιστορικού, την κλινική εξέταση και τον εργαστηριακό έλεγχο.

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η ενδελεχής λήψη του ιστορικού επικεντρώνεται στην αναζήτηση πληροφοριών που υποδηλώνουν αυξημένη πιθανότητα καρκίνου, όπως η ακτινοβόληση κεφαλής και τραχήλου στην παιδική ηλικία, η ολόσωμη ακτινοβόληση για μεταμόσχευση μυελού των οστών, η έκθεση σε πυρηνικό ατύχημα, το οικογενειακό ή ατομικό ιστορικό καρκίνου θυρεοειδούς και η παρουσία συνδρόμου που περικλείει καρκίνο θυρεοειδούς. Σκληρή σύσταση του όζου, μέγεθος όζου μεγαλύτερο από 4 εκ., όζος καθηλωμένος στις παρακείμενες δομές, παράλυση φωνητικών χορδών και τραχηλική λεμφαδενοπάθεια, αποτελούν κλινικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την παρουσία καρκίνου^{149,150}. Άμεση αντιμετώπιση επιβάλλεται σε ανεξήγητο βράγχος φωνής, όζο που εκδηλώνεται σε παιδί, τραχηλική λεμφαδενική διόγκωση, ταχεία αύξηση ανώδυνης μάζας σε χρονικό διάστημα εβδομάδων. Αμεσότητα παρέμβαση επιτάσσει η εκδήλωση συριγμού που σχετίζεται με θυρεοειδική μάζα¹⁵⁰.

ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΗΜΑ

Απαραίτητη είναι η διενέργεια υπερηχογραφικού ελέγχου σε όλους ανεξαιρέτως τους όζους, είτε ανευρίσκονται τυχαία μέσω άλλων απεικονιστικών μεθόδων είτε αναδεικνύονται λόγω της παρουσίας συμπτωμάτων. Δυστυχώς, κανένα από τα υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά των όζων δεν διαθέτει *per se* επαρκή διαγνωστική αξία. Επισημαίνεται ότι οι μικροαποτιτανώσεις, τα μη ομαλά όρια και η παρουσία προσθιοπίσθιας διαμέτρου μεγαλύτερης από την εγκάρσια συνιστούν τα χαρακτηριστικά που εμφανίζουν την υψηλότερη ειδικότητα, αλλά πολύ χαμηλή ευαισθησία όσον αφορά τη διάγνωση καρκίνου. Πολύτιμη στην κλινική πράξη αποδεικνύεται η αξιολόγηση του συνδυασμού των υπερηχογραφικών ευρημάτων⁹.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Σε όλους τους ασθενείς με όζους απαιτείται εκτίμηση της θυρεοειδικής λειτουργίας. Επί ευρέσεως κατεσταλμένης TSH, πρέπει να διενεργείται σπινθηρογραφικός έλεγχος –κατά προτίμηση με I¹²³– με σκοπό τη διαφορική διάγνωση μεταξύ μονήρους τοξικού όζου, τοξικής πολυοζώδους βρογχοκήλης και νόσου Graves. Όσον αφορά τη διενέργεια FNAB σε υπερλειτουργικό όζο, απαιτείται εξατομίκευση¹⁵¹ καθώς ο κίνδυνος παρουσίας καρκίνου κυμαίνεται από 0% έως 12%¹⁵².

ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (anti-TPO και anti-Tg) CEA ΚΑΙ Ct ΟΡΟΥ

Μέτρηση αυτοαντισωμάτων συστήνεται σε υποψία συνύπαρξης αυτοάνοσου νοσήματος, καθώς λέμφωμα θυρεοειδούς αναπτύσσεται σχεδόν αποκλειστικά επί εδάφους θυρεοειδίτιδας Hashimoto. Αναφορικά με τη μέτρηση των επιπέδων CEA και Ct ορού απαιτείται εξατομίκευση καθώς οι κατευθυντήριες οδηγίες της American Thyroid Association (ATA) δεν γνωμοδοτούν ούτε υπέρ ούτε κατά του προσδιορισμού αυτού στα πλαίσια προσυμπτωματικού ελέγχου λόγω ανεπαρκών δεδομένων.

MRI / CT/ PET

Η διενέργεια MRI ή/και CT σπάνια ενδείκνυται κατά την αρχική προσέγγιση. Εξαιρέση αποτελεί η αναγκαιότητα αξιολόγησης της πίεσης παρακείμενων δομών από μεγάλη οπισθοστερική βρογχοκήλη.

Παρά την απουσία σημαντικής διαφοράς στην SUV (standardized uptake value) max μεταξύ καλοθών και κακοθών βλαβών του θυρεοειδούς, η θετική προγνωστική αξία (41%) και η υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (95-100%) της τομογραφίας με εκπομπή ποζιτρονίων (PET) ίσως συμβάλλουν στη διερεύνηση βλαβών με κυτταρολογική εξέταση “ακαθόριστη”, αν και η υπόθεση αυτή δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς¹⁵³.

FNAB

Κατά την ανατολή της δεκαετίας του 1980 εισήχθη στην κλινική πράξη η βιοψία δια λεπτής βελόνης (FNAB), ο “χρυσός κανόνας” στη διερεύνηση των όζων θυρεοειδούς¹⁵⁴. Πρόκειται για ασφαλή, ακριβή, ταχεία και ελάχιστα επεμβατική μέθοδο της οποίας το όφελος δικαιολογεί το κόστος¹⁵⁵⁻¹⁵⁹. Η καθοδηγούμενη από υπερηχογραφικό έλεγχο FNAB υπερτερεί της καθοδηγούμενης από ψηλάφηση, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια^{158,160}. Η επιβεβαίωση παρουσίας κακοηθούς νόσου σε έναν όζο μέσω της κυτταρολογικής εξέτασης ωθεί στην άμεση χειρουργική αντιμετώπιση, με αποτέλεσμα το ποσοστό ανεύρεσης καρκίνου στους εξαιρεθέντες όζους να εκτοξευθεί από το 14% πριν από την καθιέρωση της FNAB¹⁶¹ στο 50%, μετά την ευρεία εφαρμογή αυτής στην κλινική πράξη¹⁶². Η κατάταξη των ευρημάτων σε έξι διαγνωστικές κατηγορίες, που θεσπίστηκε από το NCI (National Cancer Institute) το 2007 στη Bethesda της πολιτείας Maryland των ΗΠΑ, εμπλούτισε τη διαγνωστική φαρέτρα με έναν παγκοσμίως αποδεκτό αλγόριθμο, ο οποίος αναθεωρήθηκε πρόσφατα^{163,164}.

Οι Bagga και συνεργάτες παραθέτουν τα εξής ποσοστά ευαισθησίας, ειδικότητας, ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων της FNAB σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία: 65–98%, 72–100%, 0–9% 2–7%, αντίστοιχα, τα οποία συνάδουν με τα ποσοστά που αναδείχθηκαν από τη δική τους μελέτη: 66%, 100%, 0%, 4%, αντίστοιχα. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου ανέρχεται στο 96.2%, ενώ το δείγμα αποδείχθηκε ανεπαρκές στο 1.6% των περιπτώσεων, ποσοστό που επιβεβαιώνει το αντίστοιχο ποσοστό που αναφέρεται στη σύγχρονη βιβλιογραφία (1–5%)¹⁶⁵.

Η συμβολή της εμπειρίας κατά τη λήψη και τη μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων αποτελεί σημαντικό παράγοντα της διαγνωστικής ακρίβειας της μεθόδου¹⁶⁶. Σε περίπτωση μη διαγνωστικού αποτελέσματος η επανάληψη οδηγεί σε αύξηση της ακρίβειας, της διαγνωστικής ευαισθησίας και της ειδικότητας κατά 22.6%, 13.8% και 6.2% αντίστοιχα καθώς και μείωση των ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων κατά 14.2%¹⁶⁷.

Σημαντική διαφαίνεται η συμβολή της FNA Core Biopsy που παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία¹⁶⁸ και μείωση των μη διαγνωστικών αποτελεσμάτων¹⁶⁹ συγκριτικά με την FNAB. Μολονότι αναφέρεται ότι η ειδικότητα και η θετική προγνωστική αξία της μεθόδου προσεγγίζουν το 100%¹⁷⁰, η εφαρμογή της δεν έχει προς το παρόν εδραιωθεί στην κλινική πράξη¹⁷¹.

Πεδίο εξελισσόμενης έρευνας αποτελεί η επίλυση των διαγνωστικών διλημάτων που αναδύονται κατά την αξιολόγηση της FNAB.

1.1.4. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΟΖΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Όσον αφορά τα “τυχαιώματα” θυρεοειδούς, θεμελιώδη αρχή στον σχεδιασμό της περαιτέρω προσέγγισης αποτελεί η ενιαία περιγραφή των υπερηχογραφικών ευρημάτων, η κατάταξη των οποίων σε διακριτές κατηγορίες σύμφωνα με την πιθανότητα παρουσίας καρκίνου ώθησε στη δημιουργία ενός περιγραφικού λεξικού γνωματεύσεων –TIRADS (Thyroid Imaging Reporting and Data System)– με ποικίλες εκδόσεις. Διακρίνεται η έκδοση που προτάθηκε από τον Russ το 2013, η οποία παρουσιάζει ευαισθησία 95% και ειδικότητα 68%¹⁴⁶. Η αξιολόγηση της κατηγορίας TIRADS σε συνδυασμό με το μέγεθος του όζου και το ιστορικό –ατομικό και οικογενειακό– κατευθύνει τη διαγνωστική προσέγγιση προς τη διενέργεια FNAB ή την παρακολούθηση της εξέλιξης των όζων με περιοδικό υπερηχογραφικό έλεγχο στο πρώτο έτος και, κατόπιν, μετά από δύο ή τρία έτη.

Σύμφωνα με τις νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες της ATA, η αξιολόγηση των επιμέρους συνδυασμών των υπερηχογραφικών χαρακτηριστικών των όζων κατατάσσει τους όζους σε τέσσερις ομάδες με κριτήριο τον βαθμό της υποψίας παρουσίας καρκίνου, δηλαδή “ισχυρή”, “ενδιάμεση”, “χαμηλή” και “πολύ χαμηλή” υποψία, ενώ η πέμπτη ομάδα περιλαμβάνει όζους που θεωρούνται καλοήθεις. Σε καθεμία από τις ομάδες καθορίζεται το κατώτατο μέγεθος του όζου πάνω από το οποίο συνιστάται η διενέργεια FNAB. Ωστόσο, η παρουσία κλινικών παραγόντων κινδύνου, η ανάδειξη τραχηλικών λεμφαδένων με υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά συμβατά με μεταστατική διήθηση από όγκο θυρεοειδούς καθώς και το ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό που εγείρει υποψία καρκίνου επιβάλλουν τη διενέργεια FNAB ανεξαρτήτως του μεγέθους του όζου⁹.

1.1.5. ΑΝΤΙΓΝΩΜΙΕΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Η χειρουργική προσέγγιση αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπευτικής του διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς. Ωστόσο, κατά τον σχεδιασμό της στρατηγικής της αντιμετώπισης της νόσου εγείρονται αντιπαραθέσεις οι οποίες επιτάσσουν εξατομίκευση σε πολλαπλά επίπεδα: στη σταδιοποίηση της νόσου, στην έκταση της χειρουργικής επέμβασης, στη χορήγηση RAI, στην καταστολή της TSH και στη διενέργεια προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού.

1.1.5.1. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Ο σχεδιασμός της βέλτιστης θεραπευτικής παρέμβασης στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς επιβάλλει, ως *conditio sine que non*, τη σταδιοποίηση της νόσου. Συγκεκριμένα είναι τα αποτελέσματα των μελετών αξιολόγησης των δυναμικών προγνωστικών παραγόντων, γεγονός που αποτυπώνεται στην παρουσία 17, τουλάχιστον, συστημάτων σταδιοποίησης, εκ των οποίων τα 8 αφορούν αποκλειστικά το θηλώδες, ενώ τα υπόλοιπα 9 περικλείουν το διαφοροποιημένο, το μυελοειδές και το αναπλαστικό καρκίνωμα¹⁷².

Ως “χρυσός κανόνας” στη σταδιοποίηση της πλειοψηφίας των όγκων θεωρείται το προτεινόμενο από το AJCC σύστημα σταδιοποίησης, που βασίζεται σε 3 παράγοντες: την ανατομική έκταση του πρωταρχικού όγκου (T: Tumor), τη λεμφαδενική συμμετοχή (N: nodes) και την παρουσία μεταστάσεων (M: metastasis). Η κριτική που επιδέχθηκε βάσει πληθώρας επιδημιολογικών δεδομένων η έβδομη έκδοση (7^η) του συστήματος TNM στον καρκίνο του θυρεοειδούς, οδήγησε στην αναθεώρηση ορισμένων κομβικών σημείων. Τον Οκτώβριο του 2016 δημοσιεύθηκε από το AJCC η όγδοη (8^η) έκδοση του συστήματος TNM, ενώ ως επίσημη ημερομηνία εφαρμογής της ορίστηκε η 1η Ιανουαρίου του 2018^{173, 174}.

Η όγδοη έκδοση AJCC/TNM διαφοροποιείται από την έβδομη έκδοση στα εξής: Πρώτον, η ηλικία των 55 ετών θεσπίστηκε ως όριο βάσει του οποίου ταξινομούνται οι ασθενείς σε δύο διακριτές ομάδες που διαφέρουν σημαντικά ως προς τη σταδιοποίηση της νόσου, σε αντικατάσταση του ορίου που ίσχυε στην έβδομη έκδοση (ηλικία των 45 ετών). Δεύτερον, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων συντελεί στην ταξινόμηση της νόσου ως σταδίου II στους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας, και όχι σταδίου III, όπως ίσχυε στην έβδομη έκδοση. Τρίτον, η νόσος σταδίου T3 διακρίνεται σε δύο νέα στάδια: T3a (όγκοι μεγέθους μεγαλύτερου από 4 εκ. περιορισμένοι στον θυρεοειδή) και T3b (όγκοι οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση που αφορά στους μύς). Τέταρτον, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο λεμφαδενικό διαμέρισμα VII χαρακτηρίζεται ως διήθηση κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος (N1b), αναθεωρώντας την ταξινόμηση της ως διήθησης πλαγίου διαμερίσματος βάσει της έβδομης έκδοσης. Τέλος, η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων κατατάσσει τη νόσο σταδίου IV στην υποκατηγορία IVB, καταργώντας την υποκατηγορία IVC που ίσχυε στην έβδομη έκδοση.

Αντικείμενο εξελισσόμενης έρευνας αποτελεί η θεώρηση της ηλικίας ως *continuum*¹⁷⁵⁻¹⁷⁸ και ο ρόλος του άρρενος φύλου ως προγνωστικού παράγοντα δυσμενούς έκβασης της νόσου¹⁷⁹.

Μειονέκτημα των ισχυόντων συστημάτων σταδιοποίησης που επικεντρώνονται στην επιβίωση αποτελεί η αδυναμία πρόβλεψης της υποτροπής της νόσου. Ολοένα περισσότερο έδαφος κερδίζουν νέα συστήματα ταξινόμησης βάσει της κατάταξης των ασθενών σε επιμέρους ομάδες με κριτήριο τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου¹⁸⁰⁻¹⁸³.

Η δυναμική σταδιοποίηση της νόσου υποδεικνύει την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής βάσει της απόκρισης της νόσου στη θεραπεία, γεγονός που περικλείει την πιθανότητα τροποποίησης του αρχικού κινδύνου και εκ νέου σχεδιασμού της θεραπευτικής στρατηγικής και της επιτήρησης της νόσου. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στη μέτρηση των επιπέδων της Tg υπό καταστολή και υπό διέγερση μέσω διακοπής της θυροξίνης ή χορήγησης rhTSH (recombinant TSH) καθώς και στον απεικονιστικό έλεγχο, συμπεριλαμβανομένου του υπερηχογραφικού ελέγχου⁹.

Στους πίνακες που ακολουθούν περιγράφονται η έβδομη (Πίνακας 1.1) και η όγδοη (Πίνακας 1.2) έκδοση του συστήματος σταδιοποίησης AJCC/TNM.

Πίνακας 1.1. Έβδομη (7^η) έκδοση του συστήματος σταδιοποίησης AJCC/TNM.

**Πρωτοπαθής
όγκος**

<i>T0</i>	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
<i>TX</i>	Δεν είναι εφικτή η αξιολόγηση του πρωτοπαθούς όγκου
<i>T1</i>	Όγκος μεγέθους ≤ 2 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T1a</i>	Όγκος μεγέθους < 1 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T1b</i>	Όγκος μεγέθους > 1 εκ. αλλά ≤ 2 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T2</i>	Όγκος μεγέθους > 2 εκ. αλλά ≤ 4 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T3</i>	Όγκος μεγέθους > 4 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή ή όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση
<i>T4</i>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση στις μείζονες δομές του τραχήλου
<i>T4a</i>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση που διηθεί τους υποδόριους μαλακούς ιστούς, τον λάρυγγα, την τραχεία, τον οισοφάγο, το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο
<i>T4b</i>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση που διηθεί την προσπονδυλική περιτονία ή περιβρογχίζει την καρωτίδα ή τα αγγεία του μεσοθωρακίου

**Περιοχικοί
λεμφαδένες**

<i>NX</i>	Δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του status των λεμφαδένων
<i>N0</i>	Απουσία περιοχικών λεμφαδενικών μεταστάσεων
<i>N1</i>	Παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων
<i>N1a</i>	Μεταστάσεις στο λεμφαδενικό διαμέρισμα VI
<i>N1b</i>	Μεταστάσεις στα πλάγια λεμφαδενικά διαμερίσματα (I, II, III, IV, V) στους οπισθοφαρυγγικούς λεμφαδένες ή στους λεμφαδένες του άνω μεσοθωρακίου (επίπεδο VII)

**Απομακρυσμένες
μεταστάσεις**

M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Ηλικία < 45 έτη

ΣΤΑΔΙΟ	T	N	M
I	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M0
II	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Ηλικία ≥ 45 έτη

ΣΤΑΔΙΟ	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1 ή T2 ή T3	N1a	M0
IVA	T4a	Οποιοδήποτε N	M0
	T 1 ή 2 ή 3	N1b	M0
IVB	T4b	Οποιοδήποτε N	M0
IVC	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πηγή: Bychkov, A. AJCC/TNMstaging. PathologyOutlines.com website.
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidstaging.html>. Accessed April 19th, 2018.

Πίνακας 1.2. Όγδοη (8)^η έκδοση του συστήματος AJCC/TNM.

**Πρωτοπαθής
όγκος**

<i>T0</i>	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
<i>TX</i>	Δεν είναι εφικτή η αξιολόγηση του πρωτοπαθούς όγκου
<i>T1</i>	Όγκος μεγέθους ≤ 2 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T1a</i>	Όγκος μεγέθους < 1 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T1b</i>	Όγκος μεγέθους > 1 εκ. αλλά ≤ 2 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T2</i>	Όγκος μεγέθους > 2 εκ. αλλά ≤ 4 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T3a</i>	Όγκος μεγέθους > 4 εκ. στη μέγιστη διάμετρο περιορισμένος στον θυρεοειδή
<i>T3b</i>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση που αφορά μόνο στους μύς
<i>T4</i>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση στις μείζονες δομές του τραχήλου
<i>T4a</i>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση που διηθεί τους υποδόριους μαλακούς ιστούς, τον λάρυγγα, την τραχεία, τον οισοφάγο, το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο
<i>T4b</i>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με εκτεταμένη εξωθυρεοειδική επέκταση που διηθεί την προσπονδυλική περιτονία ή περιβρογχίζει την καρωτίδα ή τα αγγεία του μεσοθωρακίου

**Περιοχικοί
λεμφαδένες**

<i>NX</i>	Δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του status των λεμφαδένων
<i>N0</i>	Δεν υπάρχουν ενδείξεις λεμφαδενικών μεταστάσεων
<i>N0a</i>	Κυτταρολογική ή ιστολογική επιβεβαίωση απουσίας μεταστάσεων σε 1 ή > 1 λεμφαδένες
<i>N0b</i>	Απουσία κλινικών ή ακτινολογικών ενδείξεων λεμφαδενικών μεταστάσεων
<i>N1a</i>	Μεταστάσεις στο λεμφαδενικό διαμέρισμα VI ή VII μονόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα
<i>N1b</i>	Μεταστάσεις στους λεμφαδένες των πλάγιων διαμερισμάτων μονόπλευρα, ετερόπλευρα ή συστοίχως ή μεταστάσεις στους οπισθοφαρυγγικούς λεμφαδένες

**Απομακρυσμένες
μεταστάσεις**

M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

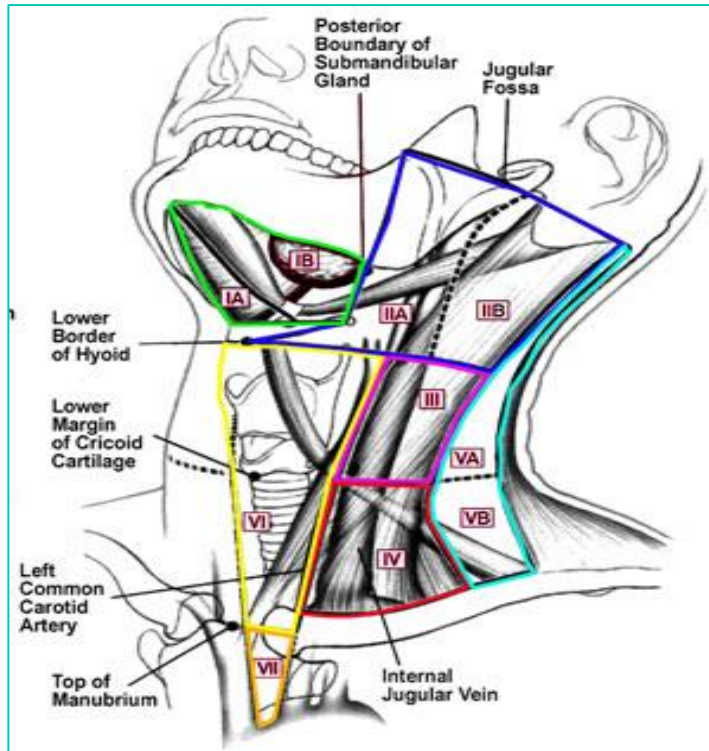
Ηλικία < 55 έτη

Στάδιο	T	N	M
<i>I</i>	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M0
<i>II</i>	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Ηλικία ≥ 55 έτη

Στάδιο	T	N	M
<i>I</i>	T1	N0/NX	M0
	T2	N0/NX	M0
<i>II</i>	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3a / T3b	Οποιοδήποτε N	M0
<i>III</i>	T4a	Οποιοδήποτε N	M0
<i>IVA</i>	T4b	Οποιοδήποτε N	M0
<i>IVB</i>	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πηγή: Bychkov, A. AJCC/TNM staging. PathologyOutlines.com website.
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidstaging.html>. Accessed April 19th, 2018.



Εικόνα 1.5 Λεμφαδενικά τραχηλικά διαμερίσματα Πηγή: Bychkov, A. AJCC/TNM staging. PathologyOutlines.comwebsite. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidstaging.html>. Accessed April 19th, 2018.

1.1.5.2. ΟΛΙΚΗ ΘΥΡΕΟΙΔΕΚΤΟΜΗ Ή ΛΟΒΕΚΤΟΜΗ;

Η χειρουργική αφαίρεση του θυρεοειδούς αποτελεί ορόσημο της Θεραπευτικής του διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς, αν και η έκταση της θυρεοειδεκτομής παραμένει αντικείμενο διαμάχης μεταξύ των ερευνητών. Η ολική θυρεοειδεκτομή, η σχεδόν ολική θυρεοειδεκτομή –χειρουργική επέμβαση με θυρεοειδικό υπόλειμμα μικρότερο από 1 gr–και η λοβεκτομή συνιστούν ευρέως αποδεκτές χειρουργικές επεμβάσεις βάσει όλων των κατευθυντήριων οδηγιών.

Σύμφωνα με τις νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες της ATA, προς ολική ή σχεδόν ολική θυρεοειδεκτομή, επί απουσίας αντενδείξεων χειρουργικής επέμβασης, κατευθύνει τη χειρουργική στρατηγική η παρουσία όγκου μεγέθους μεγαλύτερου από 4 εκ. ή εκτεταμένης εξωθυρεοειδικής επέκτασης (στάδιο T4) ή έκδηλων λεμφαδενικών μεταστάσεων (στάδιο N1) ή απομακρυσμένων μεταστάσεων (στάδιο M1)⁹. Σε παρουσία όγκων μεγέθους μικρότερου από 1 εκ., ενδοθυρεοειδικών, μονοεστιακών, με απουσία κλινικά έκδηλης μεταστατικής νόσου, ιστορικού ακτινοβολήσης ή οικογενούς καρκίνου θυρεοειδούς συστήνεται διενέργεια λοβεκτομής⁹. Όγκοι μεγέθους 1–4 εκ. χωρίς εξωθυρεοειδική επέκταση ή κλινικά έκδηλη παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ενδέχεται να αντιμετωπιστούν επαρκώς με λοβεκτομή, υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις αφαίρεσης του ετερόπλευρου λοβού⁹. Εντούτοις, η εξατομίκευση της χειρουργικής προσέγγισης η οποία συστήνεται σε ασθενείς με νόσο χαμηλού κινδύνου εγείρει αντιπαραθέσεις.

Οι υπέρμαχοι της διενέργειας ολικής θυρεοειδεκτομής σε όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς παραθέτουν τα εξής επιχειρήματα: Πρώτον, η διενέργεια λοβεκτομής ενέχει τον κίνδυνο παραμονής υπολειμματικής νόσου στον ετερόπλευρο λοβό σε περίπτωση πολυεστιακής νόσου, καθώς η αύξηση του αριθμού των εστιών στον ένα λοβό σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα προσβολής του ετερόπλευρου λοβού¹⁸⁴. Υψηλότερο κατά 1.7 φορές κίνδυνο υποτροπής παρουσιάζει η πολυεστιακή νόσος σε σύγκριση με τη μονοεστιακή¹⁸⁵. Δεύτερον, πλεονέκτημα της ολικής θυρεοειδεκτομής αποτελεί η δυνατότητα συμπληρωματικής χορήγησης ραδιενεργού ιωδίου (RAI: Radioactive Iodine) και η αύξηση της ειδικότητας της μέτρησης της Tg ορού και του ολόσωμου σπινθηρογραφήματος κατά την παρακολούθηση της μετεγχειρητικής πορείας της νόσου¹⁸⁶. Τρίτον, η εξάλειψη της αναγκαιότητας της υποκατάστασης με θυροξίνη δια βίου δεν επιβεβαιώνεται στο σύνολο των ασθενών που υποβάλλονται σε λοβεκτομή, καθώς ποσοστό 5–49% αυτών θα εκδηλώσει υποθυρεοειδισμό¹⁸⁷. Ανησυχία εγείρει η συσχέτιση της λοβεκτομής με υψηλότερο κατά 2.5 φορές κίνδυνο υποτροπής και υψηλότερο κατά 2.2 φορές κίνδυνο θανάτου σε σύγκριση με την ολική θυρεοειδεκτομή που παρατήρησαν οι Loh και συνεργάτες¹⁸⁵.

Οι πολέμιοι της διενέργειας ολικής θυρεοειδεκτομής σε νόσο χαμηλού κινδύνου υπογραμμίζουν τη μικρότερη συχνότητα επιπλοκών κατά τη λοβεκτομή σε σύγκριση με την ολική θυρεοειδεκτομή^{188,189}. Επίσης, ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η επιβίωση και η υποτροπή δεν καθορίζονται από την έκταση της χειρουργικής επέμβασης τόσο σε ασθενείς με νόσο χαμηλού κινδύνου^{190,191} όσο και σε ασθενείς με νόσο υψηλού κινδύνου^{192,193} ή, κατά άλλους, σε όλους τους όγκους μεγέθους 1–4 εκ¹⁹⁴.

Διαφαίνεται ότι η επιλογή της βέλτιστης χειρουργικής προσέγγισης παραμένει δυσεπίλυτο ζήτημα. Μελέτη-ορόσημο που διεξήχθη από τους Billimoria και συνεργάτες έδειξε ότι σε όγκους μεγέθους μεγαλύτερου από ή ίσου με 1 εκ. η ολική θυρεοειδεκτομή επιφέρει πλεονέκτημα μικρότερου ποσοστού υποτροπής της νόσου και βελτίωσης της επιβίωσης σε σύγκριση με τη λοβεκτομή¹⁹⁵. Μολονότι οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι σε όγκους μεγέθους μικρότερου από 1 εκ. η έκταση της χειρουργικής επέμβασης δεν μετέβαλε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου ή την επιβίωση¹⁹⁵, υπέρ της διενέργειας ολικής θυρεοειδεκτομής σε θηλώδες καρκίνωμα μεγέθους μικρότερου από 1 εκ. συνηγορεί η μελέτη των Kim και συνεργατών¹⁹⁶.

Η σύγκριση μεταξύ της ολικής θυρεοειδεκτομής και της λοβεκτομής προϋποθέτει τη διεξαγωγή προοπτικών τυχαιοποιημένων μελετών με πολύ μεγάλο αριθμό ασθενών – 12,000 σύμφωνα με τη μελέτη των Udelsman και συνεργατών– ο σχεδιασμός των οποίων είναι ανέφικτος¹⁹⁷.

1.1.5.3. ΧΟΡΗΓΗΣΗ RAI (Radioactive iodine)

Τρεις συνιστώσες συνθέτουν τον ρόλο της χορήγησης RAI μετά τη χειρουργική επέμβαση σε ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς:

- I. Η καταστροφή του φυσιολογικού θυρεοειδικού υπολείμματος (*ablation*).
- II. Η συμπληρωματική θεραπεία, που αποσκοπεί στην αντιμετώπιση πιθανών εστιών στο θυρεοειδικό υπόλειμμα, ιδιαίτερα σε ασθενείς με νόσο ενδιάμεσου κινδύνου.
- III. Η τεκμηριωμένη θεραπεία επιβεβαιωμένης εμμόνης ή υποτροπής της νόσου σε ασθενείς με νόσο υψηλού κινδύνου, με στόχο τη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης και της επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου.

Δεδομένων των βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων επιπτώσεων της χορήγησης RAI, με έμφαση στην ανάπτυξη δεύτερου πρωτοπαθούς νεοπλασματος, ανακύπτουν δύο ζητήματα, αντικείμενο διχογνωμιών: η αναγκαιότητα και η βέλτιστη δόση χορήγησης RAI στους ασθενείς με νόσο χαμηλού και

ενδιάμεσου κινδύνου¹⁹⁸. Όσον αφορά την καταστροφή του θυρεοειδικού υπολείμματος, οι νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες της ATA καθώς και 2 προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες που περιλαμβάνουν ασθενείς με νόσο χαμηλού και ενδιάμεσου κινδύνου –η HiLo και η ESTIMABL2– υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης δόσης ίσης με 30 mCi^{9,199}.

1.1.5.4. ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ TSH

Η καταστολή της TSH μετά τη χειρουργική επέμβαση στοχεύει στην επίτευξη ισορροπίας ανάμεσα στη βελτιστοποίηση της πρόγνωσης της νόσου και στις συνέπειες ενός *status* υποκλινικού υπερθυρεοειδισμού όσον αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα και τον οστικό μεταβολισμό⁹.

Από την άλλη πλευρά, προβληματισμό εγείρουν τα αποτελέσματα της πρώτης προοπτικής τυχαιοποιημένης μελέτης που έδειξαν ότι η καταστολή της TSH σε 400 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θυρεοειδεκτομή για την αντιμετώπιση διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς δεν επέφερε στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σύγκριση με τη μη καταστολή της TSH όσον αφορά την επιβίωση ελεύθερη προόδου νόσου, την υποτροπή, την εκδήλωση μεταστάσεων, την ολική θνησιμότητα και τη θνησιμότητα που οφείλεται στη νόσο για χρονικό διάστημα παρακολούθησης επτά ετών²⁰⁰. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, ανησυχία εγείρει η συσχέτιση της καταστολής της TSH σε επίπεδα χαμηλότερα από 0.5 mU/L για χρονικό διάστημα εννέα ετών με αυξημένη επίπτωση καρκίνου, ειδικότερα καρκίνου πνεύμονα και προστάτη²⁰¹, πιθανόν λόγω της διαμεσολαβούμενης από τις μη γενωμικές δράσεις των θυρεοειδικών ορμονών επαγωγής της νεοαγγειογένεσης²⁰².

1.1.5.5. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΗ ΑΦΑΙΡΕΣΗ

Μολονότι η πρόγνωση της πλειοψηφίας του διαφοροποιημένου καρκινώματος του θυρεοειδούς είναι ευοίωνη, το αξιοσημείωτο ποσοστό υποτροπής της νόσου (15–30%), που επισυμβαίνει κατά κύριο λόγο στους επιχώριους λεμφαδένες^{14,203}, επιβάλλει την εξατομίκευση της χειρουργικής στρατηγικής.

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1990 επικρατούσε η αντίληψη ότι οι λεμφαδενικές μεταστάσεις στον καρκίνο του θυρεοειδούς προμηνύουν δυσμενή έκβαση της νόσου μόνο όταν έχουν μεγάλο μέγεθος, διηθούν τους περιβάλλοντες μαλακούς ιστούς και παρουσιάζουν εξωλεμφαδενική διασπορά της νόσου, χαρακτηριστικά που *a priori* υποδηλώνουν επιθετική βιολογική συμπεριφορά του όγκου²⁰⁴.

Κατά την ανατομή της νέας χιλιετίας, η ανάδειξη του ρόλου των λεμφαδενικών μεταστάσεων στην αύξηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου και της θνησιμότητας οφειλόμενης στη νόσο σηματοδότησε ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας²⁰⁵⁻²⁰⁹. Ωστόσο, συγκεκριμένη παραμένει η κλινική σημασία του φορτίου της νόσου που περικλείεται στις λεμφαδενικές μεταστάσεις του διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς και ιδιαίτερα του θηλώδους καρκινώματος, του προεξάρχοντος ιστολογικού τύπου διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς που μεθίσταται λεμφογενώς²⁰⁴.

Εξαιρετικά ενδιαφέρουσα είναι η θεώρηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου βάσει του λεμφαδενικού *status* ως *continuum*⁹. Η παρουσία λιγότερων από 5 λεμφαδενικών μικρομεταστάσεων μεγέθους μικρότερου από 2 χιλ. σε νόσο που χαρακτηρίζεται από απουσία κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών ενδεικτικών ενδιάμεσου ή υψηλού κινδύνου υποτροπής σχετίζεται με χαμηλό ποσοστό υποτροπής (2-5%). Ωστόσο, η κλινικά έκδηλη λεμφαδενική συμμετοχή ή η παθολογοανατομική τεκμηρίωση της παρουσίας περισσότερων από 5 λεμφαδενικών μεταστάσεων μεγέθους μικρότερου από 3 εκ. συντελεί στην ταξινόμηση της νόσου στην κατηγορία ενδιάμεσου κινδύνου με ποσοστό υποτροπής

20%, ενώ η παρουσία τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων μεγέθους μεγαλύτερου από 3 εκ. αυξάνει περαιτέρω το ποσοστό υποτροπής, το οποίο ανέρχεται στο 30%. Η εξωλεμφαδενική επέκταση της νόσου που αφορά σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες εκτοξεύει το ποσοστό υποτροπής στο 40%⁹.

Η χειρουργική αφαίρεση του συνόλου των λεμφαδένων ενός προσβεβλημένου λεμφαδενικού διαμερίσματος ("en block") κατά την αρχική προσέγγιση της νόσου αποτελεί ευρέως αποδεκτή θεραπευτική στρατηγική²¹⁰⁻²¹², που συνεπάγεται τη μείωση της υποτροπής και τη βελτίωση της επιβίωσης²¹³. Εντούτοις, η προληπτική αφαίρεση των τραχηλικών λεμφαδένων σε ασθενείς χωρίς τεκμηριωμένη προεγχειρητικά ή διεγχειρητικά λεμφαδενική συμμετοχή εγείρει αντιπαραθέσεις. Η διχογνωμία πηγάζει από το γεγονός ότι η πλειοψηφία των δεδομένων προέρχεται από μη τυχαιοποιημένες αναδρομικές μελέτες²¹⁴. Τυχαιοποίηση, σύμφωνα με την ATA, προϋποθέτει τη συμμετοχή 5,890 ασθενών, με κόστος 15 εκατομμύρια δολάρια, ο σχεδιασμός της οποίας διαφαίνεται ανέφικτος²¹⁵. Επιπλέον, η δυσκολία διεξαγωγής προοπτικών μελετών απορρέει από τη φύση του διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς, καθώς η επιβίωση στην πλειονότητα των ασθενών υπερβαίνει τα 10 έτη και παρέρχεται χρονικό διάστημα έως και 20 ετών από την αρχική διάγνωση μέχρι την εκδήλωση της υποτροπής.

Οι υπέρμαχοι της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης παραθέτουν τα εξής επιχειρήματα:

- I. Η υποκλινική λεμφαδενική συμμετοχή είναι εξαιρετικά συχνή, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι πιθανή η παραμονή *in situ* υπολειπόμενης νόσου σε μη διενέργεια προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης.
- II. Πολυάριθμες μελέτες αποδεικνύουν συσχέτιση των τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου και θνησιμότητας οφειλόμενης στη νόσο²¹⁶⁻²¹⁹.
- III. Η προεγχειρητική και η διεγχειρητική διάγνωση του λεμφαδενικού status παρουσιάζουν δυσχέρεια.
 - Μολονότι ο υπερηχογραφικός έλεγχος αποκαλύπτει λεμφαδενικές μεταστάσεις στο 39% των ασθενών στους οποίους η κλινική εξέταση δεν έθεσε τη διάγνωση παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων²²⁰, η διαγνωστική του αξία είναι περιορισμένη. Όσον αφορά την προεγχειρητική διάγνωση του λεμφαδενικού status, η ευαισθησία, η ειδικότητα, η ακρίβεια, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία του υπερηχογραφήματος υπολογίζονται 51%, 92%, 77%, 81% και 76%, αντίστοιχα²²¹.
 - Η υπεροχή του ελέγχου με διενέργεια CT έναντι του υπερηχογραφήματος αναφορικά με τη διάγνωση των λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν επιβεβαιώνεται στο σύνολο των μελετών. Επιπλέον, περιορισμένη είναι η ευαισθησία των MRI και PET-30-40%—όσον αφορά τη διαγνωστική προσέγγιση της λεμφαδενικής συμμετοχής.
 - Ανακριβής αποδεικνύεται στο 50% των περιπτώσεων η διεγχειρητική εκτίμηση του λεμφαδενικού status²⁰⁴.
- IV. Η ανεύρεση υποκλινικών λεμφαδενικών μεταστάσεων ως αποτέλεσμα της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης συμβάλλει στην ακριβέστερη σταδιοποίηση της νόσου²²²⁻²²⁴.
- V. Η επίτευξη μη ανιχνεύσιμων ή χαμηλότερων επιπέδων Tg υπό διέγερση μετά τη διενέργεια προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης συγχρόνως με την ολική θυρεοειδεκτομή σε σύγκριση με τη διενέργεια μόνο ολικής θυρεοειδεκτομής αυξάνει την ευαισθησία της Tg ως δείκτη παρακολούθησης της νόσου^{216, 225, 226}.
- VI. Η διενέργεια προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης συγχρόνως με την ολική θυρεοειδεκτομή δεν αυξάνει τον κίνδυνο των μακροχρόνιων επιπλοκών συγκριτικά με την ολική θυρεοειδεκτομή²¹⁹.

- VII. Η προληπτική λεμφαδενική αφαίρεση μειώνει την αναγκαιότητα επανεπέμβασης, της οποίας η ασφάλεια αποτελεί θέμα αμφιλεγόμενο, καθώς έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης επιπλοκών συγκριτικά με την πρώτη επέμβαση²²⁷.

Οι πολέμιοι της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης αντιτάσσουν τα εξής επιχειρήματα:

- I. Δεν είναι επαρκώς τεκμηριωμένο το όφελος της διενέργειας του προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού συγχρόνως με την ολική θυρεοειδεκτομή, αναφορικά με τη μείωση της υποτροπής της νόσου²²⁸.
- II. Συγκεχυμένη είναι η εξέλιξη του διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς με μικρομεταστάσεις, οι οποίες συνιστούν το κατεξοχήν εύρημα του προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού, καθώς το ποσοστό τοπικής υποτροπής του θηλώδους καρκινώματος –15-30%– είναι εντυπωσιακά μικρότερο από την επίπτωση των μικρομεταστάσεων σε αυτόν τον τύπο του καρκίνου (90%).
- III. Ανεπαρκή θεωρούνται τα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά την τεκμηρίωση του ρόλου του προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού στη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών. Το γεγονός αυτό αντανακλάται στη θεώρηση του άγνωστου, λόγω μη διενέργειας προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού, status των λεμφαδενικών μεταστάσεων (Nx) ως ισοδύναμου με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (NO), σύμφωνα με την όγδοη έκδοση του συστήματος σταδιοποίησης AJCC/ TNM^{173,174}.
- IV. Η διενέργεια προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης συγχρόνως με την ολική θυρεοειδεκτομή ενδέχεται να αυξήσει τη σχετιζόμενη με την επέμβαση νοσηρότητα, αυξάνοντας την επίπτωση της παροδικής υποασβεστιαϊμίας καθώς και της παροδικής παράλυσης του παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου, μολονότι δεν αυξάνει τον κίνδυνο των μόνιμων επιπλοκών²²⁹.
- V. Η ακριβέστερη σταδιοποίηση που παρέχει η προληπτική λεμφαδενική αφαίρεση οδηγεί σε αύξηση της επίπτωσης της νόσου σταδίου N1a σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης AJCC/ TNM και επομένως αύξηση του αριθμού των ασθενών που θα λάβουν RAI και, ενδεχομένως, χορήγηση μεγαλύτερων δόσεων²³⁰. Η προσέγγιση αυτή εγείρει ανησυχία, δεδομένων των παρενεργειών της χορήγησης RAI υπό το πρίσμα της απουσίας τεκμηρίωσης του όφελους σε ασθενείς με νόσο χαμηλού κινδύνου.
- VI. Ορισμένες μελέτες υπογραμμίζουν την ασφάλεια²³¹ και την επάρκεια από την ογκολογική σκοπιά της επανεπέμβασης στο κεντρικό λεμφαδενικό διαμέρισμα²³².

Σε συνολική θεώρηση του θέματος, διαφαίνεται ότι η εδραίωση του προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού ως ευρέως αποδεκτής θεραπευτικής παρέμβασης παραμένει δυσχερής. Δεδομένου ότι οι δυνητικές επιπλοκές αποτελούν τον κύριο λόγο μη διενέργειας προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης, καίριο ρόλο στον σχεδιασμό της χειρουργικής στρατηγικής διαδραματίζει η επιλογή έμπειρου χειρουργού. Οι νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες της ATA υπογραμμίζουν τη σαφή διαφοροποίηση των ποσοστών των επιπλοκών των θυρεοειδεκτομών που διενεργήθηκαν από χειρουργούς οι οποίοι πραγματοποιούν αριθμό επεμβάσεων μικρότερο από 10 ανά έτος, 10 έως 100 ανά έτος και μεγαλύτερο από 100 ανά έτος: 18.9%, 13.4% και 7.5%, αντίστοιχα⁹.

Η προκαθορισμένη πορεία της λεμφογενούς διασποράς των καρκινικών κυττάρων από τον θυρεοειδή προς το σύστοιχο κεντρικό λεμφαδενικό διαμέρισμα και, στη συνέχεια, προς το σύστοιχο πλάγιο διαμέρισμα και το ετερόπλευρο κεντρικό διαμέρισμα²³³⁻²³⁵ αντικατοπτρίζεται στην αξιοσημείωτη διαφοροποίηση του κεντρικού από το πλάγιο διαμέρισμα όσον αφορά το ποσοστό λεμφαδενικής συμμετοχής – 69% έναντι 10–20%, αντίστοιχα²³⁶. Το γεγονός αυτό ίσως επιτρέπει περιορισμό του προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού στο σύστοιχο κεντρικό λεμφαδενικό διαμέρισμα^{237,238}. Η τεκμηρίωση της παρουσίας πολυεστιακού όγκου ή λεμφαδενικών μεταστάσεων στο σύστοιχο κεντρικό ή

πλάγιο διαμέρισμα κατευθύνουν τη χειρουργική στρατηγική προς τον αμφοτερόπλευρο κεντρικό λεμφαδενικό καθαρισμό^{239,240}.

Τροποποιημένη ριζική λεμφαδενεκτομή πλαγίων διαμερισμάτων διενεργείται μόνο μετά την επιβεβαίωση μέσω FNAB λεμφαδενικών μεταστάσεων, οι οποίες επισυμβαίνουν στα διαμερίσματα III, IV, II, V, κατά σειρά φθίνουσας συχνότητας²⁴¹. Μεταστατική διήθηση των πλάγιων τραχηλικών διαμερισμάτων παρά την απουσία μεταστατικής διήθησης των κεντρικών διαμερισμάτων έχει περιγραφεί στο 6.8% έως 37% των θηλωδών καρκινωμάτων με λεμφαδενικές μεταστάσεις²⁴²⁻²⁴⁴.

Συμπερασματικά, η εξατομίκευση της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης προϋποθέτει τη δυνατότητα πρόβλεψης της υποκλινικής λεμφαδενικής συμμετοχής στο κεντρικό λεμφαδενικό διαμέρισμα. Μετα-ανάλυση που περιέλαβε 4,573 ασθενείς ανέδειξε τους εξής προγνωστικούς παράγοντες: άρρεν φύλο, ηλικία μικρότερη από 45 έτη, μέγεθος όγκου μεγαλύτερο από 5 χιλ., πολυεστιακή φύση του όγκου, εξωθυρεοειδική επέκταση και λεμφαγγειακή διήθηση²²⁴. Η τεκμηρίωση των προγνωστικών αυτών παραγόντων αποτελεί αντικείμενο συνεχιζόμενης έρευνας.

Προς το παρόν, τα κριτήρια επιλογής των ασθενών που ενδέχεται να ωφεληθούν από τον προληπτικό λεμφαδενικό καθαρισμό παραμένουν ασαφή ακόμη και υπό το πρίσμα των νεότερων κατευθυντήριων οδηγιών της ATA⁹. Συστήνεται διενέργεια προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης του κεντρικού διαμερίσματος, σύστοιχης ή αμφοτερόπλευρης, σε ασθενείς με νόσο σταδίου T3 ή T4, κλινικά έκδηλη συμμετοχή πλάγιων λεμφαδενικών διαμερισμάτων ή σε προοπτική αξιοποίησης της γνώσης του status των λεμφαδενικών μεταστάσεων για τον σχεδιασμό των θεραπευτικών χειρισμών. Σε νόσο σταδίου T1 ή T2 με απουσία κλινικών ευρημάτων συνηγορούντων υπέρ λεμφαδενικών μεταστάσεων καθώς και στην πλειοψηφία των θυλακιδών καρκίνων συστήνεται θυρεοειδεκτομή χωρίς σύγχρονο προληπτικό λεμφαδενικό καθαρισμό του κεντρικού διαμερίσματος⁹.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της πρώτης προοπτικής τυχαιοποιημένης μελέτης που περιλαμβάνει παρακολούθηση 181 ασθενών, από ένα κέντρο για χρονικό διάστημα πέντε ετών. Μικρομεταστάσεις αποκαλύφθηκαν στο 50% των ασθενών, αλλά η πρόβλεψη τους δεν κατέστη εφικτή βάσει των χαρακτηριστικών που αναλύθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της BRAF μετάλλαξης. Η διενέργεια προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού συγχρόνως με την ολική θυρεοειδεκτομή μείωσε τον αριθμό επαναλήψεων χορήγησης RAI, αλλά σχετίστηκε με μεγαλύτερο επιπολασμό υποπαραθυρεοειδισμού σε στατιστικά σημαντικό βαθμό καθώς και από την απουσία ευνοϊκότερης έκβασης της νόσου, σε σύγκριση με τη διενέργεια μόνο ολικής θυρεοειδεκτομής²⁴⁵.

Τις τελευταίες δεκαετίες, το επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάζεται στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας του διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς με στόχο την ανάδειξη βιοδεικτών με προγνωστική αξία ικανή να κατευθύνει τη χειρουργική στρατηγική προς την εξατομίκευση της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης.

1.2. ΤΟ ΑΙΝΙΓΜΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Τα τελευταία 50 χρόνια, προεξάρχει στην έρευνα του καρκίνου η θεωρία των σωματικών μεταλλάξεων (Somatic Mutation Theory, SMT) που υποστηρίζει ότι η άθροιση πολλαπλών μεταλλάξεων σε ένα σωματικό κύτταρο στα γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό κύκλο δίνει γένεση στον καρκίνο^{246,247}. Τα θεμέλια της θεωρίας αυτής τέθηκαν το 1914 από τον Theodore Boveri ο οποίος περιέγραψε τον καρκίνο ως “πρόβλημα του κυττάρου που οφείλεται σε μόνιμη αλλαγή του συμπλέγματος της χρωματίνης η οποία οδηγεί σε ανεξέλεγκτες κυτταρικές διαιρέσεις”²⁴⁸, αρκετές δεκαετίες πριν από την αναγνώριση του DNA ως γενετικού υλικού. Επιστέγασμα της θεωρίας SMT αποτελεί η περιγραφή των ιδιοτήτων-σήμα κατατεθέν των καρκινικών κυττάρων από τους Hanahan και Weinberg¹¹⁰.

Ωστόσο, υπό αμφισβήτηση τίθεται ο ρόλος των μεταλλάξεων ως κινητήριας δύναμης της καρκινογένεσης από πολλούς ερευνητές²⁴⁹⁻²⁵¹. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, οι Brücher και Jamall²⁵² υπογραμμίζουν δεδομένα από 13 μελέτες genome-wide association²⁵³ που αφορούν 31,717 ασθενείς με καρκίνο και 26,136 υγιείς, αποκαλύπτοντας ότι η πλειοψηφία των γενετικών αλλαγών που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με καρκίνο παρατηρήθηκαν επίσης στους υγιείς αλλά σε μικρότερη συχνότητα²⁵⁴. Η πολυπλοκότητα των σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο αποτυπώνεται στην ετερογένεια της συχνότητας των μεταλλάξεων σε ποικίλους τύπους καρκίνου, αλλά και μεταξύ των ασθενών με τον ίδιο τύπο καρκίνου, καθώς και στη διακύμανση του εύρους των μεταλλάξεων που παρατηρούνται σε έναν όγκο²⁵⁵.

Στον αντίποδα της θεωρίας των σωματικών μεταλλάξεων, οι Sonhenschein και Soto διατύπωσαν το 1999 τη θεωρία του πεδίου οργάνωσης των ιστών (*Tissue Organisation Field Theory, TOFT*). Σύμφωνα με αυτήν, η διαταραχή της οργάνωσης των ιστών, υπόβαθρο της γένεσης των όγκων, πηγάζει από την επαγόμενη από καρκινογόνους παράγοντες διακοπή της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων του παρεγχύματος και του στρώματος, συνομιλία που εξασφαλίζει την ομοιόσταση, εννοχρηστώνει την οργάνωση και επιδιόρθωση των ιστών και θεωρείται ισοδύναμη των “μορφογενετικών πεδίων” των αναπτυσσόμενων οργανισμών²⁴⁶.

Οι Brücher και Jamall διατύπωσαν την υπόθεση ότι οι μεταλλάξεις αποτελούν επιφανιόμενο της καρκινογένεσης και υπογράμμισαν τα δύο βήματα που θεωρούνται απαραίτητα για τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό ενός φυσιολογικού κυττάρου: την παρουσία ενός παθολογικού βιολογικού ή χημικού ερεθίσματος και το φλεγμονώδες *milieu* που οδηγεί σε ίνωση στο μικροπεριβάλλον ευοδώνοντας τον σχηματισμό προκαρκινικής εστίας, η οποία, με τη σειρά της, πυροδοτεί τη στρατηγική διαφυγής από το χρόνιο stress. Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτούς, η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό υποδηλώνει την αποτυχία των μηχανισμών διαφυγής από το χρόνιο stress²⁵².

Ως ολοκλήρωμα των θεωριών της καρκινογένεσης και των γνώσεων που πηγάζουν από τη βιολογία, τη φυσική και τη χημεία με έμφαση στις έννοιες της εντροπίας και του χάους, οι Sigston και Williams εισηγήθηκαν ένα νέο πλαίσιο για την ερμηνεία της καρκινογένεσης, το οποίο διέπουν 12 θεμελιώδεις αρχές. Πρωταγωνιστικό ρόλο στο πλαίσιο αυτό διαδραματίζει η “μονάδα λειτουργικού ιστού”, ένα σύστημα που σε φυσιολογικές συνθήκες διατηρεί μια σχετικά σταθερή ισορροπία με σκοπό την επίτευξη τόσο της βέλτιστης λειτουργίας σε απόκριση σε εξωτερικά και εσωτερικά ερεθίσματα όσο και της επιδιόρθωσης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης. Διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μειώνουν την αφθονία των συστημάτων αυτών, ενώ η απορρύθμιση τους που αποτυπώνεται σε μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές των συστατικών τους στοιχείων δίνει το έναυσμα της καρκινογένεσης. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η εξέλιξη του καρκίνου

θεωρήθηκε ως δυναμική διαδικασία για την κατανόηση της οποίας απαιτείται χωροχρονική προσέγγιση²⁵⁶.

Πρόσφατα, η αναθεώρηση των υποθέσεων των Hanahan και Weinberg με κριτική ματιά από τους Fouad και Aanei σκιαγράφησε τον καρκίνο όχι ως ενιαία νοσολογική οντότητα αλλά ως τη σύνθεση διακριτών νόσων, ισάριθμων με τους ασθενείς με καρκίνο, οι οποίες χαρακτηρίζονται από άλλοτε άλλου βαθμού εκδήλωση των ιδιοτήτων-σήμα κατατεθέν των καρκινικών κυττάρων, επιβάλλοντας την εξατομίκευση της θεραπείας²⁵⁷.

Παρά την πληθώρα θεωριών και υποθέσεων που έχουν διατυπωθεί, το αίνιγμα της καρκινογένεσης παραμένει άλυτο, γεγονός το οποίο δεν υποβαθμίζει την αναγκαιότητα εμβάθυνσης στους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται, με σκοπό όχι μόνο την κατανόηση της παθογένειας του καρκίνου αλλά και την ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων.

Σύμφωνα με τον “Ατλαντα του Γονιδιώματος του Καρκίνου”, ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί έναν από τους καλύτερα μελετημένους καρκίνους όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο, χάρη στην αναγνώριση των υπεύθυνων μεταλλάξεων και των λοιπών γενετικών αλλαγών που ενέχονται στο 96% του θηλώδους καρκινώματος, του συχνότερου ιστολογικού τύπου⁷.

1.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

1.3.1. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ MAPK

Η οδός μετάδοσης σήματος MAPK απαρτίζεται από 3 οικογένειες κινασών που αναφέρονται συνηθέστερα με τα ακρωνύμια τους –MAPKKK (MAPK kinase kinase), MAPKK (MAPK kinase kinase), MAPK– και συνιστούν ακολουθία, κατά την οποία κάθε κινάση φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την επόμενη, ώστε τα εξωκυττάρια σήματα να ενισχύονται και να συνθέτουν την τελική απόκριση. Το εναρκτήριο βήμα της μετάδοσης του εξωκυττάρια σήματος από υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης στις κινάσες MAPKKK, τον πρώτο κρίκο της σηματοδοτικής αλυσίδας, αποτελεί η ενεργοποίηση των Ras πρωτεϊνών²⁵⁸.

Περισσότερες από 20 πρωτεΐνες²⁵⁹ ενέχονται στη μεταγωγή του σήματος μετά την ενεργοποίηση των Ras πρωτεϊνών, δρώντας ως κινάσες ή ρυθμιστές άλλων πρωτεϊνών με δράση υδρόλυσης του GTP, με προεξάρχουσες τις εξής: Raf, PI3K, Rassf, Ral, PKC (Protein kinase C)ζ, PKCε²⁶⁰. Κομβικό σημείο ελέγχου της οδού MAPK αποτελούν οι κινάσες MAPKK, που μεταβιβάζουν σήματα προερχόμενα από πολυάριθμες κινάσες MAPKKK σε περιορισμένο αριθμό κινασών MAPK.

Ο ρόλος των κινασών MAPK αντανakλάται στους μεταγραφικούς στόχους τους, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται πρωτο-ογκογονίδια, όπως cJun, cMYC, p62, ATF2 (Activating transcription factor 2), και πρωτεΐνες κινάσες σερίνης-θρεονίνης, όπως η RSK1-4 (Ribosomal protein S6 kinase 1-4), οι οποίες φωσφορυλιώνονται και αναφέρονται συνολικά ως MAPKAP (MAPK Activated Proteins). Ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η μετανάστευση, η αγγειογένεση και η ανακατασκευή της χρωματίνης, ρυθμίζεται από τις κινάσες MAPKAP χάρη στην εξειδίκευση των υποστρωμάτων τους.

Μεταλλάξεις στην οδό MAPK απαντώνται στο 30% των καρκίνων, υπογραμμίζοντας τον θεμελιώδη ρόλο αυτής²⁵⁸. Απορρύθμιση οποιουδήποτε κρίκου της σηματοδοτικής αλυσίδας MAPKKK/MAPKK/MAPK εμπλέκεται στη γένεση και εξέλιξη του καρκίνου του θυρεοειδούς μέσω ανεξέλεγκτης ενεργοποίησης της οδού. Ως επακόλουθο, υπερεκφράζονται ογκοπρωτεΐνες που προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα ιδιότητες-σήμα κατατεθέν, όπως ο άναρχος πολλαπλασιασμός, η διαφυγή από την απόπτωση, το ανεξάντλητο δυναμικό πολλαπλασιασμού, η αντίσταση στα ανασταλτικά της αύξησης μηνύματα, η διηθητική και μεταστατική ικανότητα και η προαγωγή της αγγειογένεσης¹¹⁰. Η πλειοψηφία των γενετικών αλλαγών που αποδιοργανώνουν την οδό MAPK στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αφορούν τον άξονα Ras-Raf²⁵⁸.

1.3.2. Ras ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

1.3.2.1. ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ras

Οι Ras πρωτεΐνες αποτελούν μικρές G πρωτεΐνες μοριακού βάρους 20-29 kDa με ομολογία αλληλουχιών και σχεδόν ταυτόσημη τριτοταγή δομή, αποτελούμενη από 6β επιφάνειες και α έλικες. Περισσότερα από 150 μέλη συνθέτουν την οικογένεια των πρωτεϊνών Ras στον άνθρωπο^{261,262}. Πέντε διακριτά μέλη περιγράφονται από ορισμένους ερευνητές: Ras, Rho, Rab, Arf, Ga, ενώ άλλοι ερευνητές περιλαμβάνουν στην οικογένεια Ras τις πρωτεΐνες Ran, αποκλείοντας τις πρωτεΐνες Ga²⁶¹. Προτείνεται εναλλακτική ταξινόμηση που αναγνωρίζει μόνο 3 αληθή μέλη της οικογένειας Ras –τις ισομορφές KRas,

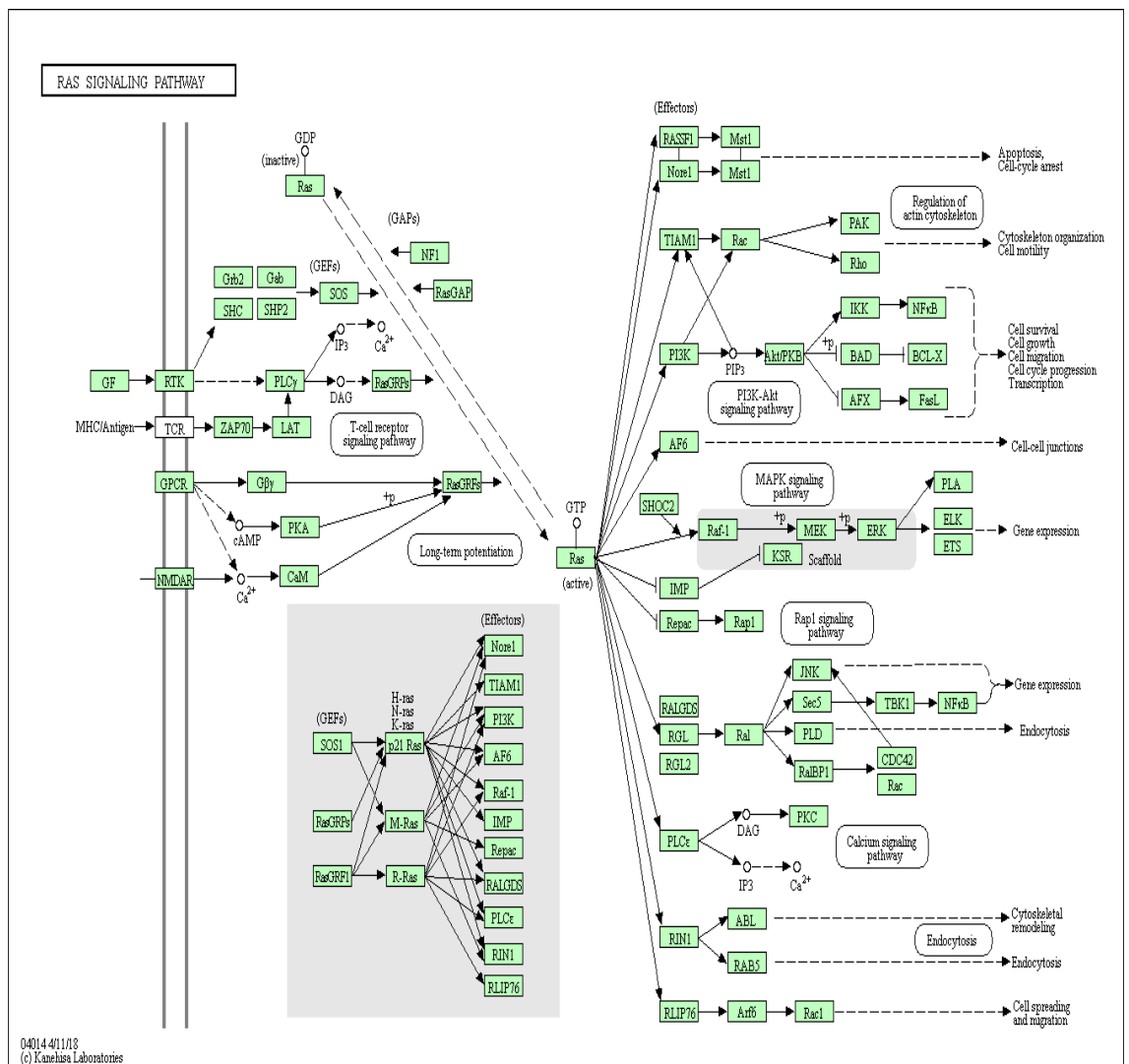
NRas, HRas που κωδικοποιούνται από 3 γονίδια με αξιοσημείωτη ομολογία τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 12p12.1, 11p15.5 και 1p13.1, αντίστοιχα– και πληθώρα πρωτεϊνών που μοιάζουν με τις Ras πρωτεΐνες²⁶⁰.

Οι Ras πρωτεΐνες υφίστανται σε 2 διαφορετικές διαμορφώσεις στο χώρο: μία ανενεργό, σύμφωνα με την επικρατούσα αντίληψη, συνδεδεμένη με GDP (Ras/GDP) και μία ενεργό, συνδεδεμένη με GTP (Ras/GTP). Το καταλυτικό κέντρο των Ras πρωτεϊνών περικλείει δύο περιοχές που χαρακτηρίζονται ως “διακόπτης I και II” και υπόκεινται σε αλλαγή της στερεοδομής κατά την εναλλαγή του GDP με το GTP, δημιουργώντας επιφάνεια αλληλεπίδρασης της μορφής που είναι συνδεδεμένη με το GTP (Ras/GTP) με τις πρωτεΐνες που μεταβιβάζουν το σήμα των πρωτεϊνών Ras²⁶³. Ο τερματισμός της μετάδοσης του σήματος επιτελείται με την υδρόλυση του GTP. Η ενδογενής δραστηριότητα των Ras πρωτεϊνών αναφορικά με την ανταλλαγή GDP/GTP ενισχύεται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως οι GEF (guanine nucleotide exchange factors) και οι GAP (GTPase activating proteins)²⁶⁰. Πρόσφατα παρατηρήθηκε η σύνδεση της μορφής Ras/GDP με τον μεταγραφικό παράγοντα *Aiolos* με επακόλουθο τη μετατόπιση αυτού στον πυρήνα και την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)^{264,265}.

Η παρουσία ομολογίας μόνο κατά 15%^{266, 267} μεταξύ των ισομορφών των πρωτεϊνών Ras όσον αφορά την υπερμεταβλητή καρβοξυτελική περιοχή που τερματίζεται με το μοτίβο CAAX (C: κυστεΐνη, A: αλειφατικό αμινοξύ, X: οποιοδήποτε αμινοξύ) υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή πιθανότατα σχετίζεται με τις διακριτές λειτουργίες τους. Η υπερμεταβλητή καρβοξυτελική περιοχή ελέγχει τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των Ras πρωτεϊνών, όπως είναι η φαρνεσυλίωση, που αποτελούν καθοριστικό βήμα για τη μετακίνηση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο, την ωρίμανση τους, τη μετατόπιση τους και την αγκυροβόληση τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στις ενδομεμβράνες²⁶⁸.

1.3.2.2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ras

Στα φυσιολογικά κύτταρα, η δραστηριότητα των Ras πρωτεϊνών βρίσκεται υπό αυστηρό έλεγχο, ώστε ο πολλαπλασιασμός να πυροδοτείται μόνο όταν είναι απαραίτητος για την αύξηση και την επιδιόρθωση των ιστών. Το έναυσμα της ενεργοποίησης δίνεται από τον ομοδιμερισμό ή ετεροδιμερισμό ενός υποδοχέα με δράση τυροσινικής κινάσης ως συνέπεια σύνδεσης ενός εξωκυττάριου σήματος σε αυτόν. Ακολουθεί η στράτευση “πρωτεϊνών-προσαρμογών”, όπως η Grb 2 (Growth factor receptor-bound protein 2), μέσω της SH2 περιοχής τους σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του υποδοχέα και η στρατολόγηση του συμπλέγματος Grb2-SOS (Son of Sevenless) στη μεμβράνη, σε θέση που γειτνιάζει με τις Ras πρωτεΐνες, οδηγώντας στον σχηματισμό της μορφής Ras/GTP. Η επακόλουθη αύξηση της συγγένειας σύνδεσης των πρωτεϊνών Ras με τις πρωτεΐνες που μεταβιβάζουν το σήμα τους, όπως οι πρωτεΐνες Raf και PI3K, ευοδώνει τη μεταγωγή του σήματος^{260, 269, 270}.



Εικόνα 1.6. Οι επαγόμενες από τις πρωτεΐνες Ras οδοί σηματοδότησης. Πηγή: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04014. Accessed May 9th 2018

1.3.2.3. Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ Ras ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Μεταλλάξεις οποιασδήποτε Ras ισομορφής παρατηρούνται στο 30% των ανθρωπίνων όγκων, ποσοστό που ίσως αντανάκλα την υψηλή, παγκοσμίως, επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου, όγκου με αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων Ras, και υπολογίζεται εκ νέου ίσο με 16% όταν κάθε τύπος καρκίνου αντιπροσωπεύεται από τουλάχιστον είκοσι περιστατικά²⁷¹. Η ανάλυση των δεδομένων της μεγαλύτερης βάσης καταγραφής σωματικών μεταλλάξεων –COSMIC– αποκαλύπτει ότι η KRas είναι η

συχνότερη μεταλλαγμένη Ras ισομορφή, καθώς ανευρίσκεται στο 22% όλων των όγκων, ενώ η NRas και η HRas μετάλλαξη ανιχνεύονται στο 8% και 3% όλων των όγκων, αντίστοιχα²⁷¹.

Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων Ras αφορά τα κωδικόνια 12, 13, 61. Ποσοστό μεγαλύτερο από το 60% του συνόλου των μεταλλάξεων κάθε ισομορφής περικλείει μόνο 3 από τις 18 δυναμικές μεταλλάξεις²⁷². Αυξημένη συγγένεια σύνδεσης της πρωτεΐνης Ras με το GTP ως επακόλουθο σημειακών μεταλλάξεων είτε στο κωδικόνιο 12 είτε στο κωδικόνιο 13 ή αναστολή της αυτοκαταλυτικής λειτουργίας υδρόλυσης του GTP ως συνέπεια σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 61 οδηγεί σε συνεχή μετάδοση του σήματος των Ras πρωτεϊνών²⁷².

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξειδίκευση των μεταλλαξιόγόνων παραγόντων, αναφορικά με τη γένεση των επιμέρους Ras μεταλλάξεων. Για παράδειγμα, στόχο της MNU (1-methyl-1-nitrosourea), αποτελεί η δεύτερη βάση του κωδικονίου 12 του HRas γονιδίου και του KRas γονιδίου σε πολυάριθμους καρκίνους, δίνοντας γένεση στη μετάλλαξη G12D^{273,274}. Η UV (Ultraviolet) ακτινοβολία στοχεύει στα διμερή πυριμιδίνης και ευοδώνει τη γένεση Ras Q61 μεταλλάξεων²⁷⁵. Η ετερογένεια των μεταλλάξεων στους όγκους πηγάζει, τουλάχιστον εν μέρει, από την ειδική ανά ιστό απάντηση μετά την έκθεση σε διαφορετικούς μεταλλαξιόγονους παράγοντες καθώς και από τις διακριτές αποκρίσεις των επιμέρους ιστών μετά την έκθεση στους ίδιους μεταλλαξιόγονους παράγοντες. Εξαιρετικό πρότυπο μελέτης αποτελεί η μετάλλαξη G12C, σήμα κατατεθέν του επαγόμενου από την έκθεση στον καπνό καρκίνου του πνεύμονα^{276,277}, η οποία χαρακτηρίζεται από απουσία έκφρασης σε μη και πρώην καπνιστές, αλλά και στον καρκίνο του παγκρέατος και του παχέος εντέρου, παρά την πυροδότηση αυτών των δύο όγκων από την έκθεση στον καπνό²⁷⁸⁻²⁸⁰.

Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία “υπογραφής μετάλλαξης κωδικονίων” σε κάθε ισομορφή, η οποία διατηρείται ακόμη και όταν οι μεταλλάξεις θεωρούνται αποτέλεσμα έκθεσης σε κοινούς μεταλλαξιόγονους παράγοντες. Ειδικότερα, στους όγκους με KRas μεταλλάξεις διαπιστώνεται υπεροχή της μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12, αντιπροσωπεύοντας το 80% του συνόλου των KRas μεταλλάξεων. Στους όγκους που φέρουν NRas μεταλλάξεις, προεξάρχουν οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 αποτελώντας το 60% του συνόλου, ενώ οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 συγκροτούν το 35% του συνόλου. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις HRas, το 50% όλων των μεταλλάξεων συμβαίνει στο κωδικόνιο 12 και το 40% στο κωδικόνιο 61²⁷².

Η εξειδίκευση της έκφρασης των Ras μεταλλάξεων ανά ιστό ίσως αντανακλά την ιδιαίτερη ικανότητα των επιμέρους ισομορφών αναφορικά με την ενεργοποίηση διακριτών οδών μεταβίβασης σήματος, που με τη σειρά της ενδέχεται να πηγάζει από τη διαμερισματοποίηση τους²⁸¹⁻²⁸³. Υπεύθυνη για τη διαμερισματοποίηση θεωρείται η υπερμεταβλητή περιοχή, που καθορίζει την εντόπιση και τη συγκέντρωση των Ras πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που μεταβιβάζουν διακριτά σήματα²⁷². Εικάζεται ότι η επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων οδών σηματοδότησης, απορρέουσα από την επιρρέπεια αυτών σε ορισμένες μεταλλάξεις, ευοδώνει την εξέλιξη των ειδών καρκίνου που σχετίζονται άμεσα με τις οδούς αυτές. Υπέρ της υπόθεσης αυτής συνηγορεί η ικανότητα των KRas μεταλλάξεων να πυροδοτούν τη γένεση του αδενοκαρκίνωματος του παχέος εντέρου μέσω επιλεκτικής ενεργοποίησης της κινάσης Raf. Οι NRas μεταλλάξεις οι οποίες ευοδώνουν την αντίσταση στην απόπτωση σε απόκριση στον TNF (Tumor necrosis factor)^{284,285} απαντώνται σπανιότατα στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, πιθανότατα ως συνέπεια της εξελικτικής πίεσης που ασκεί το φλεγμονώδες *status*^{285, 286}.

1.3.2.4. Ras ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Η ιδιαιτερότητα των νεοπλασμάτων του θυρεοειδούς έγκειται στην ανεύρεση μεταλλάξεων και των 3 ισομορφών των Ras πρωτεϊνών. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας από τους Howel και συνεργάτες αποκαλύπτει την παρουσία Ras μεταλλάξεων στο 8-33% του θυλακιδώδους αδενώματος, στο 0-57% του θυλακιδώδους καρκινώματος, στο 0-8% του αδενώματος εκ κυττάρων Hurthle, στο 11% του καρκινώματος εκ κυττάρων Hurthle, στο 0-21% του θηλώδους καρκινώματος, στο 18-55% του καρκινώματος χαμηλής διαφοροποίησης και στο 0-100% του αναπλαστικού καρκινώματος. Διαφορές στη μεθοδολογία ανίχνευσης των μεταλλάξεων, μικρός αριθμός ασθενών σε ορισμένες μελέτες και διαφορές στα μεθοδολογικά κριτήρια ευθύνονται για το αξιοσημείωτο εύρος των αναφερόμενων ποσοστών²⁸⁷. Μετα-ανάλυση από τους Liu και συνεργάτες ανέδειξε τη μετάλλαξη NRas στο κωδικόνιο 61 ως τη συχνότερη Ras μετάλλαξη στο καρκίνωμα θυρεοειδούς, αντιπροσωπεύοντας το 67% του συνόλου των Ras μεταλλάξεων σε αυτούς τους όγκους²⁸⁸. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται από μετα-ανάλυση 22 μελετών, όπου η NRas μετάλλαξη στο κωδικόνιο 61 απαρτίζει το 88% των μεταλλάξεων Ras στο καρκίνωμα θυρεοειδούς²⁸⁹.

Υποστηρίζεται ότι η ανεύρεση των μεταλλάξεων Ras θεωρείται σήμα κατατεθέν των θυλακιδών όγκων και σπάνιο χαρακτηριστικό των θηλωδών καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Δύο διακριτές, μη αλληλοεπικαλυπτόμενες, οδοί μετάδοσης σήματος πυροδοτούμενες από τις μεταλλάξεις Ras και την αναδιάταξη PAX8 (Paired Box Gene 8)/PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptors γ) ενέχονται στο 49% και 36% των θυλακιδών καρκινωμάτων του θυρεοειδούς, αντίστοιχα²⁹⁰.

Το θυλακιδώδες αδένωμα που φέρει Ras μετάλλαξη και χαρακτηρίζεται από απουσία των γενετικών αναδιατάξεων PAX8/PPARγ και RET/PTC θεωρείται πρόδρομη βλάβη του θυλακιδώδους καρκίνου, αλλά και του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους²⁹⁰⁻²⁹². Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μεταλλάξεων Ras, η ανίχνευση τους σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησης και σε όλο το ιστολογικό εύρος των θυλακιδών βλαβών²⁹³, υποδεικνύει ότι συνιστούν γενετική αλλαγή που συμβαίνει στο θυλακιδώδες αδένωμα ενισχύοντας πιθανότατα το δυναμικό των θυρεοειδικών κυττάρων για νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Θεωρείται ότι οι μεταλλάξεις Ras αποτελούν την κινητήρια δύναμη της εξέλιξης των όγκων, δεδομένης της συνέκφρασης τους με γενετικές αλλαγές ορόσημο της αποδιαφοροποίησης, όπως οι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια TP53 και PTEN (Phosphatase and tensin homolog) καθώς και οι μεταλλάξεις που αφορούν τη β κατενίνη και/ή την πρωτεΐνη PI3KCA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha) στο καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης και στο αναπλαστικό καρκίνωμα θυρεοειδούς²⁹⁴⁻²⁹⁶. Ωστόσο, η διερεύνηση των υποθέσεων αυτών δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι η μελέτη της εξέλιξης των νεοπλασμάτων θυρεοειδούς με έκφραση μεταλλάξεων Ras δεν είναι εφικτή.

1.3.3. BRAF ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Το 2003 ανακαλύφθηκε η συμβολή των μεταλλάξεων της κινάσης BRAF, γενετικών αλλαγών που ενέχονται στο 8% όλων των όγκων²⁹⁷, στη γένεση του καρκίνου του θυρεοειδούς. Ειδικότερα, η μετάλλαξη V600E απαρτίζει τη συχνότερη γενετική αλλαγή που παρατηρείται στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς και απαντάται στο 35-70% του συνόλου, αν και στη πλειοψηφία των μελετών ο επιπολασμός της στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς υπολογίζεται 40-45%²⁹⁸⁻³⁰⁰. Προκύπτει από την αντικατάσταση της θυμίνης από αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 1799 (T1799A), που οδηγεί σε αντικατάσταση

της βαλίνης από το γλουταμινικό στο κατάλοιπο 600 της κινάσης BRAF (V600E), με επακόλουθο τη συνεχή ενεργοποίηση αυτής και την ανεξέλεγκτη διέγερση της οδού MAPK³⁰¹. Συσχέτιση με τον ιστολογικό υπότυπο παρουσιάζει η μετάλλαξη BRAFV600E, καθώς ανευρίσκεται στο 60% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, στο 70-80% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”^{302,303} και στο 10% του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους³⁰¹. Η ανεύρεση της μετάλλαξης BRAF στο αναπλαστικό καρκίνωμα και στο καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης υπογραμμίζει το *continuum* που διέπει την αποδιαφοροποίηση των καρκινωμάτων θυρεοειδούς³⁰³⁻³⁰⁵.

Ως δείκτης επιθετικού φαινότυπου των όγκων θυρεοειδούς ανακηρύσσεται η BRAF μετάλλαξη βάσει πληθώρας μελετών³⁰⁶⁻³¹². Αξιόπιστος ειδικός δείκτης για το θηλώδες καρκίνωμα και τους σχετικούς με αυτό όγκους καθίσταται η BRAFV600E χάρη στην πλήρη απουσία της έκφρασης της στο θυλακιδώδες καρκίνωμα και στους καλοήθεις θυρεοειδικούς όζους³⁰¹.

1.3.4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Η μελέτη των Stransky και συνεργατών χαρακτήρισε τον καρκίνο θυρεοειδούς ως τον τύπο καρκίνου με τη μεγαλύτερη συχνότητα χιμαιρικών ογκογονιδίων, η οποία ανέρχεται στο 13%. Μεταξύ των πρωταγωνιστών της δημιουργίας των χιμαιρικών ογκογονιδίων προεξάρχουν τα εξής γονίδια: RET, NTRK (neurotrophic tyrosine kinase, receptor), BRAF, RAF1³¹³.

ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ RET/PTC

Η ανακάλυψη το 1987 ενός νέου ογκογονιδίου σε θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς προερχόμενου από ακτινοβόληση³¹⁴ και η κλωνοποίηση του 3 χρόνια μετά, η οποία ανέδειξε τον γενετικό ανασυνδυασμό RET/PTC1, αποτέλεσαν το έναυσμα της ανακάλυψης πολυάριθμων RET/PTC^{315,316}. Ο συνεχής διμερισμός της πρωτεΐνης RET, ενός υποδοχέα με δράση τυροσινικής κινάσης, ως επακόλουθο της σύντηξης της περιοχής TK του RET γονιδίου με το 5' άκρο διαφόρων γονιδίων συνεπάγεται την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση καίριων οδών σηματοδότησης³¹⁷. Αξιοσημείωτο είναι το εύρος της επίπτωσης των ανασυνδυασμών RET/PTC, το οποίο κυμαίνεται από 2.5–73% στο σποραδικό θηλώδες και από 28–87% στο θηλώδες προερχόμενο από ακτινοβόληση³¹⁷. Η αυξημένη επίπτωση των RET/PTC ανασυνδυασμών στον καρκίνο θυρεοειδούς που παρουσιάζεται σε επιβιώσαντες από ατομική έκρηξη ή μετά την έκθεση σε πυρηνικό ατύχημα³¹⁸ καθώς και τα πειραματικά δεδομένα δημιουργίας RET/PTC ανασυνδυασμών σε καλλιέργειες φυσιολογικών θυρεοειδικών κυττάρων μέσω ακτινοβόλησης³¹⁹⁻³²¹ υποδεικνύουν την αιτιολογική τους συσχέτιση με την ακτινοβολία.

ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΗ ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ NTRK

Χιμαιρικά ογκογονίδια που προκύπτουν από τη σύντηξη του 3' άκρου του γονιδίου NTRK1 (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1), που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NTRK1, με το 5' άκρο ποικίλων γονιδίων, όπως του TPM3 (non-muscular tropomyosin gene) και του TPR (translocated promoter region), δίνουν γένεση σε χιμαιρικές ογκοπρωτεΐνες. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη NTRK1 δρα ως υποδοχέας του NGF-β (nerve growth factor β) και ενεργοποιεί τις οδούς μετάδοσης σήματος MAPK και PI3K/Akt, οι χιμαιρικές ογκοπρωτεΐνες δρουν ως διαρκώς ενεργοποιημένες κινάσες τυροσίνης, οδηγώντας σε μετασχηματισμό των θυρεοειδικών κυττάρων και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων³²²⁻³²⁴.

ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΗ AKAP9/BRAF

Το χιμαιρικό ογκογονίδιο AKAP9 (A kinase anchor protein 9)/BRAF προκύπτει από τη σύντηξη των εξονίων 9–18 του γονιδίου BRAF με τα εξόνια 1-8 του γονιδίου AKAP9, γονιδίου που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 453 kDa ικανή να συνδέεται σε ποικίλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, όπως στην τύπου II ρυθμιστική υπομονάδα της PKA (protein kinase A). Προϊόν του ογκογονιδίου είναι μία χιμαιρική ογκοπρωτεΐνη με απώλεια των αμινοτελικών αυτοανασταλτικών περιοχών της πρωτεΐνης BRAF που οδηγεί στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων μέσω ανεξέλεγκτης ενεργοποίησης της ογκογόνου οδού MAPK³²⁵.

ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΗ PAX8/PPARγ

Το χιμαιρικό ογκογονίδιο PAX8/PPARγ απαντάται αποκλειστικά στους θυλακιώδεις όγκους και προκύπτει από την αναδιάταξη t(2; 3)(q13; p25) ανάμεσα στα χρωμοσώματα 2 (εξόνια 7, 8, 9) και 3 (εξόνιο1), στις γενετικές περιοχές 2q13 και 3p25 που κωδικοποιούν, αντίστοιχα, τον μεταγραφικό παράγοντα PAX8 και τον πυρηνικό υποδοχέα PPARγ³²⁶. Η επαγόμενη από την αναδιάταξη υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης οδηγεί σε νεοπλασματικό μετασχηματισμό με ασαφείς μηχανισμούς³²⁶⁻³²⁹. Η αναδιάταξη PAX8/PPARγ ανευρίσκεται στο 36.5% των θυλακιωδών καρκίνων, με εύρος 11–63%, στο 9.5% των θυλακιωδών αδενωμάτων και στο 13.2% του θυλακιώδους υπότυπου του θηλώδους²⁹⁰. Σχετίζεται με εκδήλωση του νεοπλασματος σε νεαρή ηλικία, μικρό μέγεθος του όγκου, συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης, αγγειακή διήθηση^{290,330,331} καθώς και με την παρουσία εγκαψωμένου θυλακιώδους υπότυπου του θηλώδους³³². Η ανίχνευση της αναδιάταξης PAX8/PPARγ αποτελεί ισχυρή ένδειξη θυλακιώδους καρκινώματος,³³³⁻³³⁵ αλλά δεν διαθέτει επαρκή ευαισθησία και ειδικότητα, ώστε να εδραιωθεί ως καρκινικός βιοδείκτης.

1.3.5. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ PI3K/Akt

Το έναυσμα για την ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt δίνεται από την πρόσδεση ενός εξωκυττάριου σήματος σε έναν υποδοχέα με δράση τυροσινικής κινάσης, όπως ο VEGFR (VEGF receptor), ο PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) και ο EGFR (Epidermal growth factor receptor), με επακόλουθο την ενεργοποίηση της PI3K. Η PI3K μετατρέπει το μεμβρανικό λιπίδιο PIP2 (phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate), σε PIP3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate) το οποίο προσδένει την Akt – μία κινάση σερίνης-θρεονίνης – και τη μετατοπίζει στην κυτταρική μεμβράνη, όπου αυτή φωσφορυλιώνεται από την PDK1 (Pyruvate dehydrogenase lipooamide kinase isozyme 1), και ενεργοποιείται ώστε να ενεργοποιήσει επιπρόσθετες πρωτεΐνες, όπως τον mTOR (mammalian target of rapamycin). Ευόδωση του πολλαπλασιασμού και αναστολή της απόπτωσης απορρέει από την ενίσχυση του εξωκυττάριου σήματος. Ο τερματισμός της σηματοδοτικής αλυσίδας διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη PTEN, παράγωγο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN. Η υπερμεθυλίωση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN και η συνακόλουθη αποσιώπηση του προάγει την αύξηση, την εξέλιξη και την αποδιαφοροποίηση του όγκου³³⁶.

Πέραν της μετάλλαξης PTEN, στην απορρύθμιση της οδού PI3K/Akt κατά τη γένεση και εξέλιξη του καρκίνου του θυρεοειδούς συμβάλλουν οι εξής γενετικές αλλαγές:

- Μετάλλαξη της β υποομάδας του TR (Thyroid hormone receptor), με συνέπεια την αύξηση της συγγένειας σύνδεσης του TR στην p85 ρυθμιστική υποομάδα της PI3K και, επομένως, την ενεργοποίηση αυτής³³⁷.
- Οι μεταλλάξεις RET³³⁷ και οι αναδιατάξεις RET/PTC³³⁸⁻³⁴⁰.
- Υερέκφραση υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης ή μεταλλάξεις αυτών στην καταλυτική τους περιοχή³³⁷.
- Αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Akt³⁴¹ και μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την Akt³⁴¹.
- Μετάλλαξη ή ενίσχυση του γονιδίου PI3KCA³⁴¹.
- Μεταλλάξεις των γονιδίων Ras³³⁷.

1.3.6. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ Wnt

Ενεργοποίηση της οδού Wnt (Wingless-related integration site) παρατηρείται σε καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης και σε αναπλαστικά καρκινώματα θυρεοειδούς αλλά και σε θηλώδη καρκινώματα σε συσχέτιση με την παρουσία της αναδιάταξης RET/PTC³⁴²⁻³⁴⁴. ή ανεξαρτήτως αυτής³⁴⁵. Ως επακόλουθο, η β-κατενίνη αθροίζεται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Tcf/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) και ενεργοποιεί την έκφραση πληθώρας γονιδίων-στόχων που ενέχονται στην εξέλιξη του όγκου^{346, 347}.

1.3.7. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ EIF1AX

Ο “Άτλαντας του Γονιδιώματος του Καρκίνου” αποκαλύπτει την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο EIF1AX (eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked) στο 1.5% του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς.⁷ Το γονίδιο EIF1AX εδράζεται στο χρωμόσωμα X και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που προάγει τον σχηματισμό του συμπλέγματος 43S μέσω σταθεροποίησης της σύνδεσης του συμπλέγματος Met-tRNA (eIF2-GTP-methionyl-initiator tRNA) στην 40S υπομονάδα του ριβοσώματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σύνθετου συστήματος έναρξης της μετάφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς^{7,348}. Μολονότι αρχικά υποστηρίχθηκε ότι οι μεταλλάξεις EIF1AX σχεδόν αποκλείουν την παρουσία μεταλλάξεων στην οδό σηματοδότησης MAPK³, πρόσφατα αποδείχθηκε η συνύπαρξη τους με άλλες μεταλλάξεις-“οδηγούς” όπως οι μεταλλάξεις Ras και TP53³⁴⁸. Η ανεύρεση τους σε καλοήθεις όζους θυρεοειδούς, στους οποίους υποδηλώνουν κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ίσο με 20%, αλλά και στο αναπλαστικό καρκίνωμα θυρεοειδούς³⁴⁸ υποδεικνύει τον δυνητικό ρόλο τους στο *continuum* της αποδιαφοροποίησης.

1.3.8. TERT ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Το γονίδιο TERT, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 στη θέση 5p15.33, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TERT (telomerase reverse transcriptase) που αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου τελομεράση. Πρόκειται για ένζυμο υπεύθυνο για την προσθήκη τελομερών – διαδοχικών επαναλήψεων TTAGGG (T: θυμίνη, A: αδενίνη, G: γουανίνη) – στα άκρα του χρωμοσωμιακού DNA³⁴⁹ με στόχο την προστασία του από τις επάγουσες τον κυτταρικό θάνατο τελικο-τελικές συντήξεις, αυξάνοντας τον χρόνο

ζωής του κυττάρου³⁵⁰. Δύο μη αλληλοεπικαλυπτόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου TERT (chr5:1,295,228C>T και chr5:1,295,250C>T), οι οποίες αναγνωρίστηκαν αρχικά στο μελάνωμα, ανευρίσκονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 15% των καρκινικών κυτταρικών σειρών που περιλαμβάνονται στην Εγκυκλοπαίδεια Κυτταρικών Σειρών³⁵¹. Οι μεταλλάξεις αυτές επιφέρουν αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας κατά δύο έως τέσσερις φορές λόγω δημιουργίας συναινετικής αλληλουχίας σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων ETS (E twenty-six) στον υποκινητή του γονιδίου TERT^{352, 353}.

Η τεκμηρίωση του ρόλου των μεταλλάξεων TERT στον καρκίνο θυρεοειδούς το 2013^{354,355} πυροδότησε ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Η μετάλλαξη C228T είναι η πιο συχνή μετάλλαξη TERT που απαντάται στον καρκίνο θυρεοειδούς³⁵⁶. Υπό έρευνα βρίσκεται η εν δυνάμει συνεργιστική δράση των μεταλλάξεων BRAF, Ras και TERT³⁵⁵⁻³⁵⁷.

1.3.9. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Οι επιγενετικές αλλαγές – αναστρέψιμες, κληρονομούμενες αλλαγές στη λειτουργία των γονιδίων χωρίς μεταβολές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων – προσελκύουν το ενδιαφέρον ως ο δυνητικός συνδετικός κρίκος μεταξύ γενετικής, περιβάλλοντος και ενδοκρινικών συστημάτων με στόχο τη δημιουργία ενός φαινότυπου των ενδοκρινικών αξόνων που εξασφαλίζει την προσαρμογή στο περιβάλλον με έναυσμα κατά την *in utero* ανάπτυξη. Μεταβολές στους επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως στη μεθυλίωση του DNA, στην τροποποίηση των ιστονών και στην έκφραση των miRNA, οδηγεί σε απρόσφορη ενεργοποίηση ή αναστολή οδών σηματοδότησης, ευοδώνοντας την ογκογένεση.

Στον καρκίνο του θυρεοειδούς διαταραχή της μεθυλίωσης έχει διαπιστωθεί σε πληθώρα ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως τα εξής: PTEN, TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinases 3), SLC5A8 (solute carrier family 5, member 8), DAPK (Death-associated protein kinase), καθώς και ογκογονιδίων, όπως το INSL4 (insulin-like peptide 4), το DPPA2 (Developmental pluripotency-associated protein 2) και το NOTCH4 (Neurogenic locus notch homolog 4). Ορισμένες διαταραχές συμβάλλουν στην αποδιαφοροποίηση των θυρεοειδικών κυττάρων και, συνακόλουθα, στην αποτυχία απόκρισης στη θεραπευτική χορήγηση RAI³⁵⁸. Η υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως του TIMP3, του SLC5A8 και του RARB (retinoic acid receptor-β) πυροδοτείται από τη μετάλλαξη BRAFV600E³⁵⁹.

Τα miRNA, η συμβολή των οποίων στον καρκίνο του θυρεοειδούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 2005, ελέγχουν μέσω των γονιδίων-στόχων τους τη διαφοροποίηση, τον μεταβολισμό, την απόπτωση και το μεταστατικό δυναμικό των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων, δρώντας είτε ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες είτε ως ογκογονίδια.

1.3.10. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ c-Fos

Ο εδραιωμένος βάσει πληθώρας πειραματικών και κλινικών δεδομένων ρόλος της ογκοπρωτεΐνης c-Fos στη γένεση και εξέλιξη του καρκίνου³⁶⁰⁻³⁷⁰ αποτελεί το έρεισμα της διερεύνησης της έκφρασης της στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Ιδιαίτερη αξία στη διερεύνηση αυτή προσδίδει το γεγονός ότι η ακτινοβολία –τεκμηριωμένος παράγοντας κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου θυρεοειδούς– επάγει την έκφραση της c-Fos η οποία με τη σειρά της επάγει την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την απόκριση στο πυροδοτούμενο από την ακτινοβολία κυτταρικό *stress*³⁷¹⁻³⁷⁷.

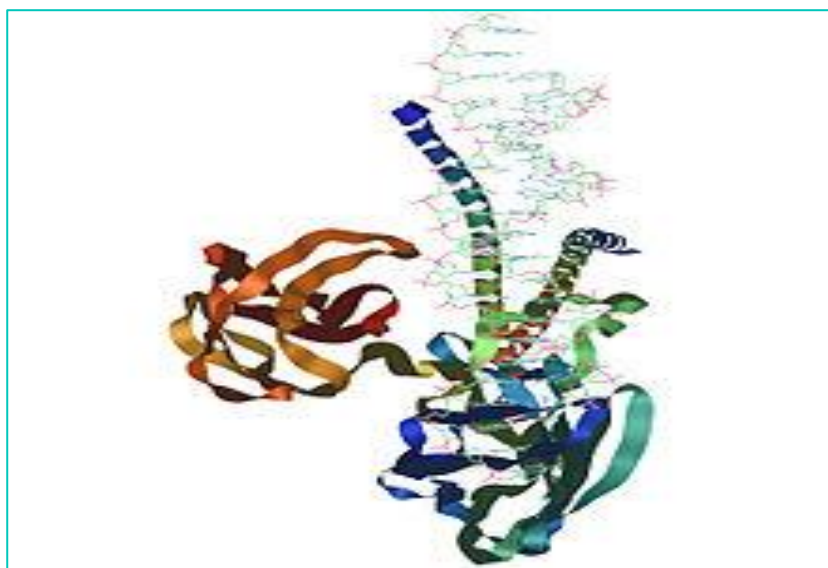
1.3.10.1. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΩΣ ΘΕΜΕΛΙΩΔΕΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΤΟΥ AP 1

Η πρωτεΐνη c-Fos κωδικοποιείται από το γονίδιο c-Fos, το ανθρώπινο ομόλογο του ιϊκού ογκογονιδίου v-Fos, ενός γονιδίου μετασχηματισμού, υπεύθυνου για την επαγωγή οστεοσαρκώματος στα ποντίκια από τον ιό Finkel–Biskis–Jenkins (FBJ), το οποίο ανιχνεύεται επίσης στους ρετροϊούς FBR και NK24³⁷⁸. Το γονίδιο c-Fos εδράζεται στο χρωμόσωμα 14, στην περιοχή 14q21–q23. Απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου c-Fos πυροδοτεί την ενεργοποίηση του ως ογκογονιδίου. Η συνεχής έκφραση του σε υψηλά επίπεδα μετασχηματίζει τους ινοβλάστες σε καλλιέργεια κυττάρων και επάγει όγκους οστών σε διαγονιδιακά ποντίκια³⁷⁸.

Η πρωτεΐνη c-Fos ανήκει στην οικογένεια Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2) και συνιστά θεμελιώδες συστατικό των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 (Activator protein 1), διμερών που απαρτίζονται από πρωτεΐνες-μέλη των οικογενειών Jun (c-Jun, JunB, Jun D), Fos, JDP1, JDP2 καθώς και ATF (ATF2, ATF3, BATF, LRF1)³⁷⁹. Σήμα κατατεθέν των πρωτεϊνών Fos αποτελεί η δομή που χαρακτηρίζεται ως “φερμουάρ λευκίνης” (leukine zipper). Η πρωτεΐνη c-Fos δε σχηματίζει σταθερά διμερή, αλλά συγκροτεί ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες Jun, δίνοντας γένεση σε ποικίλους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 με αυξημένη συγγένεια σύνδεσης με το DNA.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες AP-1 συνδέονται στα ειδικά στοιχεία απόκρισης TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate), γνωστά ως θέσεις AP-1 (συναინετική αλληλουχία 5'-TGAG/CTCA-3'), στους προαγωγείς ή στους ενισχυτές των γονιδίων-στόχων τους³⁸⁰. Τα γονίδια-στόχοι των διμερών AP-1 διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη φλεγμονή, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό, στη μετανάστευση και στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων³⁸¹. Η αναγνώριση διαφορετικών αλληλουχιών στους υποκινητές και ενισχυτές των γονιδίων-στόχων καθορίζεται από τις επιμέρους πρωτεΐνες που απαρτίζουν τα διμερή και θεωρείται κατεξοχήν υπεύθυνη για την πολυπλοκότητα της ρύθμισης της μεταγραφής. Η επιμέρους σύνθεση των AP-1 διμερών καθορίζει επίσης τη θετική ή αρνητική ρύθμιση των γονιδίων-στόχων.

Μολονότι οι AP-1 μεταγραφικοί παράγοντες ανακαλύφθηκαν πριν από 30 χρόνια, οι διακριτοί ρόλοι των επιμέρους διμερών στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και του θανάτου των κυττάρων δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως.



Εικόνα 1.7. Τρισδιάστατη απεικόνιση της c-Fos πρωτεΐνης. Πηγή: <https://fr.wikipedia.org/wiki/C-Fos>. Accessed May 9th 2018

1.3.10.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ c-Fos ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Θεμελιώδης είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης c-Fos στη βιολογία των οστών, ειδικότερα στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, όπως αποτυπώνεται στη διαπίστωση ότι ποντίκια με απώλεια της έκφρασης αυτής παρουσιάζουν οστεοπετρωτικό φαινότυπο λόγω αυξημένου οστικού σχηματισμού σε ολόκληρο τον σκελετό καθώς και διαταραχές της αιμοποίησης, όπως λεμφοπενία, επακόλουθο της οστεοποίησης του μυελού των οστών^{382,383}. Επίσης, χιμαιρικά ποντίκια τα οποία δημιουργούνται από εμβρυϊκά αρχέγονα κύτταρα που υπερεκφράζουν τη c-Fos πρωτεΐνη αναπτύσσουν χονδρογενείς όγκους οι οποίοι απορρέουν από την αναστολή της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων³⁸⁴. Η έκτοπη έκφραση της c-Fos σε διαγονιδιακά ποντίκια δεν μεταβάλλει τη διαφοροποίηση των κυττάρων αλλά επάγει τον μετασχηματισμό των οστεοβλαστών, δίνοντας γένεση στο οστεοσάρκωμα³⁸⁵.

1.3.10.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ c-Fos ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Πληθώρα μελετών αναδεικνύουν τον πολυσύνθετο ρόλο της c-Fos στον έλεγχο της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού, του διηθητικού και μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων καθώς και της αγγειογένεσης³⁸⁶⁻³⁸⁹, προμηνύοντας τη δυσμενή έκβαση ορισμένων όγκων³⁹⁰⁻³⁹³. Αντίθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης c-Fos έχει συσχετιστεί με ευοίωνη πρόγνωση στον καρκίνο του στομάχου³⁶⁷ και του παγκρέατος³⁷⁰, στο προχωρημένο καρκίνωμα παχέος εντέρου³⁹⁴ και στο επιθηλιακό καρκίνωμα ωοθηκών³⁹⁵.

Δεδομένου ότι ένα συγκεκριμένο ερέθισμα πυροδοτεί τη δραστηριότητα ειδικών για το ερέθισμα διμερών μεταγραφικών παραγόντων AP-1, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν ή καταστέλλουν επιμέρους γονίδια-στόχους, ο ρόλος της c-Fos αντανακλάται στη μεταγραφική δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων AP-1. Οι μεταγραφικοί παράγοντες AP-1 ενεργοποιούνται ως απόκριση σε πληθώρα φυσιολογικών και μιτογόνων ερεθισμάτων μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων από την οδό MAPK^{396,379} καθώς και από τις κινάσες PKC και PTK (protein tyrosine kinase)³⁹⁷.

1.3.10.4. Ο ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Επικρατεί η αντίληψη ότι η ογκογόνος ικανότητα του γονιδίου c-Fos πηγάζει από την επίδραση του στον κυτταρικό κύκλο, λόγω της επαγόμενης από μιτογόνα ερεθίσματα έκφρασης αυτού, ταχέως και παροδικά, κατά τη μετάβαση από τη φάση G0 στη φάση G1 πριν από την έναρξη της σύνθεσης του DNA³⁷⁸.

Η συμβολή των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 στη θετική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S αποτυπώνεται στην υπερέκφραση της cyclin D1, υπεύθυνης για το 25–30% της σύνθεσης του DNA, καθώς και στην καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες p53, p21, p16. Ανάλυση των γονιδίων-στόχων σε πειραματικά μοντέλα και καλλιέργειες κυττάρων δείχνει ότι η c-Fos προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου cyclin D1, δρώντας όπως και η συνεργασία της FosB με τη cJun καθώς και η cJun, ενώ αντιτίθεται στη δράση της JunB που αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων³⁹⁸.

1.3.10.5. Ο ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δράση των πρωτεϊνών Fos στον καρκίνο εκτείνεται πέραν του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου³⁷⁸. Αποτελέσματα πειραμάτων σε μοντέλο σύνθεσης ή καταστολής της c-Fos σε κύτταρα Li-3cFos δείχνουν ότι η αύξηση της έκφρασης γονιδίων-στόχων της c-

Fos (Fra-1, stromelysin, collagenase) αλλά και η καταστολή άλλων γονιδίων-στόχων (Jun D, Fra2, cJun) ενέχονται στον πυροδοτούμενο από τη c-Fos μετασχηματισμό των κυττάρων. Η c-Fos θεωρείται διαμεσολαβητής, αν και όχι ο μοναδικός, του νεοπλασματικού μετασχηματισμού των κυττάρων που επάγεται από τα ογκογονίδια Ras, Raf και από την κινάση Src. Επιπλέον, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι γονίδια-στόχοι τα οποία ελέγχονται άμεσα από την πρωτεΐνη c-Fos κωδικοποιούν την έκφραση εξωκυττάρων πρωτεϊνών που διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων ή άλλων πρωτεϊνών απαραίτητων για την απόκριση σε παράγοντες μετασχηματισμού³⁷⁸.

Επιπρόσθετα, στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων ενδέχεται να συμβάλλει η διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη c-Fos ρύθμιση του γονιδίου που κωδικοποιεί την τρανσφεράση της 5 μεθυλοκυτοσίνης³⁸⁷, ένζυμο υπεύθυνο για τη μεθυλίωση του DNA και, επομένως, την ογκογένεση³⁹⁹.

1.3.10.6. Η ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ c-Fos ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

Συνιστώσες του ρόλου της πρωτεΐνης c-Fos στην εξέλιξη του όγκου αποτελούν η ευόδωση του διηθητικού και μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων, της αγγειογένεσης, του φλεγμονώδους *milieu* και της απόπτωσης.

Η πρωτεΐνη c-Fos ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών οι οποίες ευοδώνουν τη διήθηση μέσω αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως οι MMPs, η collagenase 1 και η stromelysin⁴⁰⁰. Πολυάριθμα γονίδια συνθέτουν τον κατάλογο των γονιδίων-στόχων της c-Fos που φαίνεται να καθορίζει τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων⁴⁰¹⁻⁴⁰⁴. Γονίδιο-στόχο της c-Fos αποτελεί επίσης το γονίδιο που κωδικοποιεί τον VEGF-D, παρέχοντας τον πιθανό συνδετικό κρίκο μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και της αγγειογένεσης⁴⁰⁵. *In vitro* μελέτη έδειξε ότι η c-Fos ευοδώνει το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ιδιότητα την οποία αναχαιτίζει το miRNA139⁴⁰⁶. Πρόσφατα, μελετήθηκε στο οστεοσάρκωμα ένας μηχανισμός ευοδωτικός στον όγκο επαγόμενος από τη c-Fos ο οποίος διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Wnt2⁴⁰⁷. Η συμβολή της c-Fos στη διαμόρφωση ενός φλεγμονώδους *milieu*, άρρηκτα συνδεδεμένου με τη γένεση και την εξέλιξη του όγκου, διαμεσολαβείται από τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν ποικίλες κυτταροκίνες, όπως η IL (interleukin) 2, η IL 3, η IL 4 και ο TNFα, μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NFAT_c (Nuclear factor of activated T-cells). Επίσης, η επαγόμενη από τους υποδοχείς "Toll like" σηματοδότηση ενεργοποιεί την πρωτεΐνη c-Fos μέσω του NFκB⁴⁰⁸. Ωστόσο, αιτιογενής είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης c-Fos στην απόπτωση καθώς ενέχεται όχι μόνο στην ευόδωση αλλά και στην αναστολή της απόπτωσης³⁹⁸.

1.3.10.7. ΤΟ STATUS ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ c-Fos ΣΤΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Ελάχιστα και αντικρουόμενα είναι τα ερευνητικά δεδομένα που αφορούν την έκφραση του γονιδίου c-Fos στο καρκίνο θυρεοειδούς. Οι Terrier και συνεργάτες⁴⁰⁹ διαπίστωσαν την αύξηση της έκφρασης του c-Fos mRNA στο θηλώδες καρκίνωμα και στο θυλακιδώδες αδένωμα, σε αντίθεση με τους Aasland και συνεργάτες⁴¹⁰ και τους Liu και συνεργάτες⁴¹¹ που παρατήρησαν μείωση και απουσία έκφρασης, αντίστοιχα. Επιχειρώντας να ερμηνεύσουν τα αντικρουόμενα ευρήματα, οι Liu και συνεργάτες διατύπωσαν την υπόθεση ότι το *status* της πρόσληψης ιωδίου συμβάλλει στον έλεγχο της έκφρασης της c-Fos⁴¹¹. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση της έκφρασης του γονιδίου c-Fos στον καρκίνο του θυρεοειδούς εστιάζοντας στην προγνωστική του σημασία.

1.3.11. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Αναδυόμενο πεδίο έρευνας στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς συνιστούν οι γενετικές αλλαγές που αφορούν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, ορόσημο μέχρι πρότινος της αποδιαφοροποίησης των όγκων θυρεοειδούς.

1.3.11.1. Η ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ p53

Η πρωτεΐνη p53 – κυτταρική πρωτεΐνη που σχηματίζει σύμπλοκο με την ογκοπρωτεΐνη “μεγάλο T αντιγόνο” του ογκογόνου ιού SV40 – ανακαλύφθηκε το 1979 από 5 διακριτές ομάδες ερευνητών. Το 1983 ονομάστηκε “p53” βάσει εσφαλμένου υπολογισμού του μοριακού της βάρους, το οποίο αποδείχτηκε τελικά ότι είναι 43.7 kDa και όχι 53 kDa. Το 1989 το γονίδιο TP53 εδραιώθηκε ως *bona fide* ογκοκατασταλτικό γονίδιο, καταρρίπτοντας την αρχική πεποίθηση ότι αποτελεί ογκογονίδιο. Τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της πρωτεΐνης p53 θεμελίωσαν η διαπίστωση της απώλειας των φυσιολογικών αλληλόμορφων του γονιδίου TP53 στον καρκίνο του παχέος εντέρου στον άνθρωπο καθώς και το εύρημα ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 καταστέλλει τον επαγόμενο από τον συνδυασμό των ογκογονιδίων cMYC και HRas νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων. Τη δεύτερη δεκαετία μετά την ανακάλυψη της, η πρωτεΐνη p53 εδραιώθηκε ως μεταγραφικός παράγοντας, ενώ η αποκάλυψη νέων ιδιοτήτων αυτής την τρίτη δεκαετία πυροδότησε τον σχεδιασμό καινοτόμων αντινεοπλασματικών θεραπειών, των οποίων η εφαρμογή στην κλινική πράξη αναμένεται κατά την τέταρτη δεκαετία⁴¹².

Η πρωτεΐνη p53, ως μεταγραφικός παράγοντας, ελέγχει άμεσα τη μεταγραφή περισσότερων από 100 γονιδίων, ενώ εκτιμάται ότι τα γονίδια που ελέγχονται έμμεσα υπερβαίνουν τα 1000⁴¹³. Δύο μοτίβα συναινετικών αλληλουχιών (5' RRRCA/TT/AGYYY 3', όπου R: πουρίνη, C: κυτοσίνη, A: αδενίνη, T: θυμίνη, G: γουανίνη, Y: πυριμιδίνη) τα οποία διαχωρίζονται από κενό αποτελούμενο από 0–21 ζεύγη βάσεων συνθέτουν τα στοιχεία απόκρισης στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων της p53⁴¹⁴.

Η p53 μέσω ελέγχου της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων της ενέχεται σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, όπως η απόπτωση, η αυτοφαγία, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η επιδιόρθωση του DNA, η αναστολή της αγγειογένεσης, η αναστολή των ελευθερών ριζών, η κυτταρική επιβίωση, η ανοσία, η αυτορρύθμιση, ο μεταβολισμός και η πρόωρη γήρανση. Η καταστολή του όγκου, η προεξάρχουσα αναπτυξιακή διαδικασία που ελέγχεται από την p53, ίσως αποτελεί εξέλιξη του πρωταρχικού της ρόλου στον έλεγχο της φυσιολογικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης καθώς και στον περιορισμό της αυτοανανέωσης των stem cells, ο οποίος εκδηλώνεται ακόμη και σε βασικά επίπεδα πρωτεΐνης p53. Η αναχαίτιση της ισχαιμίας, της γήρανσης και της νευροεκφύλισης διαμεσολαβείται επίσης από την πρωτεΐνη p53⁴¹³.

Αξιοσημείωτος αριθμός των γονιδίων-στόχων της πρωτεΐνης p53 παρουσιάζει μείωση της έκφρασης. Καίριο ρόλο διαδραματίζει η πυροδοτούμενη από την πρωτεΐνη p53 επαγωγή της έκφρασης της p21, η οποία παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb: retinoblastoma protein), καταστέλλοντας τα γονίδια που ρυθμίζονται από τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες και ενέχονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στην καταστολή των γονιδίων-στόχων συμβάλλουν, επίσης, η σύνδεση της πρωτεΐνης p53 με υποκινητές που φέρουν το στοιχείο απόκρισης CDE/CHR^{415,416} –αλληλουχία που αναγνωρίζεται από διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες– καθώς και η άμεση σύνδεση της πρωτεΐνης p53 σε ειδικά στοιχεία απόκρισης^{417,418}.

1.3.11.2. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TP53 ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53

Το γονίδιο TP53 εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17p13.1). Αποτελείται από 11 εξόνια με τρεις γνωστούς υποκινητές: δύο πριν από το εξόνιο 1, που δίνουν γένεση στην p53 πλήρους μήκους, και έναν σε εσωτερική θέση στο ιντρόνιο 4. Είναι γνωστές 12 ισομορφές, μερικές εκ των οποίων έχουν λειτουργίες όμοιες με την p53 πλήρους μήκους, ενώ άλλες δρουν ως ανταγωνιστές αυτής.

Η πρωτεΐνη p53 αποτελείται από 393 αμινοξέα και παρουσιάζει τις εξής διακριτές λειτουργικές περιοχές^{419, 420}:

- 1) TAD (transcription-activation domain): αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, η οποία υποδιαιρείται στις εξής περιοχές:
 - α. AD (activation domain) 1, αποτελούμενη από τα αμινοξέα 1-42, υπεύθυνη για την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και για την απόπτωση
 - β. AD2, αποτελούμενη από τα αμινοξέα 43-63, υπεύθυνη για την πρόωρη γήρανση
- 2) PD (proline domain), αποτελούμενη από τα αμινοξέα 64-92, υπεύθυνη για την απόπτωση.
- 3) DBD (DNA-binding core domain): περιοχή πρόσδεσης στο DNA που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 102-292.
- 4) Καρβοξυτελική περιοχή, προϊόν εναλλακτικού ματίσματος, η οποία υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις καθορίζοντας τη σύνδεση στο DNA και την επιλογή της κυτταρικής απόκρισης και περιλαμβάνει τις εξής επιμέρους περιοχές:
 - α. NLS (nuclear localization signaling domain): περιοχή σήματος εντόπισης στον πυρήνα που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 316-324, 370-376, 380-386
 - β. OD (homo-oligomerisation domain): περιοχή ολιγομερισμού που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 325-356
 - γ. NES (Nuclear export signaling domain): περιοχή σηματοδότησης εξόδου από τον πυρήνα που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 340-353

1.3.11.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ p53

Το 1997 προστέθηκαν δύο νέα μέλη στην οικογένεια p53, οι πρωτεΐνες p63 και p73. Η αρχιτεκτονική των πρωτεϊνών της οικογένειας p53 έχει διατηρηθεί κατά την εξελικτική διαδικασία, επιδεικνύοντας αξιοσημείωτη ομολογία αλληλουχιών στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση στο DNA, σε αντιπαράθεση με την ποικιλομορφία της καρβοξυτελικής περιοχής. Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων από διαφορετικούς υποκινητές αποτελούν οι ισομορφές TA, που περικλείουν τις περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, και οι ισομορφές DN, που στερούνται της μεταγραφικής περιοχής αλλά πρόσφατα αποδείχτηκε ότι οφείλουν τη μεταγραφική τους δραστηριότητα σε δύο περιοχές: μία πλησίον της PD και μία μεταξύ των τμημάτων OD και SAM (Sterile Alpha Motif). Οι p63 και p53 ελέγχουν κοινά γονίδια-στόχους που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο – p21, p57– και την απόπτωση –Bax, TRAILR (TNF related apoptosis inducing ligand receptor), TNFR (TNF receptor)– αλλά παρουσιάζουν και διακριτές λειτουργίες⁴²⁰.

1.3.11.4. Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53

Η ρύθμιση των βασικών επιπέδων της p53 σε απουσία κυτταρικού *stress* υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο χάρη στον πολύπλοκο ρόλο της πρωτεΐνης MDM2 (murine double minute 2), την πραγματώση του

οποίου συνδράμει η πρωτεΐνη MDMX⁴¹². Η σύνδεση της MDM2 στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης p53, η δράση της MDM2 ως E3 λιγκάσης με συνακόλουθη ευόδωση της αποδόμησης της p53 μέσω του πρωτεοσώματος⁴¹², η παρεμπόδιση της ακετυλίωσης της p53 μέσω παρεκτόπισης της p300 από την p53, η αποδόμηση της πρωτεΐνης PCAF (p300/CBP associated factor) και η στράτευση του ενζύμου HDAC1 (Histone Deacetylase 1) συνθέτουν τη διαμεσολαβούμενη από την MDM2 αναστολή της p53⁴¹³. Η p53 *per se* ενισχύει τις διεργασίες αυτές, επάγοντας την έκφραση της MDM2⁴¹².

Η MDM2 λειτουργεί ως δικλείδα ασφαλείας που επιτρέπει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 μόνο όταν απαιτείται η επιτέλεση συγκεκριμένου σκοπού. Η μείωση των επιπέδων της MDM2, η αναχαίτιση της δράσης της ως E3 λιγκάσης, η εξασθένιση της ικανότητας σύνδεσης της MDM2 στην p53 και η δέσμευση της MDM2 από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF (alternative reading frame), αίρουν την ανασταλτική δράση της MDM2, ευοδώνοντας την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53⁴¹². Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται άμεσα από τη βλάβη του DNA⁴²¹, την υποξία⁴¹⁴, το ριβοσωματικό *stress*⁴²² καθώς και από το μεταβολικό *stress*⁴²³.

1.3.11.5. ΠΡΩΤΕΪΝΗ p53 : “Ο ΦΡΟΥΡΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ”

Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 στην καταστολή του όγκου είναι διττός: Η επαγόμενη από την p53 αναστολή του κυτταρικού κύκλου, διαμεσολαβούμενη από την ενεργοποίηση της CDKI (cyclin-dependent kinase inhibitor protein) p21 και από τον έλεγχο επιπρόσθετων γονιδίων, όπως του 14-3-3-Sigma και του GADD (Growth Arrest and DNA Damage) 45, παρέχει στα κύτταρα τη δυνατότητα της επιδιόρθωσης του DNA. Στην επίτευξη του σκοπού αυτού συμβάλλει και η ευόδωση της επιβίωσης των κυττάρων χάρη στην επαγόμενη από την p53 αύξηση της έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως της BAX (Bcl-2-associated X protein), της NOXA και της PUMA. Η έκφραση ποικίλων γονιδίων, όπως του DDB2 (damaged DNA binding protein 2) και του FANCC (Fanconi anemia gene), πυροδοτεί την επιδιόρθωση του DNA. Εάν η βλάβη είναι μη επιδιορθώσιμη, τα κύτταρα οδηγούνται σε πρόωρη γήρανση ή απόπτωση. Επαγόμενες από την πρωτεΐνη p53 αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η PAI-1 (Plasminogen activator 1) και η p21, προάγουν την πρόωρη γήρανση, η οποία όχι μόνο αποτελεί κυτταροστατική απάντηση με στόχο τη σταθεροποίηση της νόσου, αλλά στρέφει επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα εναντίον του όγκου.

Τον ευοδωτικό στην απόπτωση ρόλο της πρωτεΐνης p53 συνθέτει η επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων που πυροδοτούν την απόπτωση –PUMA, Bax, Bid, CD95, TRAILR2– και την οξειδωση^{424,425} και η παραγωγή ελεύθερων ριζών σε κύτταρα με ανέπαφα μιτοχόνδρια, επιρρεπή στον πυροδοτούμενο από την πρωτεΐνη p53 κυτταρικό θάνατο⁴²⁶.

Στην καταστολή του όγκου συμβάλλουν η παρεμπόδιση της άθροισης ογκογόνων βλαβών και η εξάλειψη των κατεστραμμένων κυττάρων, σκιαγραφώντας την ιδιότητα της p53 ως “φρουρού του γονιδιώματος”⁴²⁷.

1.3.11.6. “ΕΥ ΕΧΕΙΝ” VERSUS “ΕΓΚΛΗΜΑ ΚΑΙ ΤΙΜΩΡΙΑ”

Το επικρατές δόγμα σύμφωνα με το οποίο η πρωτεΐνη p53 αναχαίτιζει την καρκινογένεση μέσω “εγκλήματος και τιμωρίας” αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω επαγωγής κυτταρικού θανάτου ή αναστολής του κυτταρικού κύκλου βρίσκεται υπό αναθεώρηση. Πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης ότι ο ογκοκατασταλτικός ρόλος της πρωτεΐνης p53 διευρύνεται για να συμπεριλάβει τη διαφύλαξη της σταθερότητας του γονιδιώματος μέσω ρύθμισης

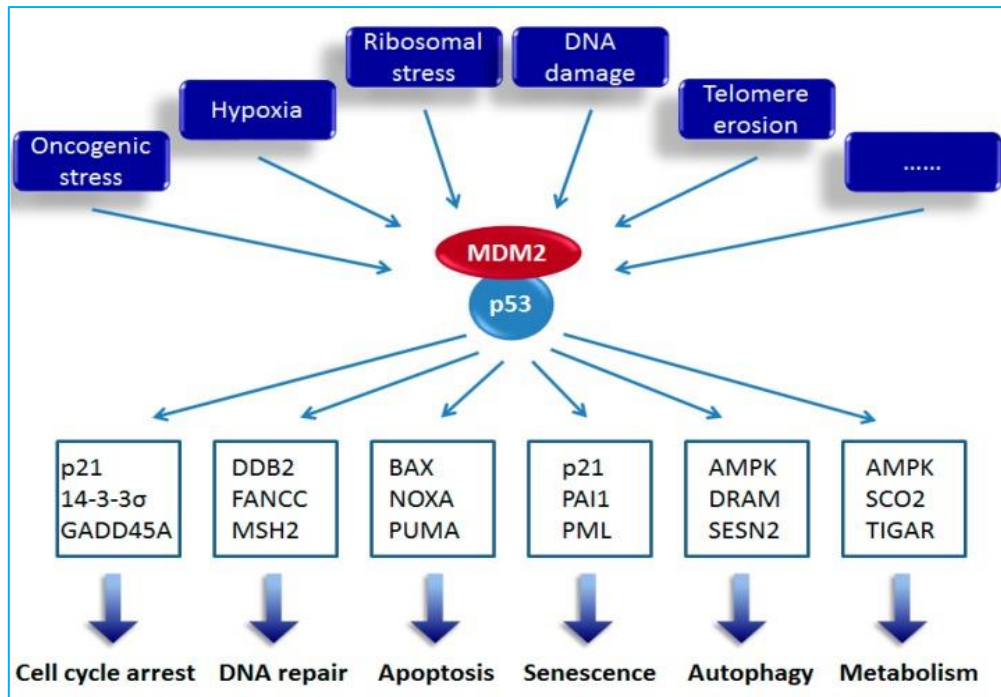
των ελεύθερων ριζών καθώς και τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού, διασφαλίζοντας το “ευ έχειν” των κυττάρων και εγκαταλείποντας την “τιμωρία” ως έσχατη λύση⁴²³.

Αμφίσημος είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 αναφορικά με την παραγωγή ελεύθερων ριζών: ο *bona fide* ευοδωτικός στην παραγωγή των ελεύθερων ριζών ρόλος της αντιτίθεται στην καταστολή της παραγωγής ελεύθερων ριζών που παρατηρείται σε συνθήκες ήπιου *stress* μέσω επαγωγής της έκφρασης πληθώρας πρωτεϊνών, όπως οι σεστρίνες, η TIGAR (TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase) και η GLS2 (glutaminase 2). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και η ένταση του στρεσογόνου ερεθίσματος καθορίζουν την επιλογή μεταξύ της παραγωγής ή της εκ διαμέτρου αντίθετης αναστολής των ελεύθερων ριζών⁴²⁶. Οι ελεύθερες ρίζες με τη σειρά τους ενέχονται σε κρίσιμες οδούς σηματοδότησης με γνωστό ρόλο στην ογκογένεση (PI3K/Akt, JAK/STAT, PLC (phospholipase C)/PKC, MAPK, IKK (IκB kinase) /NFκB)⁴²⁸.

Επιπρόσθετη συνιστώσα του ογκοκατασταλτικού ρόλου της p53 είναι η συμβολή της στην αυτοφαγία⁴²⁹⁻⁴³¹: Η μεν πυρηνική της μορφή ευοδώνει την αυτοφαγία⁴³²⁻⁴³⁴, ώστε να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος και να εξοικονομηθεί ATP για τις διαδικασίες επιδιόρθωσης, η δε κυτταροπλασματική της μορφή καταστέλλει την αυτοφαγία⁴³⁵ με στόχο την ολοκλήρωση του προγράμματος του κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, η επαγόμενη από την πρωτεΐνη p53 αναστολή του mTORC1 (mTOR complex 1) ως απόκριση σε ερεθίσματα που προκαλούν βλάβη στο DNA διαμεσολαβείται από την έκφραση ποικίλων αναστολέων, όπως IGFBP-3 (insulin like growth factor binding protein 3), TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) και PTEN. Αποσκοπεί στην καταστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών και στην εξοικονόμηση ATP για τις διαδικασίες επιδιόρθωσης καθώς και στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση κατεστραμμένων επιβλαβών κυτταρικών στοιχείων^{436,437}. Η συμβολή της πρωτεΐνης p53 στην αναστολή της γλυκόλυσης, και στην ενίσχυση της μιτοχondριακής αναπνοής παρεμποδίζει το φαινόμενο Warburg, στερώντας από τα καρκινικά κύτταρα ένα σημαντικό προνόμιο επιβίωσης⁴³⁸.

Νέα διάσταση στον ογκοκατασταλτικό ρόλο της πρωτεΐνης p53 προσδίδει η ικανότητα της να διαμορφώνει το ανοσολογικό *milieu* του όγκου, ενισχύοντας τη λειτουργία των κυττάρων φυσικών φονέων NK (natural killer cells), τροποποιώντας την αντιγονοπαρουσιαστική ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος προς την κατεύθυνση της ενίσχυσης της διέγερσης της ανοσολογικής απόκρισης, με απώτερο στόχο την εξάλειψη του όγκου.

Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 στον καρκίνο εμπλουτίζεται από τον έλεγχο που ασκεί στην έκφραση και την ωρίμανση ποικίλων miRNA, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, ελέγχουν την έκφραση πληθώρας πρωτο-ογκογονιδίων και αναστέλλουν ογκογόνες σηματοδοτικές οδούς^{439,440}. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πυροδότηση από την πρωτεΐνη p53 των miRNA 34a-c⁴⁴¹ που συνεπάγεται την αναστολή του κυτταρικού κύκλου καθώς και του mi RNA 34s που ενέχεται στην επαγωγή της απόπτωσης⁴⁴².



Εικόνα 1.8. Ως απόκριση στο κυτταρικό stress η ενεργοποίηση της p53 ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων-στόχων της που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση του DNA, την απόπτωση, την πρόωρη γήρανση των κυττάρων, την αυτοφαγία και τον μεταβολισμό, διεργασίες που ενέχονται στην καταστολή του όγκου. Πηγή: Hao Q, Cho WC. Battle Against Cancer: An Everlasting Saga of p53. Evans P, ed. International Journal of Molecular Sciences. 2014;15(12):22109-22127. doi:10.3390/ijms151222109.

1.3.11.7. “ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ Ή ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ;”

Η απάντηση στο εύλογο ερώτημα που ανακύπτει σχετικά με τον τρόπο που καθορίζεται η επιλογή ανάμεσα στην κυτταρική επιβίωση και στον κυτταρικό θάνατο ως απόκριση στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 δίνεται, πιθανότατα, από την έκταση της βλάβης, τη διάρκεια του *stress*, το περιβάλλον του κυττάρου και το είδος του ιστού, συνιστώσες που συνθέτουν την επιλογή των γονιδίων-στόχων. Ισχυρό *stress* πυροδοτεί υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και συνακόλουθη ενεργοποίηση γονιδίων που ενέχονται στην απόπτωση με τους υποκινητές των οποίων η πρωτεΐνη p53 συνδέεται με χαμηλή συγγένεια, ενώ η υψηλή συγγένεια της πρωτεΐνης p53 με τους υποκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο επιτρέπει την ενεργοποίηση αυτών σε ήπιο *stress*^{413,426}. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών p53 –φωσφορυλίωση, ακετυλίωση και σύνδεση με ubiquitin– οδηγούν σε εκλεκτική ενεργοποίηση της μεταγραφής των επιμέρους γονιδίων-στόχων, καθορίζοντας την έκβαση της σηματοδότησης. Η εγγενής ικανότητα της πρωτεΐνης p53 να επιλέγει διακριτά γονίδια-στόχους πηγάζει από την ανεξάρτητη ή συνεργιστική δράση των δύο επιμέρους περιοχών ενεργοποίησης της μεταγραφής στο αμινοτελικό άκρο, TAD1 και TAD2⁴¹³. Επίσης, η επιλεκτική σύνδεση ποικίλων πρωτεϊνών στην πρωτεΐνη p53 καθώς και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου TP53 επάγουν διακριτές κυτταρικές αποκρίσεις.

1.3.11.8. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ TP53

Οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, η συχνότερη γενετική αλλαγή που ενέχεται στην ογκογένεση⁴⁴³, ανιχνεύονται στο 50% των ανθρώπινων όγκων. Η σύγχρονη βάση καταγραφής των μεταλλάξεων TP53 αποκαλύπτει την παρουσία 45,000 μεταλλάξεων, η πλειοψηφία των οποίων είναι παρερμηνεύσιμες. Πρωταγωνιστούν έξι “θερμά” σημεία –R175,G245,R248,R249,R273,R282– στην περιοχή του γονιδίου η οποία κωδικοποιεί το τμήμα της πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με τις ειδικές θέσεις πρόσδεσης στο DNA.

Συνήθως οι μεταλλάξεις δίνουν γένεση σε πρωτεΐνες p53 με απώλεια των λειτουργιών της φυσιολογικής p53, οι οποίες ενδέχεται να αναστέλλουν επιπλέον τη δράση των φυσιολογικών p53 με “αρνητικό κυρίαρχο τρόπο”, σχηματίζοντας τετραμερή αποτελούμενα από μεταλλαγμένες και φυσιολογικές πρωτεΐνες p53 ή συναθροίσεις τετραμερών⁴⁴⁴. Επιπλέον, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53 αποκτούν νέες ογκογόνες ιδιότητες μεταξύ των οποίων προεξάρχουν η πυροδότηση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία και η συνομιλία των καρκινικών κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η αστάθεια του γονιδιώματος, η φλεγμονή, η αγγειογένεση, το διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων ευοδώνονται επίσης από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τις νέες ογκογόνες λειτουργίες των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών p53 ταξινομούνται σε 4 διακριτές, αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες κατηγορίες:

- 1) Η διατήρηση της αμινοτελικής περιοχής των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών p53 συνεπάγεται την ικανότητα σύνδεσης τους στο DNA με συνακόλουθη άμεση ή έμμεση ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, αν και η σύνδεση τους στα συνήθη στοιχεία απόκρισης διαταράσσεται⁴⁴⁵.
- 2) Η διαμεσολαβούμενη από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53 ενίσχυση της μεταγραφής απορρέει από τη δημιουργία συμπλέγματος με πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων και λοιπών πρωτεϊνών⁴⁴⁶.
- 3) Μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι p63 και p73, αποκλείονται από τη σύνδεση στις συνήθεις θέσεις DNA ως επακόλουθο της δέσμευσης τους από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53⁴⁴⁷.
- 4) Η σύνδεση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών p53 με πρωτεΐνες που δεν αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες ευοδώνει την ογκογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA, η οποία απορρέει από τη σύνδεση της p53 με την νουκλεάση MRE11 (meiotic recombination 11)⁴⁴⁸.

Νέες ογκογόνες λειτουργίες των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών p53 αναδύονται από τη συμβολή τους στην έκφραση πολυάριθμων miRNA- όπως το miRNA 128-2, το οποίο προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την επαγόμενη από τη χημειοθεραπεία απόπτωση⁴¹³.

Η πρόσφατη ανακάλυψη ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53 παρουσιάζουν συμπεριφορά που προσομοιάζει με αυτήν των priions –αλλαγή στη διαμόρφωση τους στο χώρο και επιτάχυνση της συσσώρευσης τους σε σχηματισμό αμυλοειδούς με τη συνάθροιση φυσιολογικών p53 πρωτεϊνών, μεταλλαγμένων p53 και p63 ή p73⁴⁴⁹– ίσως ερμηνεύει την αναστολή των πρωτεϊνών μελών της οικογένειας p53⁴⁵⁰.

1.3.11.9. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ TP53 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Πληθώρα μελετών αναδεικνύουν τις μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 ως σήμα κατατεθέν της αποδιαφοροποίησης των όγκων θυρεοειδούς^{6,451-457}. Απαντώνται σε υψηλό ποσοστό τόσο του αδιαφοροποίητου καρκινώματος –42%⁴⁵⁵ έως 83%⁴⁵¹ ή 86%⁴⁵² – όσο και του καρκινώματος

“χαμηλής διαφοροποίησης” (26⁴⁵⁷–43%⁴⁵⁶). Το ποσοστό ανεύρεσης των TP53 μεταλλάξεων στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς παρουσιάζει αξιοσημείωτο εύρος: 0–27%^{452,458,459}. Το σύνολο των μεταλλάξεων που έχουν ανακοινωθεί συμβαίνουν στα γνωστά θερμά σημεία στα εξόνια 5-9 και αφορούν στο κωδικόνιο 273.

Το ενδιαφέρον προσελκύουν τα αποτελέσματα πειραμάτων σε ποντίκια σύμφωνα με τα οποία οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 αναδεικνύονται ως ενορχηστρωτής της εξέλιξης των θηλωδών όγκων θυρεοειδούς που φέρουν την αναδιάταξη RET/PTC⁴⁶⁰ καθώς και των θυλακιωδών όγκων που γεννώνται από την απαλοιφή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN⁴⁶¹. Εξάλλου, η συνεργιστική δράση των μεταλλάξεων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 με τη μετάλλαξη BRAF δυνητικά κατευθύνει την εξέλιξη των διαφοροποιημένων όγκων προς αναπλαστικά καρκινώματα^{462,463}. Εικάζεται ότι η εξέλιξη των όγκων θυρεοειδούς προϋποθέτει δύο βήματα: τη στροφή των καρκινικών κυττάρων προς την αποδιαφοροποίηση και τη δράση των μεταλλαγμένων p53 πρωτεϊνών που προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα επιβίωσης κατά τη φυσική επιλογή⁴⁶⁴.

Από διαφορετική οπτική γωνία φωτίζει τον ρόλο των μεταλλάξεων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 στο *continuum* της αποδιαφοροποίησης η συσχέτιση τους με την αστάθεια του γονιδιώματος που φαίνεται να σκιαγραφεί έναν φαύλο κύκλο. Διατυπώνεται η υπόθεση ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 αποτελούν απόρροια της αστάθειας του γονιδιώματος⁴⁶⁵. Από την άλλη πλευρά, μετάλλαξη του γονιδίου TP53 που αδρανοποιεί την εξαρτώμενη από τους παράγοντες MRE11/ATM (ataxia telangiectasia mutated) απόκριση στη βλάβη του DNA οδηγεί σε χρωμοσωμική αναδιάταξη και πλημμελή έλεγχο της φάσης G2/M. Δεδομένου του ρόλου της ATM στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος και στην αποτελεσματικότητα ορισμένων αντινεοπλασματικών φαρμάκων, η αντίσταση των όγκων που φέρουν τη μετάλλαξη αυτή στη θεραπεία θεωρείται αναμενόμενο εύρημα⁴⁶⁶.

Νεότερα ερευνητικά δεδομένα θέτουν υπό αμφισβήτηση την επικρατούσα αντίληψη ότι οι μεταλλάξεις TP53 αποτελούν αποκλειστικά ορόσημο της αποδιαφοροποίησης των καρκινωμάτων θυρεοειδούς, αναδεικνύοντας την έκφραση αυτών στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς. Οι Nikiforova και συνεργάτες διαπίστωσαν την παρουσία μεταλλάξεων TP53 στο 3.5% του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς και στο 22% του ογκοκυτταρικού θυλακιδώδους καρκινώματος⁴⁶⁷. Σύμφωνα με τον “Ατλαντα του Γονιδιώματος του Καρκίνου”, στο 3.7% του θηλώδους παρατηρούνται μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 καθώς και σε επιπρόσθετα ογκοκατασταλτικά γονίδια: RB1 (retinoblastoma 1), NF1/2 (Neurofibromatosis type 1), MEN1, PTEN⁴⁶⁸. Υπέρ του αναδυόμενου ρόλου των μεταλλάξεων TP53 στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς συνηγορούν τα ευρήματα της μελέτης των Zhao και συνεργατών⁴⁶⁹, αποκαλύπτοντας ότι ορισμένα από τα γονίδια τα οποία υπερεκφράζονται σε αυτόν τον τύπο καρκίνου συγκριτικά με τον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό εμπλέκονται στις οδούς σηματοδότησης που επάγονται από την πρωτεΐνη p53. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν μία ενδιαφέρουσα πτυχή της διαμεσολαβούμενης από την πρωτεΐνη p53 σηματοδότησης στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς: την αλληλεπίδραση αυτής με την πρωτεΐνη S100A6, πρωταγωνιστή ογκογόνων οδών που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Στατιστικά σημαντική διαφορά της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της p53 μεταξύ του θηλώδους καρκινώματος και του μη νεοπλασματικού θυρεοειδικού ιστού ανέδειξε πρόσφατα η μελέτη των Dwivedi και συνεργατών, προτείνοντας την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p53 ως καρκινικού δείκτη με ευαισθησία και ειδικότητα ίση με 85.29% και 70.65%, αντίστοιχα, και διαγνωστική ακρίβεια ίση με 76.88%⁴⁷⁰. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπόθεση αυτή, αλλά χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

1.3.11.10. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53 ΣΤΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το *status* της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς προσεγγίζεται μέσω του ανοσοϊστοχημικού προσδιορισμού αυτής υπό το πρίσμα της γνώσης ότι η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 δεν ανιχνεύεται με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο λόγω του σύντομου χρόνου ημίσειας ζωής της (20 min)⁴⁷¹. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς είναι διττή: Αντανακλά είτε την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 είτε, σε απουσία μεταλλάξεων, την υπερέκφραση της p53 πρωτεΐνης⁴⁷²⁻⁴⁷⁴.

Η υπερέκφραση της p53 έχει θεωρηθεί έμμεσος δείκτης της λειτουργικής αδρανοποίησης της, απόρροια διεργασιών εν πολλοίς ανεξερεύνητων που, μεταξύ άλλων, αίρουν την ικανότητα της να επάγει την MDM2, οδηγώντας στην άθροιση της στον πυρήνα⁴⁷⁵. Αξιοσημείωτη είναι η διαπιστωθείσα υπερέκφραση της p53 στο 73% των λεμφαδενικών μεταστάσεων του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς ανεξαρτήτως της υπερέκφρασης της στον πρωταρχικό όγκο⁴⁷⁶.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 στο 11-59% του διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς,⁴⁷¹ θεωρείται ότι υπονομεύει την ευαισθησία και την ειδικότητα της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της πρωτεΐνης p53 ως δείκτη του *status* του γονιδίου TP53⁴⁷⁷. Η κλινική σημασία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της p53 στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς παραμένει αμφιλεγόμενη⁴⁷⁷⁻⁴⁸⁶.

Όσον αφορά το μοριακό υπόβαθρο της αδρανοποίησης της πρωτεΐνης p53 στο καρκίνωμα θυρεοειδούς, έχουν προταθεί οι εξής μηχανισμοί⁴⁸⁷: Πρώτον, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών HMGA (high mobility group A factors) – HMGA1a, HMGA1b και HMGA2 – οδηγεί σε αδρανοποίηση των πρωτεϊνών p53, παρεμποδίζοντας τη σύνδεση τους με το DNA⁴⁸⁸⁻⁴⁹⁰. Δεύτερον, η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης PATZ1 (POZ/BTB and AT hook containing zinc finger protein) που παρατηρείται στο αναπλαστικό καρκίνωμα θυρεοειδούς και στο καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης αίρει την επαγόμενη από την πρωτεΐνη p53 σηματοδότηση, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη PATZ1 ευοδώνει επαγόμενες από την p53 οδούς που αναστέλουν την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT: epithelium mesenchyme transition), τη μετανάστευση των κυττάρων και τη διήθηση⁴⁹¹. Τρίτον, η απουσία έκφρασης της ABRO 1 (AbraXas brother 1), πρωτεΐνης υπεύθυνης για τη σταθεροποίηση της p53, στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε αποδόμηση της πρωτεΐνης p53, ενισχύοντας την εξέλιξη του όγκου⁴⁹². Τέταρτον, η υπερέκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου PBF στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς προάγει τη διαμεσολαβούμενη από την ubiquitin αποδόμηση της πρωτεΐνης p53^{493,494}. Πέμπτον, η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης HUWE1 (HECT, UBA, and WWE domain-containing protein 1) στο καρκίνωμα θυρεοειδούς αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών MDM-S, MDM4-211 και MDM2⁴⁹⁵, οι οποίες με τη σειρά τους διαμεσολαβούν τόσο την αποδόμηση της πρωτεΐνης p53 όσο και την αναστολή της σύνδεσης της με τα γονίδια-στόχους της⁴⁹⁶. Επιπλέον, ένας φαύλος κύκλος που οδηγεί στην αδρανοποίηση της p53 στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς πηγάζει από την απορρύθμιση της οδού p16/p38MAPK/p53/WIP 1 (Wild type p53 induced phosphatase 1) λόγω της επαγόμενης από την πρωτεΐνη p53 υπερέκφρασης της φωσφατάσης WIP 1, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αναστολή των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p16/p38MAPK/p53⁴⁹⁷. Τέλος, η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης p53 απορρέει από την απώλεια της έκφρασης του παράγοντα HIPK2 (Homeodomain Interacting Protein Kinase 2), που αποτελεί ενεργοποιητή αυτής.

Η προγνωστική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 περιπλέκεται από το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες THBS1 (thrombospondin 1) και IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3), καίρια

μελη της διαμεσολαβούμενης από την p53 σηματοδοτικής οδού, ενέχονται στην προαγωγή του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων καθώς και του μεταστατικού δυναμικού^{498,499}. Καταστολή της επαγόμενης από τον θυρεοειδικό μεταγραφικό παράγοντα 2 (FOXΕ1: forkhead box E1) καταστολής των πρωτεϊνών αυτών ευοδώνει τη γένεση και εξέλιξη των όγκων στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς που σχετίζεται με τον γενετικό πολυμορφισμό rs965513, ο οποίος εδράζεται στον γενετικό τόπο 9q22. Μηχανισμό αναστολής της μεταγραφής του θυρεοειδικού μεταγραφικού παράγοντα 2 αποτελεί η σύνδεση της μυσσίνης 9 (MYH9) με την ισομορφή C του μη κωδικοποιητικού RNA (lncRNA) PTCSC2 (papillary thyroid cancer susceptibility candidate 2)⁵⁰⁰.

Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη p53 αποτελεί δυνητικό στόχο καινοτόμων αντινεοπλασματικών θεραπειών, η συνέχιση της έρευνας με σκοπό τη διαλεύκανση των μεταβολών της έκφρασης της στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αποκτά ιδιαίτερη σημασία.

1.3.12. Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NFκΒ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Πληθώρα ερευνητικών δεδομένων αναδεικνύουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ^{501,502} τόσο στο αναπλαστικό όσο και στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς⁵⁰³. Ενδεικτικά παρατίθενται τα εξής: Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες-προϊόντα των γενετικών ανασυνδυασμών RET/PTC και οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες RAS και BRAFV600E⁵⁰³ ενέχονται στην ενεργοποίηση του NFκΒ. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η επαγόμενη από τη χιμαιρική πρωτεΐνη PAX8/PPARγ ενεργοποίηση του NFκΒ στο θυλακίωδες καρκίνωμα θυρεοειδούς⁵⁰⁴. Επίσης, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη συμβολή του NFκΒ στη διαμόρφωση επιθετικού φαινότυπου των όγκων δρώντας ως διαμεσολαβητής του επαγόμενου από τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη BRAFV600E διηθητικού και μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων⁵⁰⁵. Η συσχέτιση της έκφρασης του NFκΒ με την εκδήλωση λεμφαδενικών μεταστάσεων έχει αποδειχτεί στατιστικά σημαντική⁵⁰⁶. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ο NFκΒ διαμεσολαβεί τη συμβολή του hsa-miRNA-310b στη γένεση λεμφαδενικών μεταστάσεων όσον αφορά το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς⁵⁰⁷. Επιπλέον, γονίδια-στόχους του NFκΒ αποτελούν τα αντιαποπτωτικά γονίδια XIAP⁵⁰⁸. Τέλος, η συμβολή του NFκΒ ενέχεται στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Twist 1 που ευοδώνει την EMT στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς⁵⁰⁹.

1.3.13. Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ OPG/ RANKL/TRAIL ΩΣ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ NFκΒ

Ενδιαφέρον αλλά ανεξερεύνητο πεδίο στον καρκίνο θυρεοειδούς συνιστά η έκφραση του RANKL (receptor activator of NFκΒ ligand), της οστεοπροτεγερίνης (OPG) –ψευδούς υποδοχέα του RANKL– και του TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) ο οποίος όχι μόνο ανταγωνίζεται με τον RANKL όσον αφορά τη σύνδεση της OPG αλλά ενεργοποιεί *per se* τον NFκΒ. Έρευνα της μελέτης των μορίων αυτών στον καρκίνο θυρεοειδούς αποτελεί η τεκμηριωμένη συμβολή του NFκΒ στον καρκίνο θυρεοειδούς,

1.3.13.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ OPG/ RANKL/ RANK

Στην ανατολή της δεκαετίας του 1980, δόθηκε το έναυσμα για την ανακάλυψη των μορίων OPG/RANKL/RANK με τη διατύπωση της υπόθεσης από τους Rodan και Martin ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στους οστεοβλάστες και στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών ενορχηστρώνει την

οστεοκλαστογένεση και την οστική απορρόφηση⁵¹⁰. Η ερευνητική σκέψη στράφηκε στην αναζήτηση ενός παράγοντα, άγνωστου μέχρι τότε, ο οποίος θεωρήθηκε ότι διαμεσολαβεί τη συνομιλία μεταξύ αιμοποιητικών κυττάρων και κυττάρων προερχόμενων από τη σειρά των οστεοβλαστών^{511,512}.

Το 1997 δύο ομάδες ερευνητών ανακάλυψαν ότι η αλληλεπίδραση των μελών της οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων –TNF – με τους υποδοχείς τους – TNFR – ενορχηστρώνει τον σχηματισμό των οστεοκλαστών. Τα πειράματα των Simonett και συνεργατών – ερευνητών της Amgen – οδήγησαν στην ανακάλυψη της OPG, η οποία αποτελεί διαλυτό μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του TNF και ρυθμίζει την οστική πυκνότητα μέσω αναστολής ωρίμανσης των οστεοκλαστών⁵¹³. Μερικούς μήνες αργότερα, ερευνητές στην Snow Brand Milk Products Company στην Ιαπωνία με επικεφαλής τον Tsuda απομόνωσαν από τους ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου (IMR 90) μία γλυκοπρωτεΐνη που συνδέει την ηπαρίνη η οποία ανέστειλε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την οστεοκλαστογένεση και αποδείχθηκε ότι είναι ταυτόσημη με την OPG, το νέο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του TNF⁵¹⁴. Η ανακάλυψη της OPG χάραξε το δρόμο για την ανακάλυψη του RANKL, που ανήκει στην οικογένεια του TNF και προάγει τη γένεση των οστεοκλαστών σε απόκριση σε όλα τα γνωστά ερεθίσματα, και του υποδοχέα του – RANK^{515, 516}.

Αξιοσημείωτο είναι ότι οι Anderson και συνεργάτες είχαν, πριν από τις ομάδες της Amgen και της Snowbrand, ανακαλύψει τον RANKL και τον RANK ως καιρίους ρυθμιστές της αλληλεπίδρασης μεταξύ των T-λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων⁵¹⁷. Παρομοίως, τα πειράματα των Wong και συνεργατών είχαν οδηγήσει στην ανακάλυψη του TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) και του υποδοχέα του (TRANCE-R:TRANCE receptor), μορίων που αποδείχθηκαν ταυτόσημα, αντίστοιχα, με τον RANKL και τον RANK, κατά την έρευνα της διαμεσολαβούμενης από τα T-λεμφοκύτταρα ανοσολογικής απόκρισης⁵¹⁸.

1.3.14. RANKL

Ο RANKL αναφέρεται επίσης ως OPGL (osteoprotegerin ligand), ODF (osteoclast differentiation factor) και TRANCE, βάσει των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων του που οδήγησαν στην ανακάλυψη του. Πρόκειται για τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 45 kDa, αποτελούμενη από 316 αμινοξέα, μέλος της οικογένειας του TNF. Κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFSF11, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 13 στη θέση 13q14 και περικλείει 5 εξόνια. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την 5'UTR περιοχή καθώς και την ενδοκυττάρια και τη διαμεμβρανική περιοχή του RANKL, ενώ τα εξόνια 2-5 κωδικοποιούν την εξωκυττάρια περιοχή αυτού⁵¹⁹. Ομολογία προς την εξωκυττάρια περιοχή των πρωτεϊνών TRAIL, FasL (Fas Ligand) και TNF- α –μελών της οικογένειας του TNF– παρουσιάζει η εξωκυττάρια περιοχή του RANKL.

Ποικίλες ισομορφές του RANKL, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου TNFSF11, έχουν αναγνωρισθεί: η συνδεδεμένη με τη μεμβράνη μορφή, δύο διακριτές διαλυτές μορφές και η βραχεία μορφή από την οποία απουσιάζει ένα τμήμα της ενδοκυττάριας περιοχής. *In vitro* και *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι τόσο οι διαλυτές μορφές όσο και η συνδεδεμένη με τη μεμβράνη μορφή ευοδώνουν την οστεοκλαστογένεση⁵¹⁹⁻⁵²⁴.

Κατεχοχίν θέσεις έκφρασης του RANKL αποτελούν τα οστά –οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα, τα χονδροκύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος– το λεμφικό σύστημα και τα αγγεία. Επίσης, υψηλά επίπεδα έκφρασης του RANKL παρατηρούνται στους πνεύμονες, στον θύμο, στους λεμφαδένες, ενώ χαμηλά επίπεδα έκφρασης απαντώνται στον μυελό των οστών, στο στομάχι, στο περιφερικό αίμα, στο σπλήνα, στον πλακούντα, στα λευκοκύτταρα, στην καρδιά, στον θυροειδή και στους σκελετικούς μυς⁵²⁵.

Η έκφραση του RANKL σε ευρύ φάσμα ιστών και οργάνων υποδηλώνει τον πολύπλευρο ρόλο του. Μεταξύ των παραγόντων που διεγείρουν την παραγωγή του RANKL προεξάρχουν η PTH (parathyroid hormone), η PTHrP (PTH related protein), η PGE₂ (Prostaglandin E₂), η βιταμίνη 1,25(OH)₂D₃, η IL 1, η IL 11, η IL 6, ο TNF-α, ο TGF-β (tumor growth factor-β)⁵²⁶, οι πρωτεΐνες Wnt⁵²⁷, οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS: Lipopolysaccharides)⁵²⁸ και τα γλυκοκορτικοειδή⁵²⁹.

1.3.14.1. RANK

Ο RANK, ο οποίος αναφέρεται επίσης ως TRANCE-R, αποτελεί μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του TNF. Πρόκειται για διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, που απαρτίζεται από 616 αμινοξέα. Κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFRSF11A που εδράζεται στο χρωμόσωμα 18 στη θέση 18q22⁵¹⁷. Το καρβοξυτελικό άκρο του RANK συνιστά την κυτταροπλασματική του περιοχή, ενώ το αμινοτελικό του άκρο, το οποίο περιλαμβάνει 4 ψευδοεπαναλήψεις πλούσιες σε κυστεΐνη και 2 θέσεις γλυκοζυλίωσης, απαρτίζει την εξωκυττάρια περιοχή του, υπεύθυνη για τη σύνδεση του με τον RANKL και τον επακόλουθο ομοτριμερισμό του.

Μολονότι η κατεχοχόν θέση έκφρασης του RANK είναι τα οστά, RANK mRNAs ανευρίσκονται σε ποικίλες θέσεις, όπως στον θύμο, στον μαστό, στο ήπαρ, στον προστάτη, στο πάγκρεας, στους σκελετικούς μυς, στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στους πνεύμονες, στον νεφρό και στο δέρμα^{517,530,531}. Εξωκυττάρια σήματα που ενέχονται στην οστεοκλαστογένεση ρυθμίζουν την έκφραση του RANK, όπως ο παράγοντας διέγερσης αποικίας μακροφάγων M-CSF (macrophages colony stimulating factor), η βιταμίνη 1,25(OH)₂D₃, η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH: follicle stimulating hormone), οι LPS και η IL 3.

Ο RANK, ως τυπικό μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του TNF, δεν διαθέτει ενδογενή δράση κινάσης. Επομένως, η αλληλεπίδραση του RANKL με τον RANK οδηγεί στη στράτευση παραγόντων ικανών να πυροδοτήσουν σηματοδοτικές οδούς υπεύθυνες για τη μεταγωγή του σήματος του RANKL^{532, 533}.

1.3.14.2. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ RANKL

Πολυάριθμοι οδοί μετάδοσης σήματος ενεργοποιούνται από τον RANKL ρυθμίζοντας άμεσα την οστεοκλαστογένεση, την ενεργοποίηση και την επιβίωση των οστεοκλαστών με πρωταγωνιστές την αλληλεπίδραση IKK/NFκB, τον NFAT_c, τη σηματοδοτική ακολουθία MKK6 (Mitogen-activated protein kinase kinase 6)/p38/MITF (Melanogenesis Associated Transcription Factor), τις κινάσες Src και ERK και την ογκοπρωτεΐνη c-Fos⁵³⁴. Το έναυσμα για την ενεργοποίηση των οδών αυτών δίνεται από την αλληλεπίδραση RANKL/RANK και τη συνακόλουθη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών TRAFs (TNF receptor associated factor) – με προεξάρχουσα την TRAF6 – καθώς και των πρωτεϊνών Gab2 (GRB2-associated-binding protein 2), EGFR (Epidermal growth factor receptor), FHL2 (Four and a half LIM domain 2), Lyn (μέλους της οικογένειας Src) και TANK (TRAF family member-associated NFκB activator)^{532, 533, 535,536}.

Σηματοδοτική οδός που διαμεσολαβεί την επαγόμενη από το ασβέστιο ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT_c1/NFAT2 δρα συνεργιστικά με την πυροδοτούμενη από τον RANK σηματοδότηση⁵³⁴. Επίσης, ο RANK ευοδώνει την αλληλεπίδραση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης TMEM 64 (Transmembrane protein 64) με την πρωτεΐνη SERCA2 (ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 2), ρυθμίζοντας την εισροή ασβεστίου και προάγοντας τη δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων CREB (cAMP responsive element binding protein) και NFATc1⁵³⁷.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται κατά τη μεταγωγή του σήματος του RANKL – NFATc1, CREB, NFκB, AP-1, MITF – επάγουν την έκφραση γονιδίων-στόχων τα οποία κωδικοποιούν

πρωτεΐνες με καίριο ρόλο στη διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό των οστεοκλαστών, όπως ο υποδοχέας της Ct, η cMYC, η TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) και η cathepsin K.

Οι Luo και συνεργάτες ανέδειξαν έναν εκ διαμέτρου αντίθετο ρόλο του RANKL που διαμεσολαβείται από έναν πρόσφατα αναγνωρισθέντα υποδοχέα του, τον LGR4 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4). Σύνδεση του RANKL στην εξωκυττάρια περιοχή του LGR4 αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση, ενεργοποιώντας τη σηματοδοτική οδό Gαq/GS3Kβ (glycogen synthase kinase 3β) και καταστέλλοντας τον μεταγραφικό παράγοντα NFATc1. Το γεγονός ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον LGR4 –Lgr4– αποτελεί στόχο του NFATc1 υποδεικνύει έναν δυναμικό μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης. Υπέρ του ρόλου του LGR4 στην οστεοκλαστογένεση συνηγορεί η συσχέτιση της μετάλλαξης του γονιδίου Lgr4 με την οστεοπόρωση⁵³⁸.

Πρόσφατες μελέτες υπογραμμίζουν ότι η επαγόμενη από την αλληλεπίδραση RANKL/RANK σηματοδότηση εκτείνεται πέραν του σκελετού και εμπλέκεται σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών και παθολογικών καταστάσεων, δρώντας ως ο συνδετικός κρίκος μεταξύ αυτών και της βιολογίας των οστών.

1.3.14.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Πολυσχιδής είναι ο ρόλος του RANKL στο ανοσοποιητικό σύστημα θεμελιώνοντας την οστεοανοσολογία, ένα εξελισσόμενο πεδίο έρευνας. Καίριο ρόλο στη συνομιλία του σκελετού με το ανοσοποιητικό σύστημα – τον πυρήνα της οστεοανοσολογίας – διαδραματίζει η ενεργοποίηση του TRAF6 ως επακόλουθο της αλληλεπίδρασης RANKL/RANK. Ο TRAF6 αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών TRAF που διαμεσολαβεί τη μετάδοση του σήματος όχι μόνο των μελών της οικογένειας των TNFR αλλά και των μελών της οικογένειας των IL1R (interleucine 1 receptor) και TLR (“Toll like” receptor) (IL 1R/TLR)^{539,540}.

Ο RANKL εκφράζεται στα CD4 και CD8 T- λεμφοκύτταρα. Ως απόκριση στη διέγερση των TCR (T cells receptors) ο RANKL υπερεκφράζεται και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των T- λεμφοκυττάρων⁵¹⁸. Η αλληλεπίδραση του RANKL με τον RANK που εκφράζεται στα δενδριτικά κύτταρα ευοδώνει την επιβίωση των κυττάρων αυτών⁵¹⁷. Αξιοσημείωτη είναι η επαγόμενη από τον RANKL ρύθμιση της ανάπτυξης των T- και B- λεμφοκυττάρων, ειδικότερα της εξέλιξης των CD25+CD44– κυττάρων του θύμου προς CD25–CD44– καθώς και των B220+CD43+CD25–προ-B-κυττάρων προς B220+CD43–CD25+ πρε-B κυττάρων⁵⁴¹.

Κατά την εμβρυογένεση, η ανάπτυξη των λεμφαδένων, του σπλήνα και των πλακών Peyer’s διαμεσολαβείται από τη συνομιλία μεταξύ των “κυττάρων-επαγωγέων” του λεμφικού ιστού – LT1 – που εκφράζουν RANK, RANKL και LT_{ab} (lymphotoxin ab) και των “κυττάρων-οργανωτών” του λεμφικού ιστού – LT0 – που φέρουν τον LTbR (lymphotoxin b receptor). Το έναυσμα για την οργάνωση των λεμφαδένων δίνεται από τη στράτευση των κυττάρων LT1 από τα κύτταρα LT0 και τη συνάθροιση τους με αυτά, ως συνέπεια της αλληλεπίδρασης Ltab/LTbR, με επακόλουθο την ωρίμανση των κυττάρων LT0 και την παραγωγή RANKL και χημειοκινών που προσελκύουν επιπλέον κύτταρα LT1⁵⁴²⁻⁵⁴⁷.

Στο πλαίσιο ενός φλεγμονώδους *milieu*, τα ενεργοποιημένα T- και B- λεμφοκύτταρα, τα στρωματικά κύτταρα, οι οστεοβλάστες και κυρίως τα οστεοκύτταρα απαρτίζουν τις σημαντικότερες πηγές προέλευσης του RANKL. Μέσω της πρόσδεσης του RANKL στον RANK των οστεοκλαστών και της επακόλουθης σηματοδότησης, η φλεγμονή ενορχηστρώνει την απώλεια οστικής μάζας και, τελικά, την καταστροφή της άρθρωσης, υπό το πρίσμα της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ πολυάριθμων κυτταροκινών, θετικών και αρνητικών ρυθμιστών της οστεοκλαστογένεσης⁵³⁴.

Ένας εκ διαμέτρου αντίθετος προς τη διέγερση του ανοσοποιητικού ρόλος του RANKL σκιαγραφείται από τη συμβολή αυτού στην επαγωγή της ανοσολογικής ανοχής. Πρώτον, έχει παρατηρηθεί ότι ο RANKL προάγει τη διαφοροποίηση των T ρυθμιστικών κυττάρων⁵⁴⁸. Δεύτερον, η αλληλεπίδραση RANKL/RANK στον θύμο αδένια συμβάλλει στη ρύθμιση της ανοσίας, ελέγχοντας τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και τη λειτουργία των mTEC (medullary thymic epithelial cells), μη αιμοποιητικών κυττάρων υπεύθυνων για την αρνητική επιλογή. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω των μελών της οικογένειας του TNFR –LTbR, CD40, RANK– είναι θεμελιώδης για την επαγωγή της έκφρασης από τα mTEC των κρίσιμων γονιδίων Aire (autoimmune regulator) και τον έλεγχο των ειδικών αντιγόνων ανά ιστό. Η επαγόμενη από τον RANKL και διαμεσολαβούμενη από τα mTEC αρνητική επιλογή των αντιγόνων που εκφράζονται από τους όγκους δημιουργεί ένα ανοσοκατασταλτικό *milieu* που ευοδώνει την εξέλιξη του όγκου. Διακοπή της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης ενισχύει την απόκριση των T-λεμφοκυττάρων έναντι των αντιγόνων των όγκων⁵³⁴.

1.3.14.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΚΝΣ)

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον RANKL και στον RANK, που εκφράζονται στον υποθάλαμο διαμεσολαβεί την εκδήλωση πυρετού ως απόκρισης σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL 1β και ο TNF-α, μέσω επαγωγής του συστήματος COX2/PGE2-EP3R (Cyclooxygenase-2 /prostaglandin E2-E-prostanoid receptor 3). Πειράματα σε ποντίκια δείχνουν ότι ενδέχεται να ελέγχει, επίσης, τη φυσιολογική θερμορύθμιση στα θήλαα⁵⁴⁹.

1.3.14.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΟΝ ΜΑΣΤΟ

Η ευόδωση της έκφρασης του RANKL στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού από τις ορμόνες της εγκυμοσύνης –PRL (Prolactin), PRG (Progesterone), PTHrP– πυροδοτεί τον επαγόμενο από την RANKL/RANK αλληλεπίδραση πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού κατά το θηλασμό και την εγκυμοσύνη μέσω ενεργοποίησης οδών σηματοδότησης με πρωταγωνιστές τις πρωτεΐνες IKKα (IκB kinase α), NFκB και cyclin D1⁵⁴⁹.

1.3.14.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ RANKL ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Η ραγδαία εξελισσόμενη έρευνα που πραγματεύεται τον ρόλο του RANKL στον καρκίνο καταδεικνύει την έκφραση αυτού σε ευρύ φάσμα νεοπλασμάτων, όπως στον καρκίνο του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του νεφρού, του προστάτη, του πνεύμονα, στο χονδροσάρκωμα, στους γιγαντοκυτταρικούς όγκους των οστών, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στο λέμφωμα, στο πολλαπλό μύελωμα και στο νευροβλάστωμα⁵⁵⁰.

Το έναυσμα για τη μελέτη του RANKL στο πλαίσιο της γένεσης και εξέλιξης των όγκων δόθηκε από τα αποτελέσματα πειραμάτων-ορόσημο σε ποντίκια που έδειξαν ότι ο ευοδωτικός ρόλος της προγεστερόνης στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού οφείλεται στον επαγόμενο από τον RANKL πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων⁵⁵¹. Υπέρ του ρόλου αυτού συνηγορεί η *in vivo* μελέτη των Schramek και συνεργατών σύμφωνα με την οποία ο RANKL διαμεσολαβεί τη γένεση καρκίνου μαστού σε ποντίκια επαγόμενου από τη σύγχρονη χορήγηση της οξικής μεδροξυπρογεστερόνης με τον μιτογόνο παράγοντα 7,12-DMBA (dimethylbenz[a]anthracene)⁵⁵².

Διττός –αυτοκρινικός και παρακρινικός– είναι ο ρόλος του παραγόμενου από τα καρκινικά κύτταρα και από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου RANKL, ο οποίος διαμεσολαβείται

κυρίως από τον RANK που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα⁵⁵⁰. Στην πραγμάτωση του ρόλου αυτού συμβάλλουν οι διαλυτές μορφές του RANKL που προαναφέρθηκαν καθώς και μία επιπλέον διαλυτή μορφή η οποία προκύπτει από την αποκοπή του εξωκυττάρου τμήματος του διαμεμβρανικού RANKL μέσω των πρωτεασών ADAM-10, MMP 7, MMP 14⁵⁵⁰.

Ιδιαίτερο πρότυπο μελέτης της παρακρινικής δράσης του RANKL αποτελεί το παθογενετικό υπόβαθρο των γιγαντοκυτταρικών όγκων των οστών. Η αλληλεπίδραση του RANKL που παράγεται από τα στρωματικά κύτταρα με τον RANK που εκφράζεται από τους γιγάντιους οστεοκλάστες και τα μακροφάγα που διηθούν τον όγκο οδηγεί σε αύξηση της οστεοκλαστογένεσης με επακόλουθο την καταστροφή των οστών⁵⁵³. Το γεγονός αυτό ερμηνεύει την αντινεοπλασματική δράση της φαρμακευτικής αναστολής της αλληλεπίδρασης RANKL/RANK μέσω του denosumab σε αυτό τον τύπο καρκίνου⁵⁵⁴.

Πληθώρα πειραματικών δεδομένων δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση RANKL/RANK ενορχηστρώνει όλα τα στάδια της γένεσης και εξέλιξης των όγκων: τη δημιουργία προκαρκινικών εστιών, τη νεοαγγειογένεση, τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στις υποψήφιες μεταστατικές εστίες, τον αποικισμό αυτών και, τελικά, την αύξηση του μεταστατικού φορτίου της νόσου.

Η διαπίστωση των Jones και συνεργατών ότι ο RANKL που παράγεται από τους οστεοβλάστες και τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών δρα ως χημειοκίνη επάγοντας τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν RANK⁵⁵⁵ αποτέλεσε τον ακρογωνιαίο λίθο της διερεύνησης της συμβολής της αλληλεπίδρασης RANKL/RANK στην εξέλιξη των όγκων. Επαληθεύοντας την αρχή “του σπόρου και του εδάφους” που διέπει τη γένεση των μεταστάσεων⁵⁵⁶, ο RANKL διαδραματίζει καίριο ρόλο όχι μόνο στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων προς τα οστά αλλά και στη διαμόρφωση στο οστικό μικροπεριβάλλον ενός *milieu* που ευνοεί την εξέλιξη του όγκου. Διαφαίνεται ότι τα καρκινικά κύτταρα σφετερίζονται την αλληλεπίδραση ανάμεσα στον RANKL, τον RANK και την OPG, κατευθύνοντας την ισορροπία μεταξύ οστεοβλαστικής και οστεοκλαστικής δραστηριότητας προς την οστική καταστροφή μέσω πυροδότησης της υπερέκφρασης του RANKL. Προς την επίτευξη του στόχου αυτού, η στράτευση των κυττάρων του στρώματος –ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων, οστεοβλαστών και κυττάρων του ανοσοποιητικού– από τα καρκινικά κύτταρα πυροδοτεί την έκκριση οστεοκλαστογενετικών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων: IL 1, IL 6, IL 8, IL 11, TNF- α , PTHrP. Οι παράγοντες αυτοί με τη σειρά τους επάγουν την έκφραση του M-CSF και του RANKL στους οστεοβλάστες, τα μεσεγχευματικά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αλληλεπίδραση του M-CSF και του RANKL με τους υποδοχείς τους, c-fms και RANK, αντίστοιχα, στα κύτταρα-προδρόμους των οστεοκλαστών επάγει τη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Η επακόλουθη οστική απορρόφηση απελευθερώνει αυξητικούς παράγοντες που ευοδώνουν την εξέλιξη του όγκου, όπως ο TGF β , ο IGF-1, ο PDGF, ο FGF (Fibroblast growth factor)^{557,558}.

Επιπλέον, έναν φαύλο κύκλο ευοδωτικό στον όγκο σηματοδοτεί η έκφραση του RANKL από τα καρκινικά κύτταρα *per se* και τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση του RANKL που παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος με τον RANK που παράγεται από τα μακροφάγα, τα οποία προσελκύονται στη μεταστατική εστία από τον RANKL⁵⁵⁹, οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των T ρυθμιστικών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους εκφράζουν RANKL. Το επαγόμενο ανοσοκατασταλτικό *milieu* προάγει την αύξηση του όγκου και τη δημιουργία μεταστατικών εστιών⁵⁶⁰.

Η αλληλεπίδραση του RANKL με τον RANK που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα ευνοεί τη διαμεσολαβούμενη από την οδό PI3K/Akt επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και την πυροδοτούμενη από τις κινάσες Src και PLC αγγειογένεση^{561,562}.

Αξιοσημείωτη πρόοδος έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στην έρευνα του μοριακού υπόβαθρου του ογκογόνου και του μεταστατικού δυναμικού της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης. Η

ενεργοποίηση καίριων μεταγραφικών παραγόντων κατεχοχίν μέσω του TRAF6, επακόλουθο της αλληλεπίδρασης του RANKL με τον υποδοχέα του RANK, επάγει την έκφραση πληθώρας γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται όχι μόνο στην οστεοκλαστογένεση, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν την cathepsin K και την TRAP⁵³⁴, αλλά και στη γένεση και εξέλιξη των όγκων, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες LGR4, MMP 9, VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1), integrin β 3⁵⁵⁰.

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στον πρόσφατα ανακαλυφθέντα υποδοχέα του RANKL, τον LGR4, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο *Lgr4* και χαρακτηρίστηκε αρχικά ως διαμεσολαβητής της αναστολής της οστεοκλαστογένεσης στο πλαίσιο ενός μηχανισμού αυτορρύθμισης της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι η δράση του LGR4 εκτείνεται πέραν της αναστολής της οστεοκλαστογένεσης και ελέγχει την αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού καθώς και τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Η μελέτη των Zhu και συνεργατών ανέδειξε την ενεργοποίηση της οδού Wnt ως διαμεσολαβητή της ευοδωτικής στον πολλαπλασιασμό δράσης του LGR4 όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα μαστού, προστάτη, στομάχου, ήπατος⁵⁶³. Οι Liu και συνεργάτες διαπίστωσαν τη συμβολή του STAT3 στον ευοδωτικό ρόλο που διαδραματίζει ο LGR4 στο οστεοσάρκωμα⁵⁶⁴.

Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της ευόδωσης του μεταστατικού δυναμικού των όγκων από την αλληλεπίδραση RANKL/RANK αποτελεί η ενεργοποίηση της IKK α –αναστολέα της έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης Maspin– όπως έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο του προστάτη⁵⁶⁵. Η ενεργοποίηση των κινάσων cSrc (cellular Src), ERK1/2 και Akt, απόρροια της RANKL/RANK αλληλεπίδρασης, ενέχεται στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μαστού *in vitro*⁵⁶⁶. Καίριο ρόλο στη μετανάστευση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα θεωρείται ότι διαδραματίζει η ενεργοποίηση του μορίου ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), γνωστού και ως CD54, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του NF κ B από την αλληλεπίδραση RANKL/RANK⁵⁶⁷.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Wang και συνεργατών που έδειξε ότι σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ωοθήκης η αλληλεπίδραση RANKL/RANK δίνει το έναυσμα για την ενεργοποίηση της κινάσης Akt⁵⁶⁸. Η ενεργοποίηση της κινάσης Akt από τον NF κ B ενέχεται στην υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Snai1⁵⁶⁹. Επαρκώς τεκμηριωμένος είναι ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα Snai1 στην επαγωγή της EMT^{570,571}. Επίσης, η ενεργοποιημένη Akt ρυθμίζει την έκφραση της β κατενίνης, η οποία με τη σειρά της επάγει πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που ευοδώνουν το διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων⁵⁷².

Υπέρ του μεταστατικού δυναμικού που προσδίδει η αλληλεπίδραση RANKL/RANK στα καρκινικά κύτταρα συνηγορούν μελέτες που δείχνουν συσχέτιση της έκφρασης του RANKL με επιθετική βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου του προστάτη⁵⁷³, του στομάχου⁵⁷⁴, του νεφροκυτταρικού καρκινώματος⁵⁷⁵ και του οστεοσαρκώματος⁵⁷⁶. Οι Santini και συνεργάτες ήταν οι πρώτοι ερευνητές που ανέδειξαν την έκφραση RANK ως προγνωστικού δείκτη εμφάνισης οστικών μεταστάσεων σε έναν μεγάλο πληθυσμό ασθενών με καρκίνο του μαστού⁵⁷⁷. Συνεπώς, πεδίο εξελισσόμενης έρευνας αποτελεί η φαρμακευτική αναστολή της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης ως αντινεοπλασματικής θεραπευτικής στρατηγικής.

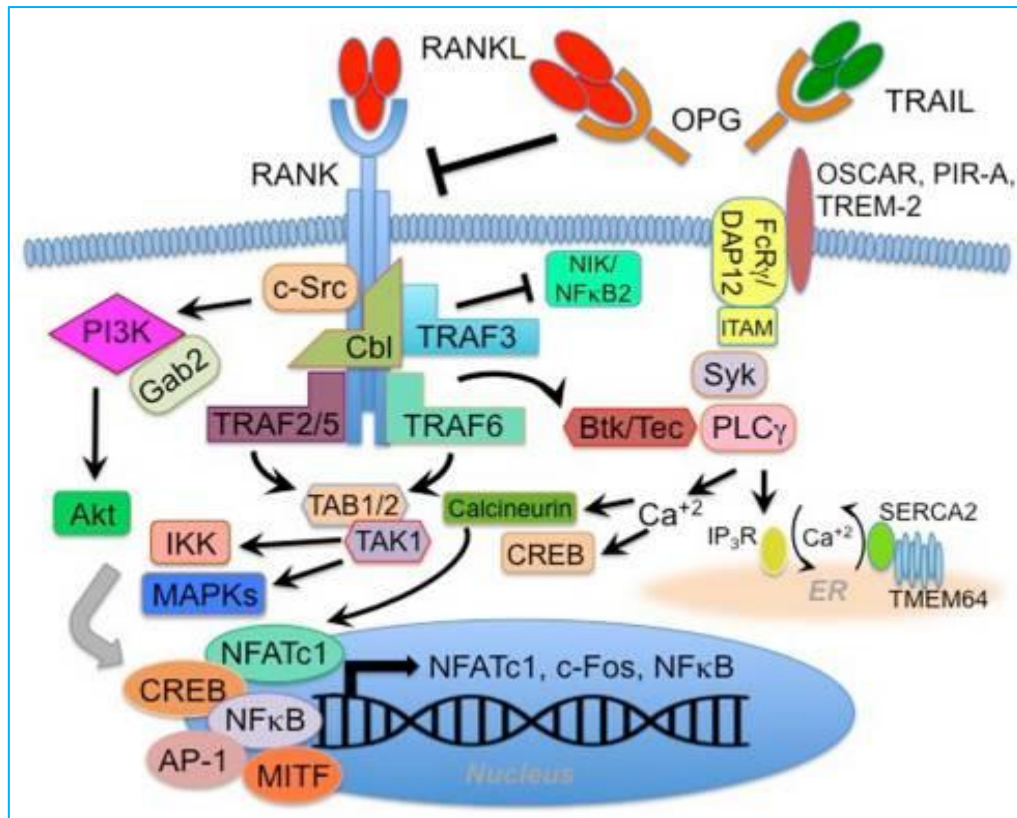
Εντούτοις, ολοένα και περισσότερες κλινικές μελέτες δείχνουν συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων έκφρασης του RANKL με επιθετική βιολογική συμπεριφορά ορισμένων όγκων, κυρίως του καρκίνου του μαστού. Οι Bhatia και συνεργάτες διατύπωσαν την υπόθεση ότι η έκφραση χαμηλών επιπέδων RANKL ή η απουσία του RANKL στον πρωτοπαθή όγκο επιτρέπει στον παραγόμενο από τον πρωτοπαθή όγκο RANK να αλληλεπιδράσει με τον RANKL ο οποίος εκφράζεται στους οστεοβλάστες και στα κύτταρα του στρώματος της υποψήφιας μεταστατικής εστίας⁵⁷⁸. Συνεπώς, η δράση του RANKL ως χημειοκίνης ευοδώνει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και τον αποικισμό της μεταστατικής εστίας.

Ωστόσο, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο RANKL *per se* ενδέχεται να αντιστρατεύεται την εξέλιξη του όγκου χάρη στις διακριτές λειτουργίες των επιμέρους ισομορφών του⁵⁷⁹.

Επίσης, μια νέα ισομορφή του RANK με αντινεοπλασματική δράση, ο RANK-c, αναδύθηκε πρόσφατα από τη μελέτη των Papanastasiou και συνεργατών στον καρκίνο του μαστού⁵⁸⁰. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 40-45 kDa που κωδικοποιείται από το προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου TNFRSF11 – TNFRSF11_Δ7,8,9 – και στερείται της διαμεμβρανικής περιοχής και του μεγαλύτερου μέρους της ενδοκυττάριας περιοχής που χαρακτηρίζουν τον υποδοχέα RANK. Ο RANK-c δρα ως κυρίαρχος αρνητικός ρυθμιστής της διαμεσολαβούμενης από τον RANK ενεργοποίησης του NFκB, αναστέλλοντας την επαγόμενη από τον RANK επιβίωση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Η δράση αυτή αποτυπώνεται στη διαπιστωθείσα αντίστροφη συσχέτιση της υπερέκφρασης του RANK-c με τον ιστολογικό βαθμό του νεοπλασματος⁵⁸⁰.

Κατά την προσέγγιση της κλινικής σημασίας της έκφρασης του RANKL στον καρκίνο πρέπει να αξιολογηθεί και ο διττός ρόλος αυτού στην ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου: Η ευόδωση της ανοσολογικής επιτήρησης του όγκου που απορρέει από τη συμβολή του RANKL στην ανάπτυξη των T- και B- λεμφοκυττάρων, την επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων και τη γένεση των λεμφαδένων αντίκειται στην πυροδοτούμενη από τον RANKL ανοσολογική ανοχή έναντι των αντιγόνων που εκφράζουν τα καρκινικά κύτταρα⁵⁸¹.

Με βάση τα επιστημονικά δεδομένα που ήδη αναλύθηκαν, είναι προφανές ότι η ανάδειξη του RANKL ως διαγνωστικού και προγνωστικού καρκινικού βιοδείκτη προϋποθέτει ως *conditio sine que non* τη διαλεύκανση του αινιγματικού του ρόλου στον καρκίνο. Προς το παρόν, η αμφίσημη φύση της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης –ευοδωτικής στον όγκο αλλά και ανασταλτικής αυτού– συσκοτίζει την εφαρμογή του στην κλινική πράξη. Ιδιαίτερη αξία στη συνέχιση της έρευνας προσδίδει η δυνατότητα αναχαίτισης της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης μέσω του denosumab, μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του RANKL που έχει ήδη λάβει έγκριση από τον FDA (Food and Drug Administration) για τη θεραπεία των οστικών μεταστάσεων συμπαγών όγκων, μεταξύ άλλων ενδείξεων, σκιαγραφώντας μία ευοίωνη θεραπευτική παρέμβαση.



Εικόνα 1.9. Οι επαγόμενες από τον RANKL οδοί ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Πηγή: Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL–RANK–OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:511. doi:10.3389/fimmu.2014.00511

1.3.15. OPG

Ο θεμελιώδης ρόλος της OPG στον μεταβολισμό των οστών αντικατοπτρίζεται στο όνομα της, το οποίο πηγάζει από τους λατινικούς όρους “os” (οστό) και “protegere” (“προστατεύειν”). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την OPG –TNFRSF11B– εδράζεται στο χρωμόσωμα 8 στη θέση 8q23-24, περιοχή που περιλαμβάνει πολυάριθμα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του σχηματισμού και του μεταβολισμού των οστών. Η OPG απαρτίζεται από 401 αμινοξέα εκ των οποίων τα 21 αποτελούν το πεπτίδιο σήμανσης, που αποκόπτεται για να δώσει γένεση στην ώριμη μορφή των 380 αμινοξέων.

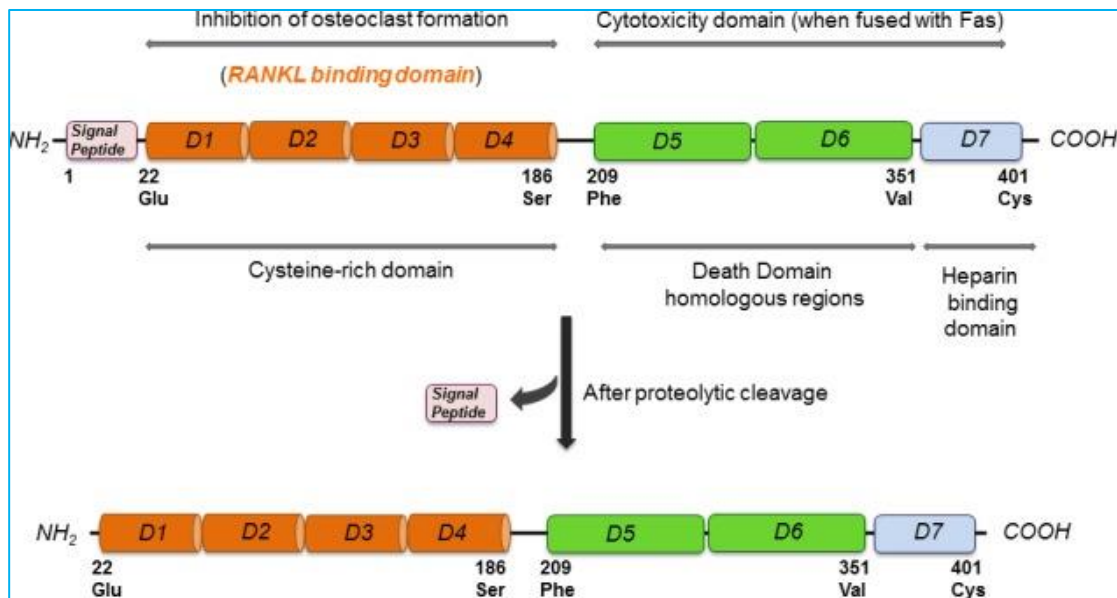
Ως άτυπο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του TNF, η OPG στερείται διαμεμβρανικής περιοχής. Η ώριμη μορφή της OPG αποτελεί διαλυτή ομοδιμερή γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 110 έως 120 kDa με 4 έως 5 θέσεις γλυκοζυλίωσης, προερχόμενη από τον ομοδιμερισμό της μονομερούς OPG μοριακού βάρους 50 έως 62 kDa. Απαρτίζεται από δύο διακριτά τμήματα: το αμινοτελικό άκρο, που περιλαμβάνει 4 περιοχές, D1-D4, πλούσιες σε κυστεΐνη, απαραίτητες για τη σύνδεση στον RANKL, και το καρβοξυτελικό άκρο με κομβικές θέσεις τις περιοχές “θανάτου” (D5-D6) ακολουθούμενες από την συνδέουσα την ηπαρίνη περιοχή (D7) και την κυστεΐνη στη θέση 400 που είναι υπεύθυνη για τον διμερισμό του μορίου⁵⁸².

Στα οστά, η OPG παράγεται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και τα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς, κατεχοχόν τα οστεοκύτταρα. Λεία μυϊκά κύτταρα, Β λεμφοκύτταρα και

χονδροκύτταρα συγκαταλέγονται επίσης ανάμεσα στις πηγές προέλευσης της OPG. Σε υψηλές συγκεντρώσεις η OPG εκφράζεται στην καρδιά, στους πνεύμονες, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στον θύμο, στους λεμφαδένες και στον μυελό των οστών.

Η έκκριση της OPG διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη CREBP και ρυθμίζεται από μία πρωτεϊνική κινάση ευαίσθητη στην καλμοδουλίνη που ελέγχεται από τον L τύπο του διαύλου ασβεστίου VSCC (voltage-sensitive calcium channel). Η ανασταλτική επίδραση που ασκεί η 1,25(OH)₂D₃ στην έκκριση της OPG διαμεσολαβείται από την αναστολή του προαναφερθέντος διαύλου⁵⁸³. Μεταξύ των αναστολέων της έκκρισης της OPG συγκαταλέγονται επίσης η IL 6, ο LIF (Leukemia Inhibitory Factor)⁵⁸⁴, η ογκοστατίνη M⁵⁸⁴, η PGE₂⁵⁸⁵ και η COX₂⁵⁸⁵. Διεγερτική επίδραση στην έκκριση της OPG ασκούν τα οιστρογόνα, η IL 1, ο TNF-α και ο TGF-β.

Η δράση της OPG είναι συνυφασμένη με την αναστολή της επαγόμενης από την αλληλεπίδραση RANKL/RANK και TRAIL/TRAILR σηματοδότησης, αλλά εκτείνεται και πέραν αυτής, χαράζοντας νέους ερευνητικούς δρόμους⁵⁸⁶.



Εικόνα 1.10. Η μοριακή δομή της OPG. Πηγή: Goswami S, Sharma-Walia N. Osteoprotegerin rich tumor microenvironment: implications in breast cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(27): 42777-42791.

1.3.15.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ OPG ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Πληθώρα μελετών αναδεικνύουν τον πολυσχιδή ρόλο της OPG σε ευρύ φάσμα νεοπλασμάτων, μεταξύ των οποίων προεξάρχουν ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του στομάχου, της ουροδόχου κύστης⁵⁸⁷, του παχέος εντέρου⁵⁸⁸ και του παγκρέατος⁵⁸⁹ καθώς και το μελάνωμα⁵⁹⁰. Το επιστημονικό ενδιαφέρον προσελκύει η θετική συσχέτιση της OPG με επιθετική βιολογική συμπεριφορά ποικίλων όγκων, υποδεικνύοντας τη συμβολή της στη γένεση μεταστάσεων, όπως έχει ήδη διαπιστωθεί στον καρκίνο του μαστού⁵⁹¹, του προστάτη⁵⁹², του στομάχου⁵⁹³, του παχέος εντέρου⁵⁸⁸ και του παγκρέατος⁵⁸⁹.

Εντούτοις, πρόσφατα η μελέτη Tromso ανέδειξε αντίστροφη σχέση μεταξύ της έκφρασης της OPG και του κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες⁵⁹⁴, αντικατοπτρίζοντας πιθανότατα την αντινεοπλασματική έκφραση της OPG.

Η αιτιολογική φύση της OPG αντισταθμίζεται στην *in vivo* μελέτη των Zinonos και συνεργατών η οποία έδειξε ότι η υπερέκφραση της OPG στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231 ανακόπτει την αύξηση του προερχόμενου από τα κύτταρα αυτά όγκου στο οστικό περιβάλλον, ενώ ευοδώνει τη γένεση μεταστάσεων σε θέσεις πέραν των οστών, όπως για παράδειγμα στον πνεύμονα⁵⁹⁵. Διαφαίνεται ότι ο ρόλος της OPG στη γένεση και εξέλιξη των όγκων είναι αμφίσημος: ευοδωτικός αλλά και ανασταλτικός.

Έρεισμα της θεώρησης της OPG ως στρατηγικής άμυνας έναντι του όγκου αποτελεί η συμβολή της στην αναχαίτιση του εγγενούς ογκογόνου δυναμικού του RANKL και του TRAIL. Αντίθετα, την ευοδωτική στη γένεση και εξέλιξη του όγκου έκφραση της OPG συνθέτουν το εγγενές ογκογόνο δυναμικό της OPG *per se* και η αναχαίτιση τόσο της διαμεσολαβούμενης από τον RANKL ανοσολογικής επιτήρησης του όγκου όσο και της επαγόμενης από τον TRAIL απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, προνόμιο επιβίωσης, αίροντας το αποπτωτικό δυναμικό του TRAIL, προσδίδει η OPG στα καρκινικά κύτταρα μέσω της σύνδεσης της με την ιντεγκρίνη και την επακόλουθη ενεργοποίηση της οδού FAK (Focal adhesion kinase)/Akt⁵⁹⁶. Ωστόσο, σε αντιδιαστολή προς την *in vitro*, πυροδοτούμενη από την OPG, αναστολή της επαγόμενης από τον TRAIL απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων⁵⁹⁷ έχει παρατηρηθεί *in vivo* ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση ακόμη και σε συνθήκες υπερέκφρασης της OPG⁵⁹⁸. Η ερμηνεία του παράδοξου αυτού φαινομένου ίσως παρέχεται από την υπόθεση ότι η έκβαση της αλληλεπίδρασης της OPG με τον RANKL και τον TRAIL καθορίζεται από τις σχετικές συγκεντρώσεις των τριών μορίων, δεδομένου ότι σε φυσιολογική θερμοκρασία -37°C- η OPG έχει παρόμοια συγγένεια σύνδεσης με τον TRAIL και τον RANKL⁵⁹⁹. Συνεπώς, σε συνθήκες υπεροχής της συγκέντρωσης του RANKL έναντι της αντίστοιχης του TRAIL, ο RANKL ενδέχεται να ανταγωνίζεται με τον TRAIL ως προς τη σύνδεση με την OPG, ευοδώνοντας το επαγόμενο από τον TRAIL αποπτωτικό σήμα. Αντίθετα, προνόμιο αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση παρέχεται από τη διέγερση της έκφρασης της OPG μέσω κυτταροκινών⁶⁰⁰.

Εντυπωσιακά βήματα προόδου έχουν σημειωθεί την τελευταία δεκαετία όσον αφορά τη διαλεύκανση του μοριακού υπόβαθρου του εγγενούς ρόλου της παραγόμενης από τα καρκινικά κύτταρα OPG στη γένεση και εξέλιξη των όγκων. Ισχυρό επιχείρημα υπέρ του ρόλου -αυτοκρινικού και παρακρινικού- της OPG στον καρκίνο αποτελεί πρόσφατη μελέτη φασματοσκοπικής μαζών που διενεργήθηκε στα καρκινικά και φλεγμονώδη ανθρώπινα κύτταρα μαστού από τους Goswami και συνεργάτες⁵⁸². Η μελέτη αυτή ανέδειξε πολυάριθμες πρωτεΐνες-συνδέτες της OPG που ενέχονται στον κυτταρικό μεταβολισμό, στη μεταγραφή, στη μετάφραση, στην αύξηση, στον πολλαπλασιασμό, στην οργάνωση του κυτταρικού σκελετού, στην αποδιαφοροποίηση, στον κυτταρικό κύκλο, και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA, διεργασίες με κίριο ρόλο στη γένεση και εξέλιξη των όγκων. Μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών συγκαταλέγονται οι εξής: nucleolin, IQGAP1/3, ABC (ATP binding cassette), Leucine rich PPR (pentatricopeptide repeat), DHX9 (DEXH-Box Helicase 9). Η έρευνα εστιάζεται στη nucleolin, πρωτεΐνη που απαντάται στον πυρηνίσκο ελέγχοντας διεργασίες που αφορούν τον μεταβολισμό του DNA και του RNA, στο κυτταρόπλασμα διαμεσολαβώντας την επικοινωνία αυτού με τον πυρήνα⁶⁰¹⁻⁶⁰³ καθώς και στην επιφάνεια ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων, όπως τα καρκινικά κύτταρα HeLa και τα καρκινικά κύτταρα μαστού, όπου δρα ως υποδοχέας⁶⁰⁴⁻⁶⁰⁸.

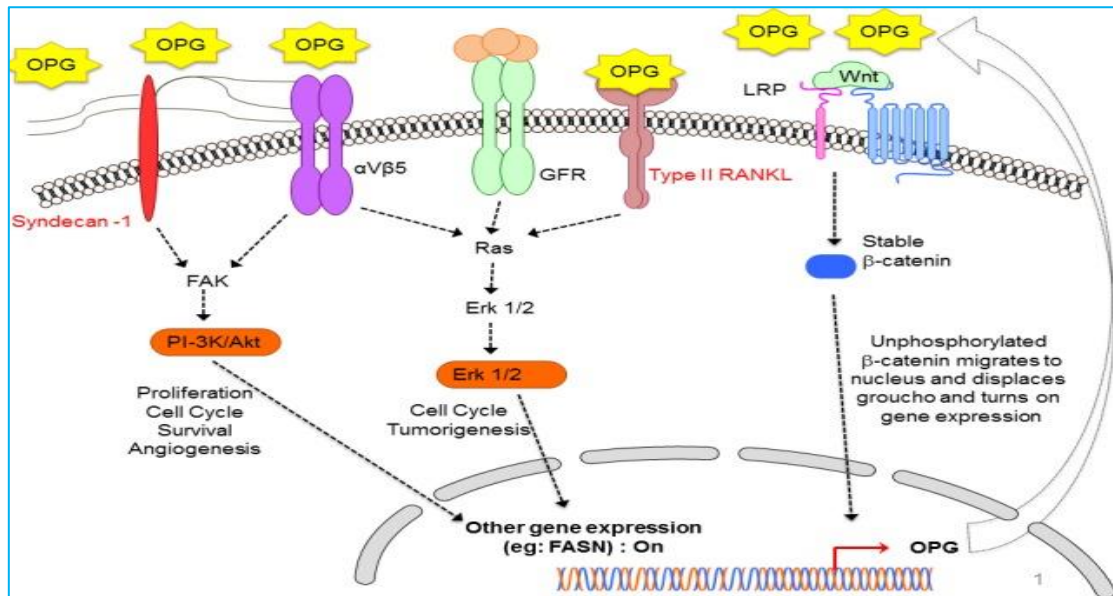
Εικάζεται ότι ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός των κυττάρων, απόρροια της παρακρινικής δράσης της OPG, αποδίδεται στη συμβολή αυτής σε πληθώρα μηχανισμών που οδηγούν στην απόκτηση των ιδιοτήτων-σήμα κατατεθέν των καρκινικών κυττάρων, όπως ο άναρχος πολλαπλασιασμός και η

ανεξέλεγκτη επιβίωση. Η μελέτη-ορόσημο μιας ερευνητικής ομάδας με επικεφαλής επίσης την Goswami τεκμηρίωσε αυτή τη δράση της OPG, δείχνοντας ότι στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού η χορήγηση ανασυνδυασμένης OPG επάγει τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό μέσω ενεργοποίησης ποικίλων ογκογόνων κινασών (Akt 1, AURKA: Aurora-A-kinase), του EGFR και της ογκοπρωτεΐνης MYC, καθώς και μέσω μείωσης του αριθμού των αντιγράφων των CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A), αλλά και γονιδίων που κωδικοποιούν ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, όπως την PTEN και την pRb. Επίσης, η επαγωγή της έκφρασης των κινασών AURKA, Bub1, BubR1 από την OPG διαμέσου ποικίλων σηματοδοτικών οδών, όπως των διαμεσολαβούμενων από τις κινάσες ERK, Akt, οδηγεί στην ανευπλοειδία, ακρογωνιαίο λίθο της ογκογένεσης⁶⁰⁹. Υπέρ του ευοδωτικού ρόλου της OPG στη διαμόρφωση επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς του καρκίνου του μαστού συνηγορούν η υπερέκφραση της πρωτεΐνης CD24, δείκτη της διηθητικής ικανότητας και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων⁶⁰⁹, καθώς και της MMP 2⁶¹⁰.

Συνιστώσα, *conditio sine que non*, του ευοδωτικού ρόλου της OPG στην αύξηση και εξέλιξη του όγκου αποτελεί η πυροδότηση της νεοαγγειογένεσης. Στα αγγεία, η κατεξοχήν πηγή προέλευσης της OPG είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα, όπου η OPG παράγεται υπό την επίδραση του TNF α , της IL 1 και της ινσουλίνης, περικλείεται στα σωμάτια Weibel Palade σχηματίζοντας σύμπλεγμα με τη γλυκοπρωτεΐνη Von Willebrand factor (vWf)⁶⁰⁵ και εκκρίνεται μετά τη διέγερση από κυτταροκίνες. Η OPG παράγεται επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα⁶¹¹⁻⁶¹³. *In vivo* υψηλότερα επίπεδα έκφρασης OPG στα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεοπλασματικών ιστών σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης αυτής στα κύτταρα των καλοθών όγκων και των φυσιολογικών ιστών, καθώς και *in vitro* αύξηση της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων επαγόμενη από την OPG αποκάλυψε η μελέτη των Cross και συνεργατών⁶¹⁴. Ως πιθανός μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης της OPG στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει προταθεί από τους Reid και συνεργάτες η συνομιλία μεταξύ καρκινικών και ενδοθηλιακών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου με πρωταγωνιστή τη γλυκοπρωτεΐνη οστεοποντίνη, συνδέτη της ιντεγκρίνης ανβ3⁶¹⁵. Οι McConigle και συνεργάτες ήταν οι πρώτοι ερευνητές που έδειξαν την ευοδωτική δράση της OPG στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών οδών που διαμεσολαβούνται από τις κινάσες ERK1/2 και Akt⁶¹⁶. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα ενδυναμώνουν την υπόθεση της ευοδωτικής στην αγγειογένεση δράσης της OPG. Η πρωτεομική κατέδειξε ότι η OPG ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών που ενέχονται στην κινητικότητα, την προσκόλληση, τη μεταβίβαση ενδοκυττάρων σημάτων και την απόπτωση των αποικιογόνων ενδοθηλιακών κυττάρων⁶¹⁷. Δύο διακριτές σηματοδοτικές οδοί επαγόμενες από την OPG, διαμεσολαβούμενες από τις κινάσες ERK και Src, πιστεύεται ότι εμπλέκονται, αντίστοιχα, στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και στην αγγειογένεση⁶¹⁸. Σύμφωνα με τη μελέτη των Benslimane και συνεργατών, το έναυσμα για την ευοδωτική στην αγγειογένεση σηματοδότηση δίνεται από τη σύνδεση της δεσμεύουσας την ηπαρίνη περιοχής της OPG με τη Syndecan-1, πρωτεογλυκάνη της επιφάνειας των αποικιογόνων ενδοθηλιακών κυττάρων. Ως επακόλουθο, επάγεται η μετανάστευση των κυττάρων αυτών μέσω της οδού SDF-1/CXCR4 (Stromal cell-derived factor 1/ C-X-C motif chemokine receptor 4)⁶¹⁷. Η *in vitro* παρατήρηση των Reid και συνεργατών ότι η OPG 1-194 προάγει την αγγειογένεση παρά το γεγονός ότι στερείται της δεσμεύουσας την ηπαρίνη περιοχής υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα του φαινομένου. Εξαιρετικά ενδιαφέρον εύρημα της προαναφερθείσας μελέτης είναι η διαπίστωση ότι η OPG προάγει την αγγειογένεση μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από τον VEGF. Οι ερευνητές αυτοί εικάζουν ότι το αγγειογενετικό δυναμικό της OPG απορρέει από την αναχαίτιση γνωστών αντιαγγειογενετικών παραγόντων, όπως της THBS 1⁶¹⁵.

Ενδιαφέρον αλλά ανεξερεύνητο πεδίο έρευνας αποτελεί η σχέση αιτίας-αιτιατού που διέπει την αύξηση της έκφρασης OPG στον καρκίνο. Ένα ερώτημα που εύλογα αναδύεται είναι εάν η αύξηση της OPG αποτελεί την κινητήρια δύναμη της γένεσης και εξέλιξης του καρκίνου ή έναν αντιρροπιστικό

μηχανισμό που επιχειρεί να αναχαιτίσει τις διεργασίες αυτές. Επί του παρόντος, η ασάφεια της αιτιοπαθογενετικής θεώρησης της συσχέτισης της έκφρασης της OPG με την επιθετική βιολογική συμπεριφορά των όγκων δυσχεραίνει την εδραίωση της ως καρκινικού βιοδείκτη και στόχου αντινεοπλασματικών θεραπειών.



Εικόνα 1.11. Οι οδοί ενδοκυττάριας σηματοδότησης που πυροδοτούνται ή τροποποιούνται από την OPG. Πηγή: Goswami S, Sharma-Walia N. Osteoprotegerin rich tumor microenvironment: implications in breast cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(27): 42777-42791.

1.3.16. TRAIL: TNF-RELATED APOPTOSIS INDUCING LIGAND

Ο TRAIL συνιστά τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας του TNF, που κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFSF10 το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 στη θέση 3q26, πλησίον των γονιδίων που κωδικοποιούν τα λοιπά μέλη της οικογένειας TNF⁶¹⁹. Οφείλει την ανακάλυψη του στην ομολογία των αλληλουχιών των αμινοξέων του καρβοξυτελικού του τμήματος με την πρωτεΐνη CD95L (Fas/Apo1 Ligand) σε ποσοστό 28% καθώς και στην ικανότητα του να επάγει την απόπτωση, αν και μέσω υποδοχέων που διαφέρουν από τους υποδοχείς του TNF^{619,620}. Ο διακριτός βιολογικός ρόλος του TRAIL αποτυπώνεται στη συνεχή έκφραση αυτού σε ευρύ φάσμα ιστών, όπως ο σπλήνας, ο προστάτης, οι όρχεις, οι ωθήκες και τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος^{619,621}, σε αντίθεση με την παροδική και περιορισμένη έκφραση των λοιπών μελών της οικογένειας του TNF⁶¹⁹.

Καίριος είναι ο ρόλος που διαδραματίζει ο TRAIL στη ρύθμιση της επίκτητης ανοσίας στην οποία πρωταγωνιστούν τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα που εξαρτώνται από τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα^{622,623}. Επιπλέον, ο TRAIL διαμεσολαβεί την κυτταροτοξική δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος –δενδριτικών, μονοκυττάρων, NK και T-λεμφοκυττάρων– στην επιφάνεια των οποίων εκφράζεται, έναντι των κυττάρων-στόχων, όπως είναι τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και τα καρκινικά κύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα TRAILR⁶²⁴. Ενδέχεται να διαμεσολαβεί επίσης ορισμένες

από τις αντινεοπλασματικές και αντιϊκές ιδιότητες των ιντερφερονών⁶²⁵⁻⁶²⁷. Η IL 2, οι IFNs (interferons) και η IL 5 επάγουν την έκφραση του TRAIL στα NK⁶²⁸⁻⁶³⁰. Αξιοσημείωτη είναι η επιλεκτική δράση του TRAIL στα καρκινικά κύτταρα, διατηρώντας ανέπαφα τα φυσιολογικά κύτταρα⁶³¹.

1.3.16.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ TRAIL/TRAILR: Ο ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Πέντε υποδοχείς, δύο αγωνιστές –TRAILR1, TRAILR2 – και τρεις ανταγωνιστές – TRAILR3, TRAILR4, OPG – αλληλεπιδρούν με τον TRAIL. Οι TRAILR1 και TRAILR2 – τύπου I διαμεμβρανικές πρωτεΐνες – φέρουν την κυτταροπλασματική “περιοχή θανάτου” που είναι υπεύθυνη για τη στράτευση των μορίων σηματοδότησης της απόπτωσης⁶³²⁻⁶³⁵. Οι υποδοχείς TRAILR3 και TRAILR4 παρουσιάζουν πλήρη ή μερική απουσία “περιοχών θανάτου” και ενέχονται στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση⁶³⁶. Παρομοίως, προνόμιο επιβίωσης προσδίδει η OPG στα καρκινικά κύτταρα παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του TRAIL με τους λειτουργικούς υποδοχείς του TRAILR1 και TRAILR2⁶³⁷.

Σύνδεση του TRAIL με τους λειτουργικούς υποδοχείς του που αθροίζονται στις πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης προσελκύει τις πρωτεΐνες-διαμεσολαβητές της εξωγενούς οδού της απόπτωσης⁶³⁸. Το έναυσμα της σηματοδότησης δίνεται από τη σύνδεση του TRAIL ως τριμερούς στο προσχηματισμένο σύμπλεγμα των υποδοχέων του, το οποίο στερείται της ικανότητας μετάδοσης σήματος θανάτου. Ακολουθεί η στράτευση της πρωτεΐνης FADD (Fas associated death domain protein), μέσω της DD περιοχής της, στην αντίστοιχη περιοχή των υποδοχέων TRAILR1 και TRAILR2, οδηγώντας στην αλληλεπίδραση της περιοχής DED της FADD με την περιοχή DED των κασπασών 8 και 10, με επακόλουθο τον σχηματισμό του συμπλέγματος DISC. Το σύμπλεγμα DISC διαμεσολαβεί την αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης 8, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την προ-κασπάση 3, η οποία μετατρέπεται σε εκτελεστική κασπάση 3 και πυροδοτεί την αποδόμηση πληθώρας πρωτεϊνών.

Μολονότι ο TRAIL θεωρείται ορόσημο της εξωγενούς οδού της απόπτωσης, σημαντική είναι η συμβολή του και στην ενδογενή οδό της απόπτωσης. Την έναρξη της ενδογενούς οδού της απόπτωσης σηματοδοτούν ενδοκυττάρια ερεθίσματα, όπως η βλάβη του DNA, τα οποία ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες που περιέχουν μόνο BH3 περιοχή (Bid, BIM, Bad, Puma, Noxa), οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν πρωτεΐνες με δράση ευοδωτική στην απόπτωση που ανήκουν στην ομάδα πρωτεϊνών Bcl2. Ακολουθεί η απώλεια της ακεραιότητας του μιτοχονδρίου, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και ο σχηματισμός του αποπτοσώματος. Το αποπτόσωμα, πέραν του κυτοχρώματος c, περιλαμβάνει τους παράγοντες Araf-1 (apoptotic protease-activating factor 1), dATP (Deoxyadenosine triphosphate) και κασπάση 9 και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες 3, 6 και 7. Αντιαποπρωτικό ρόλο διαδραματίζουν ορισμένες πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας Bcl-2, όπως η Bcl-XL, μέσω διατήρησης της ακεραιότητας του μιτοχονδρίου και αναστολής της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, ευοδώνοντας την επιβίωση των κυττάρων⁶³⁹. Αρνητικούς ρυθμιστές της απόπτωσης αποτελούν η μη λειτουργική πρωτεΐνη CFLIP, ομόλογο της προ-κασπάσης 8 που δεσμεύει την FADD⁶⁴⁰, και η πρωτεΐνη XIAP (X linked inhibitor of apoptosis), μέλος της οικογένειας των αναστολέων της απόπτωσης, που αίρει την αποπρωτική δράση των κασπασών 3 και 9⁶⁴¹. Κομβικό σημείο ελέγχου του ενδογενούς μονοπατιού είναι η ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53⁶⁴². Πρωταγωνιστής της “συνομιλίας” μεταξύ ενδογενούς και εξωγενούς οδού είναι η πρωτεΐνη Bid, την οποία ενεργοποιεί ο TRAIL μέσω των κασπασών 8 και 10⁶³⁹.

Αντίσταση στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση παρουσιάζει η πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων στους πρωταρχικούς όγκους⁶⁴³. Εικάζεται ότι η απόσπαση των καρκινικών κυττάρων από τον

πρωταρχικό όγκο – κρίσιμο βήμα της γένεσης μεταστάσεων – υπερνικά την αντίσταση αυτή, οπότε πιθανότατα καθιστά τα καρκινικά κύτταρα στόχο των NK και των λεμφοκυττάρων που εκφράζουν TRAIL⁶³⁹. Σύμφωνα με προκλινικές μελέτες, το ήμισυ των καρκινικών κυττάρων παρουσιάζει αντίσταση στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση. Μεταξύ των μηχανισμών που ενέχονται στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση προεξάρχουν η αδρανοποίηση των υποδοχέων TRAILR1 και TRAILR2 μέσω επιγενετικών αλλαγών ή σωματικών μεταλλάξεων, η υπερέκφραση των ψευδών υποδοχέων του TRAIL, η διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη CFLIP αναστολή του σχηματισμού του συμπλέγματος DISC, η αύξηση της έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bcl-2, καθώς και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του συμπλέγματος DISC⁶⁴⁴.

Φιλοδοξία των ερευνητών είναι η αναχαίτιση του όγκου μέσω της εξωγενούς χορήγησης αγωνιστών των λειτουργικών υποδοχέων του TRAIL και παραγόντων που αίρουν την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη δράση του TRAIL, με στόχο την επαγωγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία⁶⁴⁵. Ωστόσο, το θεραπευτικό όφελος της ενεργοποίησης των επαγόμενων από τον TRAIL σηματοδοτικών οδών αντιμετωπίζεται με σκεπτικισμό λόγω της αινιγματικής φύσης της σηματοδότησης *per se*.

1.3.16.2. Η ΜΗ ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΟΔΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ TRAIL ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Προβληματισμό εγείρει η διαπίστωση ότι ο TRAIL προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων που παρουσιάζουν αντίσταση στην επαγόμενη από αυτόν απόπτωση⁶⁴⁶.

Αμφίσημο ρόλο –ευοδωτικό στον όγκο αλλά και ανασταλτικό αυτού– διαδραματίζει η μη κλασσική οδός της επαγόμενης από τον TRAIL σηματοδότησης, η οποία πυροδοτείται από την αλληλεπίδραση του TRAIL με τους λειτουργικούς υποδοχείς του που βρίσκονται εκτός των πλούσιων σε πρωτεΐνες και σφιγγολιπίδια περιοχών της κυτταρικής μεμβράνης⁶³⁸. Το εναρκτήριο βήμα αυτής της σηματοδοτικής οδού αποτελεί ο σχηματισμός του δευτερογενούς συμπλέγματος που απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες NEMO (NF-kappa-B essential modulator)(IKKγ), FADD, κασπάση 8, RIP 1, TRAF 2. Ακολούθως, ενεργοποιούνται πολυάριθμες κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που είτε ευοδώνουν την εξέλιξη του όγκου, παρέχοντας στα καρκινικά κύτταρα προνόμιο επιβίωσης, πολλαπλασιασμού, διήθησης και μετανάστευσης, είτε αναχαιτίζουν τον όγκο μέσω πολύπλοκων μηχανισμών. Για παράδειγμα, ως επακόλουθο της δράσης του δευτερογενούς συμπλέγματος, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης NEMO (IKKγ), πρωταγωνιστή του συμπλέγματος IKK, ενεργοποιεί τις άλλες δύο υπομονάδες του συμπλέγματος IKK, την IKKα και την IKKβ, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τον αναστολέα του κΒ –IKB– με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του NFκΒ. Συνεπώς, ο NFκΒ μετατοπίζεται στον πυρήνα και επάγει τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων-στόχων που διαδραματίζουν αμφίσημο ρόλο: ευοδωτικό στον όγκο αλλά και ανασταλτικό αυτού.

Εξέχουσα θέση στη μη κλασσική οδό της επαγόμενης από τον TRAIL σηματοδότησης κατέχει ο “καταρράκτης” κινασών MAPK. Οι πρωτεΐνες FADD, TRAF 2, MEKK (MAPK/ERK kinase kinase) 1, MEKK 4 και RIP 1 ενεργοποιούν την κινάση JNK⁶⁴⁷⁻⁶⁴⁹, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες c-Jun/AP-1, την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bim⁶⁵⁰ και την πρωτεΐνη Beclin-1, κρίσιμο καθοριστή της αυτοφαγίας⁶⁵¹. Αμφίσημος είναι ο ρόλος της JNK: Η παρατεταμένη ενεργοποίηση της ευοδώνει την απόπτωση, ενώ η παροδική της ενεργοποίηση προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων⁶⁵². Αντιαποπτωτικό είναι το σήμα που μεταβιβάζουν οι ισομορφές JNK1a1 και JNK1b1, σε αντίθεση με το ευοδωτικό στην απόπτωση σήμα που μεταβιβάζεται από τις ισομορφές JNK1a2 και JNK1b2⁶⁵³. Αμφίσημος είναι επίσης ο ρόλος της p38, θεμελιώδους κινάσης της οδού MAPK που ενεργοποιείται από το δευτερογενές σύμπλεγμα. Έχει διαπιστωθεί ότι η p38 επάγει την απόπτωση

στα κύτταρα HeLa⁶⁵⁴, ενώ διαδραματίζει αντιαποπτωτικό ρόλο στα καρκινικά κύτταρα προστάτη⁶⁵⁵ και μαστού⁶⁵⁶, καθιστώντας τα κύτταρα αυτά ανθεκτικά στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πυροδοτούμενη από τη μη κλασσική οδό ενεργοποίηση της TAK 1 (TG-β activated kinase 1) προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα προνόμιο αντίστασης στην απόπτωση, διαμεσολαβούμενο από την ενεργοποίηση της υπομονάδας του NFκB p65/RelA και των κινασών της οδού MAPK, ειδικότερα της JNK και της p38⁶⁵⁷. Επίσης, η αντιαποπτωτική δράση της επαγόμενης από τον TRAIL ενεργοποίησης της p38 στα καρκινικά κύτταρα προστάτη φαίνεται να διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση της TAK 1⁶⁵⁵. Όσον αφορά την επαγόμενη από τον TRAIL ενεργοποίηση της PKC, έχει παρατηρηθεί ότι οι ισομορφές δ και ϵ αναστέλλουν την απόπτωση σε κύτταρα μελανώματος (δ, ϵ)⁶⁵⁸ και καρκινικά κύτταρα μαστού (ϵ),⁶⁵⁹ ενώ οι ισομορφές α και β προάγουν την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα⁶⁶⁰.

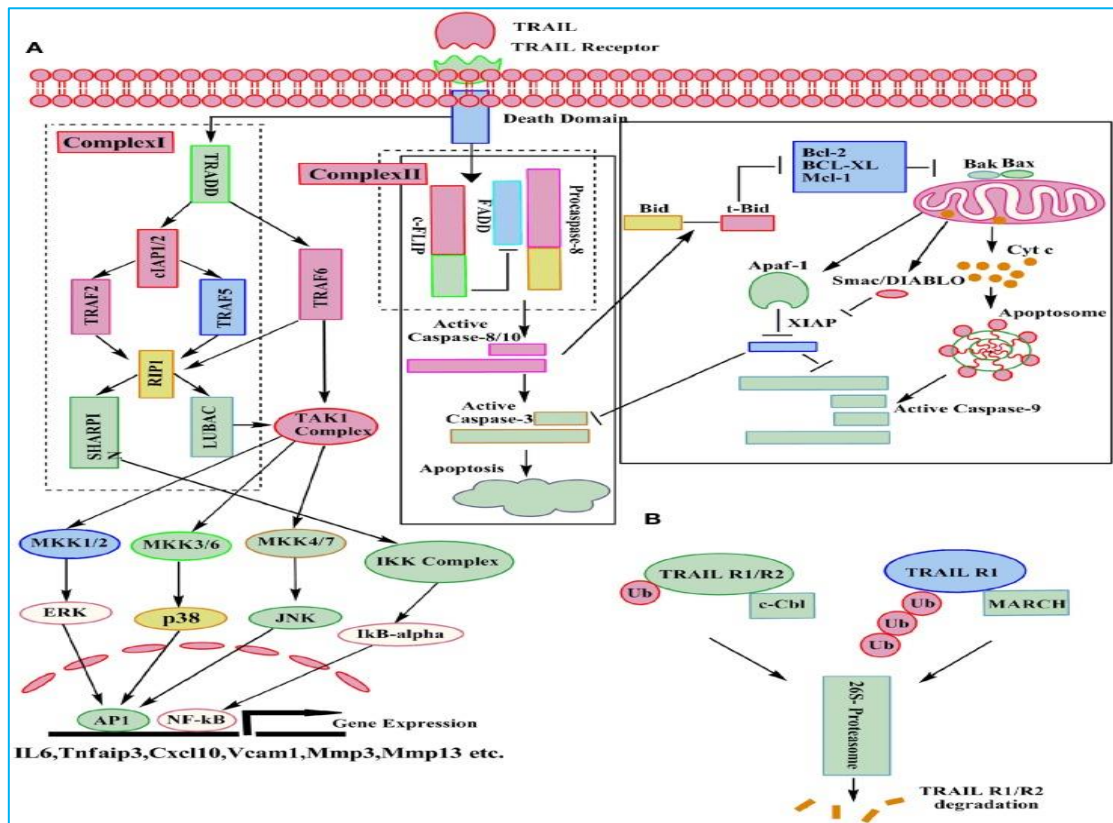
Η ενεργοποίηση της κινάσης ERK φαίνεται να διαμεσολαβεί την επαγόμενη από τον TRAIL ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, μηχανισμός που έχει παρατηρηθεί στα ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος⁶⁶¹ και γλοιώματος⁶⁶². Προνόμιο επιβίωσης παρέχει σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ωοθήκης⁶⁶³, μαστού⁶⁶³, πνεύμονα⁶⁶⁴ και προστάτη⁶⁶⁵ η πυροδοτούμενη από τον TRAIL ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt.

Αλληλένδετη με την επαγόμενη από το δευτερογενές σύμπλεγμα ενεργοποίησης της διαλυτής κινάσης Src είναι η πυροδοτούμενη από τον EGF σηματοδότηση, συμβάλλοντας στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην πυροδοτούμενη από τον TRAIL απόπτωση. Ο EGF προάγει την διαμεσολαβούμενη από τη Src φωσφορυλίωση της τυροσίνης 380 της κασπάσης 8 οδηγώντας στην αδρανοποίηση της⁶⁶⁶ και η επαγόμενη από τον TRAIL ενεργοποίηση της Src ενεργοποιεί μέσω πολύπλοκων μηχανισμών την αλληλεπίδραση EGFR/HER2 με επακόλουθο την ευόδωση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων⁶⁶⁷.

Επιπρόσθετοι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο TRAIL ευοδώνει το μεταστατικό και διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων εμπλέκουν την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL 8), μεταλλοπρωτεασών (MMP 7, MMP 9)^{668,669} καθώς και την ενεργοποίηση του άξονα σηματοδότησης RIP 1/Src/STAT3⁶⁶⁴.

Οι παράγοντες που καθορίζουν εάν η αλληλεπίδραση του TRAIL με τους υποδοχείς TRAILR1 και TRAILR2 θα πυροδοτήσει την κλασσική ή τη μη κλασσική οδό καθώς και εάν η αμφίσημη μη κλασσική οδός θα οδηγήσει στην αναχαίτιση ή, αντίθετα, στην εξέλιξη του όγκου δεν είναι γνωστοί. Οι Varfolomeev και συνεργάτες παρατήρησαν ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης 8 από το πρωτογενές σύμπλεγμα, το οποίο προάγει την απόπτωση με πρωταγωνιστή την πρωτεΐνη FADD, ενεργοποιεί το δευτερογενές σύμπλεγμα στρέφοντας την επαγόμενη από τον TRAIL σηματοδότηση προς την ενεργοποίηση πληθώρας κινασών. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του προτεινόμενου από τους ερευνητές αυτούς μηχανισμού σύμφωνα με τον οποίο η κασπάση 8 απομακρύνει τον FADD από τον TRAILR και άρα ανακόπτει το επαγόμενο από τον TRAIL αποπτωτικό σήμα⁶⁷⁰.

Εικάζεται ότι τα καρκινικά κύτταρα μέσω μηχανισμών ανεξερεύνητων προς το παρόν σφετερίζονται τη μη κλασσική οδό της επαγόμενης από τον TRAIL σηματοδότησης και τη στρέφουν προς την εξέλιξη του όγκου. Η διαλεύκανση των μηχανισμών αυτών αναμένεται να αναδείξει νέους θεραπευτικούς στόχους.



Εικόνα 1.12. A: Η κλασική και η μη κλασική οδός της επαγόμενης από τον TRAIL σηματοδότησης. B: Η αποδόμηση των υποδοχών του TRAIL διαμεσολαβείται από την ubiquitin. Πηγή: Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells. *Frontiers in Oncology* 2015;5:69. doi:10.3389/fonc.2015.00069.

1.3.17. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ OPG/ RANKL/ RANK/ TRAIL ΣΤΟΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΙΣΤΟ

Τα ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την έκφραση των μορίων OPG, RANKL, RANK, TRAIL στον θυρεοειδικό καρκινικό ιστό είναι ελάχιστα και αντιφατικά, προερχόμενα από δύο προγενέστερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες^{671, 672}.

Οι Sood και συνεργάτες διαπίστωσαν την έκφραση της OPG και του RANKL σε θυρεοειδικούς ιστούς τόσο κακοθών όσο και καλοθών θυρεοειδικών βλαβών. Η έκφραση του RANKL, σε αντίθεση με την έκφραση της OPG, παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία καρκίνου. Ωστόσο, απουσία στατιστικά σημαντικής συσχέτισης με χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν επιθετική βιολογική συμπεριφορά του όγκου, όπως το μέγεθος του όγκου, η διήθηση της κάψας, η εξωθυρεοειδική επέκταση, η λεμφαδενική συμμετοχή και η λεμφαγγειακή διήθηση, παρατηρήθηκε όσον αφορά την έκφραση τόσο του RANKL όσο και της OPG. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι ο RANK εκφράζεται στην πλειονότητα των καλοθών θυρεοειδικών βλαβών (84.2%), αλλά σε μικρό ποσοστό των κακοθών βλαβών (8.3%). Επίσης, παρατηρήθηκε απουσία συσχέτισης της έκφρασης του RANK με τα προαναφερθέντα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων. Τέλος, οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι ο

TRAIL εκφράζεται τόσο στις καλοήθειες όσο και στις κακοήθειες θυρεοειδικές βλάβες, χωρίς, όμως, να συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ αυτών. Η διαπίστωση στατιστικά σημαντικής συσχέτισης της έκφρασης του TRAIL με τη λεμφαγγειακή διήθηση θεωρήθηκε καινοτόμο αλλά δυσερμηνευτο εύρημα της μελέτης αυτής⁶⁷¹.

Έκφραση των μορίων OPG, RANKL, RANK στον καρκινικό θυρεοειδικό ιστό σε αντιπαράθεση με την απουσία έκφρασης αυτών στον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό παρατηρήθηκε στη μελέτη των Heymann και συνεργατών. Ωστόσο κανένα από τα μόρια αυτά δε συσχετίστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με το μέγεθος του όγκου και τη λεμφαδενική συμμετοχή. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η έκφραση του RANKL στο 30% του μυελοειδούς καρκινώματος θυρεοειδούς σε αντιδιαστολή με την απουσία της έκφρασης του από το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς θα μπορούσε να αποβεί πολύτιμη πληροφορία για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ αυτών των δύο τύπων καρκίνου. Ωστόσο, ο μικρός αριθμός των ασθενών που εισήχθησαν στη μελέτη αυτή δεν επέτρεψε τη γενίκευση των συμπερασμάτων. Έκφραση του RANK παρατηρήθηκε τόσο στο μυελοειδές όσο και στο θηλώδες και μάλιστα στο ίδιο ποσοστό – 30% – ενώ έκφραση της OPG παρουσίασαν μόνο τα προερχόμενα από παραθυλακίωδη κύτταρα C νεοπλασμάτα. Τέλος η μελέτη αυτή έδωσε το έναυσμα για τη διερεύνηση της δυναμικής συμβολής της αλληλεπίδρασης OPG/RANKL/RANK στο μεταστατικό δυναμικό των θυρεοειδικών όγκων, αποκαλύπτοντας την έκφραση του RANKL, της OPG και του RANK στις λεμφαδενικές μεταστατικές εστίες του μυελοειδούς καρκινώματος θυρεοειδούς, και ειδικότερα στα μακροφάγα, στα ενδοθηλιακά και στα καρκινικά κύτταρα, αντίστοιχα⁶⁷².

Παρά το γεγονός ότι ο RANKL, ο RANK, η OPG και ο TRAIL αποτελούν αντικείμενο εξελισσόμενης έρευνας τα τελευταία 30 έτη, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Δεδομένης της τεκμηριωμένης συμβολής των εν λόγω μορίων στη γένεση και εξέλιξη του καρκίνου, η μελέτη τους στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς σηματοδοτεί ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας.

1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Πολυσύνθετη είναι η εφαρμογή των ερευνητικών δεδομένων που αφορούν το μοριακό υπόβαθρο του καρκίνου του θυρεοειδούς στην κλινική πράξη: Αποσκοπεί στην αποκρυπτογράφηση της παθογένειας της νόσου, στην ερμηνεία των επιδημιολογικών δεδομένων, στην ακριβέστερη προεγχειρητική διάγνωση, στην ανάδειξη καινοτόμων θεραπευτικών στόχων και στην πρόγνωση της πορείας της νόσου.

ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αξιοσημείωτες μεταβολές στο μοριακό προφίλ του καρκίνου του θυρεοειδούς συντελούνται τις τελευταίες δεκαετίες σύμφωνα με την πρόσφατη μετα-ανάλυση των Vuong και συνεργατών⁶⁷³. Οι ερευνητές αυτοί διατύπωσαν την υπόθεση ότι η μοριακή υπογραφή των όγκων αντικατοπτρίζει αιτιογενείς πτυχές της γένεσης και εξέλιξης του καρκίνου του θυρεοειδούς. Η κατανόηση του γενετικού τοπίου της νόσου υποδεικνύει δύο συνιστώσες του παθογενετικού υπόβαθρου. Συγκεκριμένα, η αύξηση της επίπτωσης των BRAF μεταλλάξεων πιθανότατα αντανακλά το ογκογόνο δυναμικό του *status* της πρόσληψης ιωδίου, ενώ η μείωση της επίπτωσης των RET/PTC ανασυνδυασμών ενδέχεται να αντανακλά την εξασθένιση με την πάροδο του χρόνου της επίδρασης της ακτινοβολίας που προήλθε από το πυρηνικό ατύχημα στο Chernobyl. Επίσης, η δραματική αύξηση της επίπτωσης των Ras μεταλλάξεων ίσως αντανακλά την αύξηση της επίπτωσης του θυλακίωδους υπότυπου του θηλώδους που φέρει Ras

μεταλλάξεις. Εικάζεται ότι η περαιτέρω διερεύνηση του μοριακού υπόβαθρου του καρκίνου του θυρεοειδούς θα ρίξει φως στην παθογένεια της νόσου καθώς και στην ερμηνεία της αύξησης της επίπτωσης της που συντελείται τις τελευταίες δεκαετίες⁶⁷³.

ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Ενδιαφέρον αντικείμενο έρευνας τα τελευταία 20 χρόνια αποτελεί η ανίχνευση μοριακών δεικτών στο δείγμα της FNAB με στόχο τη βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας της μεθόδου. Το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ανίχνευση μοριακών βιοδεικτών με υψηλή διαγνωστική αξία όσον αφορά την παρουσία καρκίνου σε όζους θυρεοειδούς, στους οποίους το αποτέλεσμα της FNAB χαρακτηρίστηκε ως “ακαθόριστο” και συνιστά δυσεπίλυτο διαγνωστικό γρίφο⁶⁷⁴. “Ακαθόριστα” κυτταρολογικά ευρήματα απαντώνται στο 25% του συνόλου των FNAB και, σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης Bethesda (2007), υποδιαιρούνται σε 3 κατηγορίες: “θυλακίωσης βλάβη ή ατυπία ακαθόριστης σημασίας”, “θυλακίωδες νεόπλασμα” και “βλάβη ύποπτη για παρουσία κακοηθούς νόσου”, με παρουσία καρκίνου στο 5–15%, στο 15–30% και στο 60–75% του συνόλου, αντίστοιχα⁶⁷⁵. Η πλειοψηφία των ασθενών στους οποίους η κυτταρολογική εξέταση χαρακτηρίζεται ως ακαθόριστη υποβάλλεται σε χειρουργική επέμβαση με σκοπό να τεθεί η διάγνωση. Σε ποσοστό ίσο με 10–40% των ασθενών αυτών η παθολογοανατομική εξέταση τεκμηριώνει την παρουσία καρκίνου.

Με στόχο την αύξηση της διαγνωστικής ακρίβειας της FNAB προτάθηκε από τους Alexander και συνεργάτες η ανάλυση της έκφρασης 167 mRNA που θεωρείται ικανή να αποκλείσει την παρουσία καρκίνου, αλλά αδυνατεί να θέσει τη διάγνωση της νόσου λόγω χαμηλής ειδικότητας (52%), σε αντίθεση με την υψηλή ευαισθησία (92%) και την υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (85–95%)⁶⁷⁶. Παρομοίως, δύο test που εστιάζουν στην ανίχνευση miRNA – το ThyGenX/ ThyraMIR που ελέγχει τον συνδυασμό 10 miRNA με μεταλλάξεις 7 γονιδίων και το Rosetta GX Reveal που ελέγχει 24 miRNA – παρουσιάζουν υψηλή αρνητική προγνωστική αξία –94% και 91%, αντίστοιχα– αλλά χαμηλή θετική προγνωστική αξία: 74% και 59%, αντίστοιχα^{677, 678}.

Από την άλλη πλευρά, η μοριακή ανάλυση της ομάδας των γενετικών αλλαγών που περιλαμβάνει τις μεταλλάξεις BRAF και Ras καθώς και τις γενετικές αναδιατάξεις RET/PTC και PAX8/PPARγ θέτει τη διάγνωση καρκίνου χάρη στην υψηλή ειδικότητα (98%) και στην υψηλή θετική προγνωστική της αξία (87–95%), αλλά αδυνατεί να αποκλείσει την παρουσία νόσου λόγω χαμηλής ευαισθησίας (61%)⁶⁷⁹.

Πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο ενδέχεται να αποδειχθεί η δοκιμασία ThyroSeq v2, η οποία ελέγχει ταυτόχρονα σημειακές μεταλλάξεις και προσθήκες/ελλείψεις βάσεων σε 14 γονίδια, τα επίπεδα έκφρασης 16 γονιδίων και 42 γενετικούς ανασυνδυασμούς. Παρά το γεγονός ότι η δοκιμασία αυτή διαθέτει τον ιδεατό συνδυασμό υψηλής αρνητικής (96–97%) και θετικής (77–83%) προγνωστικής αξίας, υψηλής ευαισθησίας (90%) και ειδικότητας (93%), απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την εδραίωση της στην κλινική πράξη⁶⁸⁰⁻⁶⁸².

ΣΤΟΧΕΥΟΥΣΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ανεξάντλητος είναι ο κατάλογος των μορίων που αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους λόγω της τεκμηριωμένης συμβολής τους στη γένεση και εξέλιξη των όγκων θυρεοειδούς. Μεταξύ αυτών προεξάρχουν η κινάση BRAF, το ογκογονίδιο RET, οι ογκοπρωτεΐνες RAS, οι υποδοχείς VEGFR και EGFR, οι πρωτεΐνες Wnt, οι μεταγραφικοί παράγοντες NFκB και PPARγ καθώς και οι επιγενετικές αλλαγές⁶⁸³⁻⁶⁸⁵.

Δύο αναστολείς πολλαπλών κινάσων έχουν λάβει προς το παρόν έγκριση από τον FDA για τη χορήγηση σε ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς. Το Sorafenib αποτελεί αναστολέα

των μορίων RET, Flt3, Kit, BRAF, VEGFR 1-3, που έλαβε έγκριση τον Νοέμβριο του 2013 για τη θεραπεία του μεταστατικού διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς⁶⁸⁶. Τον Φεβρουάριο του 2015 δόθηκε έγκριση στο Levatinibe, τον αναστολέα των μορίων VEGFR 1-3, FGFR 1-4, RET, c-KIT, PDGF-Rb (platelet-derived growth factor receptor-beta), για τη θεραπεία του μεταστατικού, εξελισσόμενου, ανθεκτικού στη χορήγηση RAI, διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς, καθώς και της νόσου με τοπική υποτροπή⁶⁸⁷. Υπό έρευνα βρίσκεται η ανάκτηση από τα καρκινικά κύτταρα της ικανότητας πρόσληψης RAI μέσω χορήγησης του Selumetinib ενός αναστολέα MEK1/2⁶⁸⁸.

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναγνώριση μοριακών βιοδεικτών που σχετίζονται με δυσμενή κλινική έκβαση, όπως η μετάλλαξη BRAF, η οποία παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό στο θηλώδες καρκίνωμα που εκδηλώνει υποτροπή ιδιαίτερα στο κεντρικό λεμφαδενικό διαμέρισμα (78–95%)^{689,690}. Παρά το γεγονός ότι η ανίχνευση της μετάλλαξης αυτής στο δείγμα της FNAB διαθέτει υψηλή αρνητική προγνωστική αξία αναφορικά με την υποτροπή της νόσου (90%), η εδραίωση της ως προγνωστικού δείκτη παρεμποδίζεται, προς το παρόν, από τη χαμηλή θετική προγνωστική αξία της (47%) καθώς και από το γεγονός ότι μόνο το 21% των όγκων που εκφράζουν τη μετάλλαξη BRAFV600E θα εκδηλώσουν τελικά υποτροπή της νόσου⁶⁹¹.

Μολονότι, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ATA (2015) ο μοριακός έλεγχος του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς βρίσκεται εν τω γεννάσθαι⁹, διαφαίνεται μία ευοίωνη προοπτική εφαρμογής αυτού στην κλινική πράξη. Για παράδειγμα, προτάθηκε πρόσφατα ότι η αναθεώρηση της ταξινόμησης των θηλωδών καρκινωμάτων θυρεοειδούς βάσει των διαφορών μεταξύ των όγκων που φέρουν Ras μεταλλάξεις και των όγκων που φέρουν BRAF μεταλλάξεις θα αποτελέσει καινοτόμο προσέγγιση. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, πολυάριθμοι εν δυνάμει βιοδείκτες του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς βρίσκονται υπό έρευνα με έμφαση στον ρόλο τους στα θηλώδη καρκινώματα με χαμηλό ή ενδιάμεσο κίνδυνο υποτροπής, ο θεραπευτικός χειρισμός των οποίων εγείρει αντιπαραθέσεις.

2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο συγκερασμός της αληθούς αύξησης της επίπτωσης του καρκίνου του θυρεοειδούς, κατεξοχήν του θηλώδους τύπου, με την ολοένα συχνότερη διάγνωση νόσου με απουσία κλινικών εκδηλώσεων τις τελευταίες δεκαετίες καθιστά δυσδιάκριτα τα όρια μεταξύ της “επιδημίας της νόσου *per se*” και της “επιδημίας της διάγνωσης”⁴. Το γεγονός αυτό επιτάσσει την αναγνώριση των επιθετικών μορφών της νόσου και την εξατομίκευση της θεραπευτικής στρατηγικής.⁴ Ακρογωνιαίο λίθο της προσέγγισης αυτής αποτελεί η θεώρηση του κινδύνου υποτροπής του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς ως *continuum* που αποτελεί το ολοκλήρωμα των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών με τη μοριακή υπογραφή των όγκων⁹.

Μέχρι πρότινος, στο μοριακό υπόβαθρο του διαφοροποιημένου καρκίνου θυρεοειδούς επικρατούσε η αρχή του “αμοιβαίου αποκλεισμού”, σύμφωνα με την οποία η παρουσία BRAF μεταλλάξεων – ορόσημο του κλασσικού θηλώδους υπότυπου και της ανεξέλεγκτης ενεργοποίησης της οδού MAPK – αποκλείει την παρουσία άλλων γενετικών αλλαγών που ενεργοποιούν τις οδούς MAPK και PI3K/AKT, όπως είναι οι RAS μεταλλάξεις – ορόσημο του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους – και οι RET/PTC ανασυνδυασμοί, που απαντώνται στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο και στον υπότυπο “υψηλών κυττάρων”²⁹⁹. Πρόσφατα, η συνομιλία μεταξύ των σηματοδοτικών οδών προσέλκυσε το επιστημονικό ενδιαφέρον ως εννοησυστηματική όχι μόνο της εξέλιξης αλλά και της γένεσης των διαφοροποιημένων όγκων θυρεοειδούς⁷.

Η παρούσα μελέτη διερευνά για πρώτη φορά την ταυτόχρονη έκφραση των πλειοτροπικών κυτταροκινών RANKL, OPG, TRAIL, των ογκοπρωτεϊνών KRas και c-Fos καθώς και της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς με σκοπό τη διαλεύκανση της συμβολής τους στο μοριακό προφίλ της εν δυνάμει μεταστατικής νόσου.

Δεδομένου του διακριτού κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ των ιστολογικών υπότυπων του θηλώδους, η έκφραση των υπό μελέτη μορίων αναλύθηκε ανάλογα με τον ιστολογικό υπότυπο του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς. Επίσης, η έκφραση των υπό μελέτη μορίων διερευνήθηκε σε σχέση με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων ενδεικτικών επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς ώστε να διαλευκανθεί εάν τα μόρια αυτά συμβάλλουν στην ανίχνευση των επιθετικών μορφών της νόσου. Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην αναδυόμενη σημασία των κυτταροκινών RANKL, OPG, TRAIL στην εκδήλωση λεμφαδενικών μεταστάσεων σε καθέναν από τους δύο κύριους ιστολογικούς υπότυπους του θηλώδους, τον κλασσικό και τον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους. Πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των υπό μελέτη μορίων και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο σύνολο του θηλώδους αναλύθηκαν με μοντέλα λογαριθμικής παλινδρόμησης κατάλληλα προσαρμοσμένα για τεκμηριωμένους προγνωστικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο και το στάδιο T (AJCC/TNM 7^η έκδοση) της νόσου. Επίσης, αναλύθηκαν όλα τα ζεύγη των συνεκφράσεων των μορίων σύμφωνα με το λεμφαδενικό status στο σύνολο του θηλώδους καρκινώματος.

Επιπλέον, αναλύθηκε η σχέση των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των όγκων με την εκδήλωση λεμφαδενικών μεταστάσεων με σκοπό τη διερεύνηση του κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς που μεθίσταται στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα

2.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟ

Η παρούσα αναδρομική μελέτη περιλαμβάνει ασθενείς που προσήλθαν στην Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών από το 2009 έως το 2014 για χειρουργική αντιμετώπιση παθήσεων του θυρεοειδούς αδένα. Στη μελέτη εισήχθησαν 114 ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ολική θυρεοειδεκτομή με σύγχρονη αφαίρεση των λεμφαδένων του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος. Κριτήριο επιλογής των ασθενών ήταν η παθολογοανατομική τεκμηρίωση της παρουσίας θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς (PTC: papillary thyroid carcinoma). Το κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ορίστηκε σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες⁶⁹². Αποκλείστηκαν από τη μελέτη ασθενείς στους οποίους η παθολογοανατομική εξέταση έθεσε τη διάγνωση μυελοειδούς ή αναπλαστικού καρκινώματος θυρεοειδούς ή συνύπαρξης μυελοειδούς και θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς καθώς και ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επανεπέμβαση λόγω υποτροπής της νόσου.

Πρόκειται για ανοσοϊστοχημική μελέτη το υλικό της οποίας απαρτίζεται από δείγματα θυρεοειδικού ιστού προερχόμενα από τους όγκους των εν λόγω ασθενών μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε κύβους παραφίνης.

Το πρωτόκολλο της μελέτης έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών και η μελέτη διενεργήθηκε σε αρμονία με τις αρχές της Συνθήκης του Ελσίνκι.

2.3. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

2.3.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί πολύτιμο εφόδιο στη διαγνωστική φαρέτρα πολυάριθμων νοσημάτων και ιδιαίτερα των νεοπλασμάτων. Πρόκειται για τομέα της ιστοπαθολογίας με αντικείμενο την αναγνώριση φυσιολογικών και παθολογικών συστατικών των κυττάρων ή των ιστών, όπως είναι οι υποδοχείς των ορμονών, τα ένζυμα, τα γλυκολιπίδια, οι γλυκοπρωτεΐνες και τα ινίδια διάμεσου ιστού. Τα θεμέλια της μεθόδου τέθηκαν από τους Coops και συνεργάτες, οι οποίοι πρότειναν τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού εφαρμόζοντας ειδικούς αντιορούς έναντι των προς ανίχνευση μορίων συνδεδεμένου με φθορίζουσα ουσία, την ισοθειοκυανική φλουροσκεΐνη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται από την αντίδραση του υπό διερεύνηση αντιγόνου με το αντίσωμα καθίστανται ορατά κατά τη μικροσκόπηση λόγω του φθορισμού που παράγει η φλουροσκεΐνη. Εγγενή μειονεκτήματα της μεθόδου του ανοσοφθορισμού έστρεψαν το ερευνητικό ενδιαφέρον προς τις ανοσοενζυματικές τεχνικές που βασίζονται στην εφαρμογή αντισωμάτων σημασμένων με ειδικά ένζυμα. Το σύμπλεγμα αντισώματος-ενζύμου, χάρη στις ανοσολογικές και ενζυματικές του ιδιότητες, δεσμεύει το υπό αναζήτηση αντιγόνο στον ιστό και μεταβάλλει το χρώμα ενός κατάλληλου χρωμογόνου υποστρώματος, καθιστώντας το ανοσοσύμπλεγμα ορατό με το κοινό μικροσκόπιο. Οι πιο διαδεδομένες ανοσοενζυματικές μέθοδοι είναι η μέθοδος της ανοσοϋπεροξειδάσης και η μέθοδος του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων της ανοσοϊστοχημείας που την καθιστούν εξαιρετικά ενδιαφέρουσα μέθοδο συγκαταλέγονται η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η δυνατότητα εφαρμογής τόσο σε τομές ψυκτικού όσο και σε τομές παραφίνης, η διατήρηση της μορφολογίας των ιστών και των κυττάρων, η συμβατότητα με όλα τα μονιμοποιητικά υλικά, η επαναληψιμότητα και η δυνατότητα εφαρμογής ακόμα και σε ιστολογική τομή στην οποία έχει

προηγηθεί χρώση ρουτίνας και τέλος η δυνατότητα αρχειοθέτησης του υλικού⁶⁹³. Τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα μας ώθησαν να επιλέξουμε την ανοσοϊστοχημεία ως μέθοδο ανίχνευσης της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων στην παρούσα εργασία.

2.3.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ελήφθησαν 6 τομές από κάθε κύβο παραφίνης, πάχους 3 έως 5 mm η καθεμία μέσω μικροτόμου. Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 60°C για χρονικό διάστημα 60 λεπτών. Μετά την αποπαραφίνωση και την ενυδάτωση με εφαρμογή, αντίστοιχα, ξυλόλης και διαλυμάτων αλκοόλης διαβαθμισμένης συγκέντρωσης, εφαρμόστηκε μέθοδος ανάκτησης των αντιγονικών θέσεων επαγόμενη από τη θερμότητα σε φούρνο μικροκυμάτων (microwave) με ρυθμιστικό διάλυμα με pH 9 (Target Retrieval Solution High pH DAKO). Στη συνέχεια, τα πλακίδια παρέμειναν για χρονικό διάστημα διάρκειας 10 λεπτών στο ρυθμιστικό διάλυμα και κατόπιν ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης για χρονικό διάστημα διάρκειας 10 λεπτών. Ακολούθησε η τοποθέτηση των πλακιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Buffered NaCl solution with TWEEN20 pH7.6 DAKO, 2 φορές χρονικής διάρκειας 5 λεπτών έκαστη. Έπειτα, τα πλακίδια τοποθετήθηκαν στο αυτόματο μηχάνημα Autostainer Dako, όπου ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο: Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Buffered NaCl solution with TWEEN20 pH7.6 DAKO. Στη συνέχεια, επώαστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα για 60 λεπτά και ξεπλύθηκαν εκ νέου με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Buffered NaCl solution with TWEEN20 pH7.6 DAKO. Εφαρμόστηκαν τα εξής πρωτογενή αντισώματα: anti-RANKL (ab9957 Abcam Cambridge, UK, αραιώση:1/100), anti-OPG (ab73400, Abcam Cambridge, UK, αραιώση:1/100), anti-TRAIL (ab9959 Abcam Cambridge,UK, αραιώση:1/500), anti-p53 (DO7, Catalog No MU239-UC, Biogenex Laboratories, San Ramon, USA, αραιώση: 1/200), anti-KRas (ab180772, Abcam Cambridge, UK, αραιώση: 1/100), anti-c-Fos (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, αραιώση:1/100). Ακολούθησε η δέσμευση της ενδογενούς δραστηριότητας της υπεροξειδάσης μέσω εφαρμογής του peroxidase blocking reagent DAKO για 5 λεπτά και ξέπλυμα των πλακιδίων με Tris-Buffered NaCl solution with TWEEN20 pH7.6 DAKO. Μετά την επώαση με πολυμερές συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (En Vision Detection System Peroxidase/DAB Kit) χρονικής διάρκειας 25 λεπτών τα πλακίδια ξεπλύθηκαν εκ νέου με Tris-Buffered NaCl solution with TWEEN20 pH7.6 DAKO. Στη συνέχεια, τα πλακίδια επώαστηκαν με χρωμογόνο DAB για 10 λεπτά και ξεπλύθηκαν με DW (Dextrose in water). Μετά από αντίχρωση με αιματοξυλίνη για 1 λεπτό, τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και υποβλήθηκαν σε αφυδάτωση, διαύγαση και επικάλυψη.

Ενδεικτικές εικόνες εκτίμησης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των υπό μελέτη μορίων σε καρκινικούς θυρεοειδικούς ιστούς προερχόμενους από τους όγκους των ασθενών της μελέτης μας παρατίθενται στο παράρτημα της παρούσας διδακτορικής διατριβής (Εικόνα Α έως F).

2.3.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

Δύο χαρακτηριστικά της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των υπό μελέτη μορίων αξιολογήθηκαν σε κάθε πλακίδιο: η ένταση της χρώσης, η οποία ταξινομήθηκε σε 4 κατηγορίες – απύσση χρώση (βαθμός 0), ασθενής χρώση (βαθμός 1), μέτρια χρώση (βαθμός 2) και έντονη χρώση (βαθμός 3) – και το ποσοστό των θετικών κυττάρων που αντιστοιχεί σε καθεμία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες. Η ημιποσοτική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης προσεγγίστηκε μέσω του υπολογισμού του H score για καθένα από τα υπό μελέτη μόρια σε κάθε πλακίδιο, όπως έχει ήδη περιγραφεί στη σύγχρονη βιβλιογραφία⁶⁹⁴. Ειδικότερα, πολλαπλασιάστηκε ο βαθμός κάθε κατηγορίας έντασης –κυμαινόμενος από 0 έως 3– με το αντίστοιχο ποσοστό κυττάρων που κυμαίνεται από 0% έως 100%. Τα επιμέρους γινόμενα αθροίστηκαν

οδηγώντας στο τελικό H score, το οποίο έλαβε τιμές εύρους από 0 έως 300, σύμφωνα με τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο:

$H = 1 \times [\text{επί τοις εκατό ποσοστό των κυττάρων με χρώση ασθενούς έντασης (1+)}] + 2 \times [\text{επί τοις εκατό ποσοστό των κυττάρων με χρώση μέτριας έντασης (2+)}] + 3 \times [\text{επί τοις εκατό ποσοστό των κυττάρων με χρώση έντονης έντασης (3+)}]^{694}$.

2.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν αρχικά οι στατιστικές παράμετροι των H score των υπό μελέτη μορίων οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. Ακολουθώντας, όσον αφορά καθένα από τα μόρια c-Fos, RANKL, OPG, TRAIL, τα ευρήματα της αξιολόγησης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: αρνητική έκφραση (H score=0), χαμηλή έκφραση ($0 < H \text{ score} < \text{median H-score}$), υψηλή έκφραση ($H \text{ score} \geq \text{median}$). Τα ευρήματα της αξιολόγησης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μορίων p53 και KRas ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες: αρνητική έκφραση (H score=0) και θετική έκφραση (H score>0).

Όλες οι μεταβλητές ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα τους χρησιμοποιώντας το στατιστικό test Kolmogorov-Smirnov. Δεδομένου ότι καμία μεταβλητή δεν ακολουθούσε κανονική κατανομή, μη παραμετρικά tests χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση που ακολούθησε. Pearson chi-square test ή Fisher exact test όταν ο αριθμός των περιπτώσεων σε μία κατηγορία ήταν μικρότερος από δέκα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των κατηγορικών δεδομένων.

Η έκφραση των υπό μελέτη μορίων αναλύθηκε ξεχωριστά σε καθέναν από τους τρεις ιστολογικούς υπότυπους. Μελετήθηκε η συσχέτιση των εκφράσεων των υπό έρευνα μορίων με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που θεωρούνται παράγοντες επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς: ηλικία μεγαλύτερη από 45 έτη (σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM), άρρεν φύλο, ιστολογικός υπότυπος, διήθηση κάψας, παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, στάδιο T και στάδιο TNM σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM.

Λόγω της στατιστικά σημαντικής συσχέτισης των OPG, RANKL, TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και του διακριτού κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ των επιμέρους υπότυπων του θηλώδους, η συσχέτιση της έκφρασης των μορίων RANKL, OPG, TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων μελετήθηκε ανά ιστολογικό υπότυπο. Συγκεκριμένα, σε καθέναν από τους δύο κύριους ιστολογικούς υπότυπους, στον κλασσικό θηλώδη και στον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους, οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με το λεμφαδενικό status (παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ή απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων) και διερευνήθηκε περαιτέρω η συσχέτιση της έκφρασης καθενός από τα μόρια RANKL, OPG, TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Η μελέτη αυτή δεν πραγματοποιήθηκε στον υπότυπο “υψηλών κυττάρων” λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών που περιλαμβάνονται σε αυτόν τον ιστότυπο.

Για τη διερεύνηση της σχέσης της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα λογαριθμικής παλινδρόμησης (multiple logistic regression analysis) προσαρμοσμένα για τρεις τεκμηριωμένους προγνωστικούς παράγοντες: ηλικία, φύλο και στάδιο T σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM. Με τα μοντέλα λογαριθμικής παλινδρόμησης υπολογίστηκε ο σχετικός κίνδυνος για την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων σε σχέση με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων με βάση την έκφραση κάθε μορίου. Σε όλα τα μοντέλα, τις συμμεταβλητές αποτέλεσαν η ηλικία, το φύλο και το στάδιο T σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM.

Σε όλες τις αναλύσεις, ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε η τιμή p μικρότερη από 0.05 ($p < 0.05$). Η στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε με εφαρμογή του SPSS (IBM Statistical Package for Social Sciences v. 21.0, Chicago, IL).

Πίνακας 2.1. Στατιστικές παράμετροι του H score των ανοσοϊστοχημικών εκφράσεων p53, KRas, c-Fos, RANKL, TRAIL, OPG

	H score					
	TP 53	KRAS	CFOS	RANKL	TRAIL	OPG
<i>n</i> έγκυρος	57	57	57	56	57	57
Απούσα τιμή	0	0	0	1	0	0
Μέση τιμή	3.86	68.95	74.74	166.79	82.11	122.98
Διάμεσος	.00	.00	80.00	200.00	100.00	100
Σταθερά απόκλισης	16.557	84.445	66.039	111.210	90.109	112.106
Ελάχιστη τιμή	0	0	0	0	0	0
Μέγιστη τιμή	100	300	270	300	300	300

n: αριθμός ασθενών

2.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.5.1. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

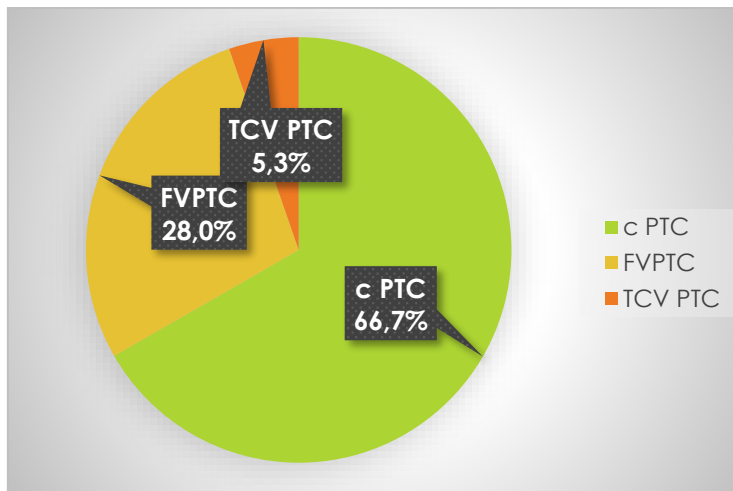
Ο πληθυσμός της παρούσας μελέτης απαρτίζεται από 114 ασθενείς των οποίων η μέση ηλικία ήταν 39.27 έτη με σταθερά απόκλισης (SD) ίση με 13.68. Η ηλικία της πλειοψηφίας των ασθενών, ποσοστού ίσου με το 63.2% του συνόλου, ήταν μικρότερη από 45 έτη. Ο αριθμός των γυναικών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη υπερείχε έναντι αυτού των αντρών (92 έναντι 20, αντίστοιχα), διαμορφώνοντας τον λόγο του επί του συνόλου εκατοστιαίου ποσοστού των γυναικών προς το αντίστοιχο των αντρών ίσο με 4.6 (80.7%/17.5%). Ο κλασικός υπότυπος του θηλώδους (c PTC: classical PTC) αποτέλεσε τον συχνότερο ιστολογικό υπότυπο στον πληθυσμό της μελέτης μας, καθώς αφορούσε το 66.7% των όγκων, ενώ ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους (FVPTC: follicular variant of PTC) και ο υπότυπος “υψηλών κυττάρων” (TCV PTC: tall cell variant of PTC) αποτέλεσαν αντίστοιχα το 28% και 5.3% των υπό μελέτη όγκων. Πολυεστιακή φύση των όγκων, διήθηση της κάψας, συνύπαρξη ιστολογικά επιβεβαιωμένης θυρεοειδίτιδας Hashimoto διαπιστώθηκε στο 50.9%, 57.9%, 61.4%, αντίστοιχα, του συνόλου των όγκων. Η παθολογοανατομική εξέταση τεκμηρίωσε την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα στο 47.4% των ασθενών. Εφαρμόζοντας την 7η έκδοση του συστήματος ταξινόμησης AJCC/TNM, το στάδιο T χαρακτηρίστηκε ως T1_a, T1_b, T2 και T3 στο 36.8%, 22.8%, 3.5% και 36.8% των όγκων, αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των ασθενών, το 86% του συνόλου, παρουσίασε νόσο σταδίου I, ενώ το 12.3% παρουσίασε νόσο σταδίου III και το 1.8% νόσο σταδίου II, σύμφωνα με την 7^η έκδοση του συστήματος ταξινόμησης AJCC/TNM. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.2.**

Πίνακας 2.2. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

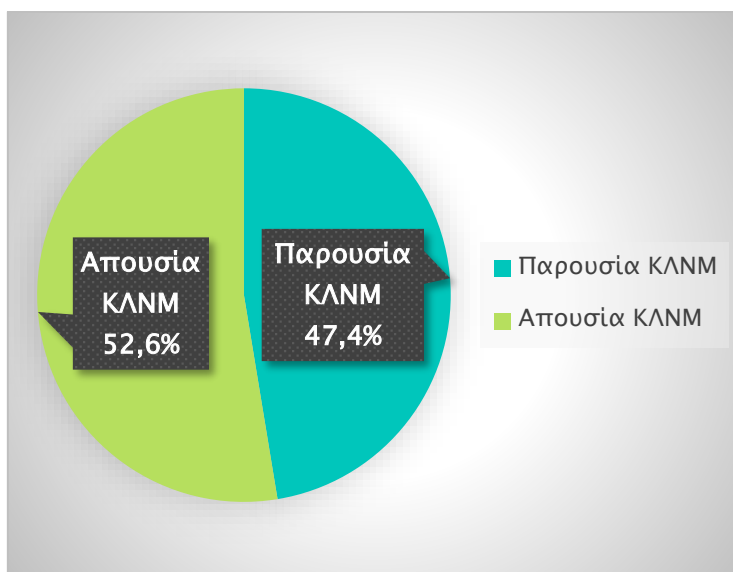
Χαρακτηριστικά	n (%)
Ηλικία ^a	
Μέση τιμή (SD): 39.27 έτη (13.68)	
<45 years	72 (63.2)
≥45 years	32 (28.1)
Φύλο ^b	
Άνδρες	20 (17.5)
Γυναίκες	92 (80.7)
Υπότυπος PTC	
c PTC	76 (66.7)
FVPTC	32 (28)
TCV PTC	6 (5.3)
Πολλαπλές εστίες ^c	
Ναι	58 (50.9)
Όχι	54 (47.4)
Διήθηση κάψας	
Ναι	66 (57.9)
Όχι	48 (42.1)
Status ΚΛΝΜ	
Παρουσία ΚΛΝΜ	54 (47.4)
Απουσία ΚΛΝΜ	60 (52.6)
ΗΤ	
Ναι	70 (61.4)
Όχι	44 (38.6)
Στάδιο T	
1a	42 (36.8)
1b	26 (22.8)
2	4 (3.6)
3	42 (36.8)
Σταδιο AJCC/TNM	
I	98 (85.9)
II	2 (1.8)
III	14 (12.3)

Επεξηγήσεις: n (%): αριθμός ασθενών (ποσοστό %), a,b,c: missing values (απουσίες τιμές)

Συντομογραφίες: PTC: θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, c PTC: κλασικός υπότυπος του θηλώδους, FVPTC: θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους, TCV PTC: υπότυπος “υψηλών κυττάρων”, ΚΛΝΜ: λεμφαδενικές μεταστάσεις κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος, ΗΤ: Θυρεοειδίτιδα Hashimoto, AJCC/TNM: American Joint Committee on Cancer /Tumor –Node– Metastasis



Γράφημα 2.1. Οι ιστολογικοί τύποι των όγκων του πληθυσμού της μελέτης. Συνομογραφίες: όπως στον πίνακα 2.2



Γράφημα 2.2. Το λεμφαδενικό status του πληθυσμού της μελέτης. Συνομογραφία: όπως στον πίνακα 2.2

2.5.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων ανά ιστολογικό υπότυπο PTC

Λόγω του διακριτού προφίλ των επιμέρους ιστολογικών υπότυπων του θηλώδους, η έκφραση των υπό μελέτη μορίων μελετήθηκε όχι μόνο στο σύνολο του PTC (θηλώδους) αλλά και ξεχωριστά σε καθέναν από τους τρεις ιστολογικούς υπότυπους. Σύμφωνα με τα δεδομένα που παρατίθενται στον **πίνακα 2.3**, επί του συνόλου του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς, θετική έκφραση RANKL, OPG, TRAIL, KRas, c-Fos, p53 παρατηρήθηκε στο 78.6% (88/112), 63.2% (72/114), 61.4% (70/114), 47.4% (54/114), 73.7% (84/114), 7%(8/114) αντίστοιχα.

Θετική έκφραση RANKL διαπιστώθηκε στο 75.6% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, στο 81.3% του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους και στο 100% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Το 63.6% των όγκων με θετική RANKL έκφραση αφορούσε τον κλασσικό θηλώδη υπότυπο, το 29.5% τον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους και το 6,8% τον υπότυπο “υψηλών κυττάρων”.

Το 57.9% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, το 68.8% του θυλακιδώδους υπότυπου και το 100% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων” παρουσίασαν θετική OPG έκφραση. Μεταξύ των όγκων με θετική OPG έκφραση, ο κλασσικός θηλώδης υπότυπος αντιπροσωπεύει το 61.1%, ο θυλακιδώδης υπότυπος το 30.6% και ο υπότυπος “υψηλών κυττάρων” το 8.3%.

Όσον αφορά τη θετική έκφραση TRAIL, αυτή παρατηρήθηκε στο 57.8% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, στο 62.5% του θυλακιδώδους υπότυπου στο 100% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Ο κλασσικός θηλώδης υπότυπος αποτελεί την πλειονότητα των όγκων με θετική TRAIL έκφραση, το 62.9%, ενώ ο θυλακιδώδης υπότυπος του θηλώδους και ο υπότυπος “υψηλών κυττάρων” αποτελούν τον δεύτερο και τρίτο κατά σειρά φθίνουσας συχνότητας όγκο που εκφράζει TRAIL, με ποσοστά 28.6% και 8.6%, αντίστοιχα.

Θετική έκφραση KRas παρουσίασε το 47.4% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, το 50% του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους και το 33.3% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Μεταξύ των όγκων που παρουσιάζουν θετική έκφραση KRas, το 66.7% ανήκε στον κλασσικό τύπο του θηλώδους, το 29.6% στον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους και το 3.7% στον υπότυπο “υψηλών κυττάρων”.

Θετική c-Fos έκφραση παρατηρήθηκε στο 71% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, στο 81.3% του θυλακιδώδους υπότυπου και στο 66.7% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Μεταξύ των όγκων που εκφράζουν c-Fos προεξάρχει ο κλασσικός θηλώδης τύπος με ποσοστό 64.3%, ενώ ο θυλακιδώδης υπότυπος και ο υπότυπος “υψηλών κυττάρων” αποτελούν το 31% και το 4.8%, αντίστοιχα.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη p53, θετική έκφραση διαπιστώθηκε μόνο στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο και στον θυλακιδώδη υπότυπο σε ποσοστό 7.9% και 6.3%, αντίστοιχα. Το 75% του συνόλου των όγκων που εκφράζουν p53 αντιπροσωπεύεται από τον κλασσικό θηλώδη υπότυπο και το 25% από τον θυλακιδώδη υπότυπο.

Πίνακας 2.3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων ανά ιστολογικό υπότυπο θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς (PTC) και στο σύνολο του PTC

Ανοσοϊστοχημική έκφραση		Υπότυπος PTC			
		c PTC n (%)	FVPTC n (%)	TCV PTC n (%)	PTC n (%)
RANKL	Αρνητική	18 (24.3)	6 (18.8)	0 (0.0)	24 (21.4)
	Χαμηλή	36 (48.6)	8 (25)	2 (33.3)	46 (41.1)
	Υψηλή	20 (27)	18 (56.3)	4 (66.7)	42 (37.5)
	Σύνολο	74 (97.4) ^a	32 (100)	6 (100)	112 (100)
OPG	Αρνητική	32 (42.1)	10 (31.3)	0 (0.0)	24 (36.8)
	Χαμηλή	14 (18.4)	2 (6.3)	2 (33.3)	18 (15.8)
	Υψηλή	30 (39.5)	20 (62.5)	4 (66.7)	54 (47.4)
	Σύνολο	76 (100)	32 (100)	6 (100)	114(100)
TRAIL	Αρνητική	32 (42.1)	12 (37.5)	0 (0.0)	44 (38.6)
	Χαμηλή	22 (28.9)	8 (25)	6 (100)	36 (31.6)
	Υψηλή	22 (28.9)	12(37.5)	0 (0.0)	34 (29.8)
	Σύνολο	76 (100)	32 (100)	6 (100)	114 (100)
p53	Αρνητική	70 (92.1)	30 (93.8)	6 (100)	106 (93)
	Θετική	6 (7.9)	2 (6.3)	0 (0)	8 (7)
	Σύνολο	76 (100)	32 (100)	6 (100)	114 (100)
KRas	Αρνητική	40 (52.6)	16 (50)	4 (66.7)	60 (52.6)
	Θετική	36 (47.4)	16 (50)	2 (33.3)	54 (47.4)
	Σύνολο	76 (100)	32 (100)	6 (100)	114 (100)
c-Fos	Αρνητική	22 (28.9)	6 (18.8)	2 (33.3)	30 (26.3)
	Χαμηλή	22 (28.9)	6 (18.8)	0 (0.0)	28 (24.6)
	Υψηλή	32 (42.1)	20 (62.5)	4 (66.7)	56 (49.1)
	Σύνολο	76 (100)	32 (100)	6 (100)	114 (100)

Επεξηγήσεις: Οι μεταβλητές παρουσιάζονται ως n (%): αριθμός ασθενών (ποσοστό%), a: missing value (απούσα τιμή)

Συντομογραφίες: όπως στον **πίνακα 2.2**

2.5.3. Συσχέτιση των εκφράσεων RANKL, TRAIL, OPG, p53, KRas, c-Fos με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Στους **πίνακες 2.4, 2.5, 2.6** που ακολουθούν παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της συσχέτισης των εκφράσεων RANKL, TRAIL, OPG, p53, KRas, c-Fos με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

Κατά την ανάλυση της συσχέτισης της έκφρασης των μορίων RANKL, TRAIL, OPG με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στην ανοσοϊστοχημική έκφραση καθενός από τα μόρια RANKL, TRAIL, OPG και στην παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ($p=0.007$, $p=0.002$, $p<0.001$ αντίστοιχα) (**Πίνακες 2.4 και 2.5**).

Επιπλέον, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της OPG με την πολυεστιακή φύση του όγκου ($p=0.045$) (**Πίνακας 2.5**).

Η έκφραση των πρωτεϊνών p53, KRas, c-Fos δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κανένα από τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν (**Πίνακας 2.6**).

Πίνακας 2.4. Συσχέτιση των εκφράσεων RANKL και TRAIL με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Χαρακτηριστικά	Έκφραση RANKL				Έκφραση TRAIL			
	Αρνητική n (%)	Χαμηλή n (%)	Υψηλή n (%)	p value	Αρνητική n (%)	Χαμηλή n (%)	Υψηλή n (%)	p value
Ηλικία								
<45	20 (19.6)	28 (27.5)	24 (23.6)	0.241	24 (23.1)	30 (28.8)	18 (17.3)	0.118
>45	2 (2)	14(13.7)	14(13.7)		16 (15.4)	4(3.8)	12 (11.5)	
Φύλο								
Άρρεν	2 (1.8)	10 (9.1)	8 (7.3)	0.577	6 (5.4)	8 (7.1)	6 (5.4)	0.775
Θήλυ	22 (20)	34 (30.9)	34 (30.9)		38 (33.9)	28 (25)	26 (23.2)	
ΚΛΝΜ status								
Απουσία ΚΛΝΜ	22(19.6)	20 (17.9)	16 (14.3)	0.007	36 (31.6)	14 (12.3)	10 (8.8)	0.002
Παρουσία ΚΛΝΜ	2 (18)	26 (23.2)	26 (23.2)		8 (7%)	22 (19.3)	24 (21.1)	
Υπότυπος PTC								
c PTC	18 (16.1)	36 (32.1)	20 (17.9)	0.256	32 (28.1)	22 (19.3)	22 (19.3)	0.107
FVPTC	6(5.4)	8 (7.1)	18 (16.1)		12 (10.6)	8 (7)	12 (10.6)	
TCV PTC	0 (0)	2 (1.8)	4 (3.6)		0 (0)	6 (5.3)	0 (0)	
Πολλαπλές εστίες								
Όχι	18(16.4)	16 (14.5)	20 (18.2)	0.078	26 (23.2)	12 (10.7)	16 (14.3)	0.265
Ναι								
Διήθηση κάψας								
Όχι	8(7.1)	20 (17.9)	20 (17.9)	0.725	18 (15.8)	12 (10.5)	18 (15.8)	0.497
Ναι								
HT								
Όχι	8(7.1)	18 (16.1)	16 (14.3)	0.943	18 (15.8)	16 (14)	10 (8.8%)	0.633
Ναι								
Στάδιο T								
1a	6(5.4)	18 (16.1)	16 (14.3)	0.379	20 (17.5)	8 (7)	14 (12.3)	0.476
1b	10(8.9)	10 (8.9)	6 (5.4)		6 (5.3)	10 (8.8)	10 (8.8)	
2 3	0 (0)	0 (0)	4 (3.6)		2 (1.8)	0 (0)	2 (1.8)	
Στάδιο AJCC/TNM								
I	20(17.9)	42 (37.5)	34 (30.4)	0.681	36 (31.6)	36 (31.6)	26 (22.8)	0.183
II	0 (0)	0 (0)	2 (1.8)		0 (0)	0 (0)	2(1.8)	
III	4(3.6)	4 (3.6)	6 (5.4)		8 (7)	0 (0)	6(5.3)	

Επεξηγήσεις: Οι μεταβλητές παρουσιάζονται ως n(%): αριθμός ασθενών (ποσοστό%)
 Οι τιμές p που απεικονίζονται με έντονη γραφή δηλώνουν στατιστική σημαντικότητα
Συνομογραφίες: όπως στον **πίνακα 2.2.**

Πίνακας 2.5. Συσχέτιση της έκφρασης OPG με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Χαρακτηριστικά	Έκφραση OPG			
	Αρνητική n (%)	Χαμηλή n (%)	Υψηλή n (%)	p value
Ηλικία(έτη)				
<45	22 (21.2)	14 (13.5)	36 (34.6)	0.401
≥45	16 (15.4)	4 (3.8)	12 (11.5)	
Φύλο				
Άρρεν	2 (1.8)	4 (3.6)	14 (12.5)	0.133
Θήλυ	40 (35.7)	14 (12.5)	38 (33.9)	
ΚΛΝΜ Status				
Απουσία ΚΛΝΜ	36 (31.6)	2 (1.8)	22 (19.3)	<0.001
Παρουσία ΚΛΝΜ	6 (5.3)	16 (14)	32 (28.1)	
Υπότυπος PTC				
c PTC	32 (28.1)	14 (12.3)	30 (26.3)	0.338
FVPTC	10 (8.8)	2 (1.8)	20 (17.5)	
TCV PTC	0 (0)	2 (1.8)	4 (3.5)	
Πολλαπλές εστίες				
Όχι	26 (23.2)	12 (10.7)	16 (14.3)	0.045
Ναι	16 (14.3)	6 (5.4)	36 (32.1)	
Διήθηση κάψας				
Όχι	20 (17.5)	2 (1.8)	26 (22.8)	0.122
Ναι	22 (19.3)	16 (14)	28 (24.6)	
HT				
Όχι	14 (12.3)	10 (8.8)	20 (17.5)	0.505
Ναι	28 (24.6)	8 (7)	34 (29.8)	
Στάδιο T				
1a	16 (14)	4 (3.5)	22 (19.3)	0.723
1b	8 (7)	4 (3.5)	14 (12.3)	
2	2 (1.8)	2 (1.8)	0 (0)	
3	16 (14)	8 (7%)	18 (15.8)	
Στάδιο AJCC/TNM				
I	34 (29.8)	16 (14)	48 (42.1)	0.640
II	0 (0)	0 (0)	2 (1.8)	
III	8 (7)	2 (1.8)	4 (3.5)	

Επεξηγήσεις: όπως στον **πίνακα 2.4**

Συνομογραφίες: όπως στον **πίνακα 2.2**

Πίνακας 2.6. Συσχέτιση των εκφράσεων p53, KRas, c-Fos με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Χαρακτηριστικά	Έκφραση p53			Έκφραση KRas			Έκφραση c-Fos			
	Αρνητική n (%)	Θετική n (%)	p value	Αρνητική n (%)	Θετική n (%)	p value	Αρνητική n (%)	Χαμηλή n (%)	Υψηλή n (%)	p value
Ηλικία (έτη)										
<45	66(67.3)	6(5.8)	0.323	38(36.5)	34(32.7)	0.545	24(23.1)	16(15.4)	32(30.8)	0.115
≥45	32(30.8)	0		16(15.4)	16(15.4)		2(1.9)	10(9.6)	20(19.2)	
Φύλο										
Άρρεν	20(17.9)	0	0.44	10 (8.9)	10 (8.9)	0.803	4 (3.6)	6 (5.4)	10 (8.9)	0.844
Θήλυ	84 (75)	8(7.1)		50(44.6)	42(37.5)		26(23.2)	22(19.6)	44 (39.3)	
ΚΛΝΜ status										
Απουσία ΚΛΝΜ	54(47.4)	6(5.3)	0.347	32(28.1)	28(24.6)	0.561	12(10.5)	10(8.8)	38(33.3)	0.75
Παρουσία ΚΛΝΜ	52(45.6)	2(1.8)		28(24.6)	26(22.8)		18(15.8)	18(15.8)	18(15.8)	
Υπότυπος PTC										
c PTC	68(60.7)	6(5.4)	0.860	38(33.9)	36(32.1)	0.865	20(17.9)	22(19.6)	32(28.6)	0.604
FVPTC	30(26.8)	2(1.8)		16(14.3)	16(14.3)		6(5.4)	6(5.4)	20(17.9)	
TC PTC	6(5.4)	0		4(3.6)	2(1.8)		2(1.8)	0	4(3.6)	
Πολλαπλές εστίες										
Όχι	50(44.6)	4(3.6)	0.941	22(19.6)	32(28.6)	0.063	12(10.7)	12(10.7)	30(26.8)	0.563
Ναι	54(48.2)	4(3.6)		38(33.9)	20(17.9)		18(16.1)	16(14.3)	24(21.4)	
Διήθηση κάψας										
Όχι	42(36.8)	6(5.3)	0.167	24(21.1)	24(21.1)	0.734	10(8.8)	16(14)	22(19.3)	0.394
Ναι	64(56.1)	2(1.8)		36(31.6)	30(26.3)		20(17.5)	12(10.5)	34(29.8)	
HT										
Όχι	42(36.8)	2(1.8)	0.497	20(17.5)	24(21.1)	0.278	10(8.8)	12(10.5)	22(19.3)	0.866
Ναι	64(56.1)	6(5.3)		40(35.1)	30(26.3)		20(17.5)	16(14)	34(29.8)	
Στάδιο T										
1a	34(29.8)	8(7)	0.061	22(19.3)	20(17.5)	0.889	8(7)	10(8.8)	24(21.1)	0.743
1b	26(22.8)	0		16(14)	10(8.8)		6(5.3)	6(5.3)	14(12.3)	
2	4(3.5)	0		2(1.8)	2(1.8)		0	2(1.8)	2(1.8)	
3	42(36.8)	0		20(17.5)	22(19.3)		16(14)	10(8.8)	16(14)	
Στάδιο AJCC/TNM										
I	90(78.9)	8(7)	0.704	56(49.1)	42(36.8)	0.208	28(24.6)	24(21.1)	46(40.4)	0.33
II	2(1.8)	0		0	2(1.8)		0	2(1.8)	0	
III	14(12.3)	0		4(3.5)	10(8.8)		2(1.8)	2(1.8)	10(8.8)	

Επεξηγήσεις: όπως στον πίνακα 2.4

Συνομογραφίες: όπως στον πίνακα 2.2

2.5.4. Συσχέτιση των εκφράσεων RANKL, OPG, TRAIL με το status των λεμφαδενικών μεταστάσεων ανά ιστολογικό υπότυπο

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της συσχέτισης της έκφρασης των μορίων RANKL, OPG, TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ανά ιστολογικό υπότυπο απεικονίζονται στον **πίνακα 2.7**. Όσον αφορά τον κλασσικό θηλώδη τύπο, τόσο η έκφραση του RANKL όσο και η έκφραση της OPG συσχετίστηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p=0.027$, $p=0.006$, αντίστοιχα). Αντίθετα, στον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους καμία από αυτές τις δύο εκφράσεις δε συσχετίστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ($p=0.324$, $p=0.069$, αντίστοιχα).

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα παρατηρήθηκε τόσο στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο όσο και στον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους ($p=0.043$, $p=0.049$, αντίστοιχα).

Πίνακας 2.7. Συσχέτιση των εκφράσεων RANKL, OPG, TRAIL με το status ΚΛΝΜ ανά ιστολογικό υπότυπο PTC

Ανοσοϊστοχημική έκφραση		Υπότυπος PTC					
		c PTC			FVPTC		
		Απουσία ΚΛΝΜ n (%)	Παρουσία ΚΛΝΜ n (%)	p value	Απουσία ΚΛΝΜ n (%)	Παρουσία ΚΛΝΜ n (%)	p value
RANKL	Αρνητική	16 (21.6)	2 (2.7)	0.027	6 (18.8)	0 (0)	0.324
	Χαμηλή	16 (21.6)	20 (27)		4 (12.5)	4 (12.5)	
	Υψηλή	6 (8.1)	14 (18.9)		10 (31.3)	8 (25)	
	Σύνολο	38 (51.4)	36 (48.6)		20 (62.5)	12 (37.5)	
OPG	Αρνητική	26 (34.2)	6 (7.9)	0.006	10 (31.3)	0 (0.0)	0.069
	Χαμηλή	2 (2.6)	12 (15.8)		0 (0.0)	2 (6.3)	
	Υψηλή	12 (15.8)	18 (23.7)		10 (31.3)	10 (31.3)	
	Σύνολο	40 (52.6)	36 (47.4)		20 (62.5)	12 (37.5)	
TRAIL	Αρνητική	24 (31.6)	8 (10.5)	0.043	12 (37.5)	0 (0.0)	0.049
	Χαμηλή	10 (13.2)	12 (15.8)		4 (12.5)	4 (12.5)	
	Υψηλή	6 (7.9)	16 (21.1)		4 (12.5)	8 (25)	
	Σύνολο	40 (52.6)	36 (47.4)		20 (62.5)	12 (37.5)	

Επεξηγήσεις: όπως στον **πίνακα 2.4**

Συντομογραφίες: όπως στον **πίνακα 2.2**

2.5.5. Εφαρμογή μοντέλων λογαριθμικής παλινδρόμησης

Ο **πίνακας 2.8** παρουσιάζει τον σχετικό λόγο (ΣΛ) και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (ΔΕ) για τον σχετικό κίνδυνο παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα με βάση την έκφραση των μορίων p53, KRas, c-Fos, RANKL, TRAIL, OPG όπως προκύπτει από την εφαρμογή μοντέλων λογαριθμικής παλινδρόμησης. Τα μοντέλα που εφαρμόστηκαν είναι πολυπαραγοντικά και προσαρμοσμένα για τεκμηριωμένους παράγοντες δυσμενούς έκβασης της νόσου, και συγκεκριμένα για την ηλικία, το φύλο και το στάδιο T της νόσου το οποίο υπολογίζεται σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του TRAIL αυξάνει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τον κίνδυνο εκδήλωσης λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ($p=0.032$). Αντίθετα, η έκφραση των μορίων RANKL, OPG, p53, KRas και c-Fos δεν επηρεάζει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τον κίνδυνο εκδήλωσης λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ($p=0.102$, $p=0.972$, $p=0.736$, $p=0.243$ και $p=0.16$, αντίστοιχα).

Πίνακας 2.8. Σχετικός κίνδυνος παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα βάσει της έκφρασης των μορίων p53, KRas, c-Fos, RANKL, TRAIL, OPG

Μεταβλητές	Σημείο αναφοράς	ΣΛ	95%ΔΕ	p value
Ηλικία (έτη)	<45	0.109	0.008-1.411	0.09
Φύλο	Άρρεν	0.105	0.005-2.157	0.144
Στάδιο T	T1a	3.939	1.055-14.711	0.041
p 53	Αρνητική έκφραση	0.520	0.012-23.371	0.736
KRas	Αρνητική έκφραση	0.219	0.017-2.808	0.243
c-Fos	Αρνητική έκφραση	0.398	0.11-1.44	0.16
RANKL	Αρνητική έκφραση	3.58	0.778-16.48	0.102
TRAIL	Αρνητική έκφραση	10.335	1.23-86.87	0.032
OPG	Αρνητική έκφραση	1.028	0.218-4.836	0.972

Αποτελέσματα από μοντέλα λογαριθμικής παλινδρόμησης με προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο και το στάδιο T (7^η έκδοση AJCC/TNM)

Η τιμή p που απεικονίζεται με έντονη γραφή δηλώνει στατιστική σημαντικότητα

ΣΛ: σχετικός λόγος ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης

2.5.6. Συσχέτιση των ζευγών των συνεκφράσεων των μορίων με το status των λεμφαδενικών μεταστάσεων

Η διατύπωση της υπόθεσης ότι η συνομιλία μεταξύ των πυροδοτούμενων από τα υπό μελέτη μόρια οδών ενέχεται στην εξέλιξη του όγκου καθορίζοντας την επιθετική βιολογική συμπεριφορά αυτού μας ώθησε να μελετήσουμε τη συσχέτιση των ζευγών των συνεκφράσεων των εν λόγω μορίων με το λεμφαδενικό status. Όπως απεικονίζεται στον **πίνακα 2.9** παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των ακόλουθων ζευγών εκφράσεων των υπό μελέτη μορίων με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό διαμέρισμα: TRAIL–KRas ($p=0.011$), TRAIL–c-Fos ($p=0.006$), OPG–c-Fos ($p=0.024$), RANKL–TRAIL ($p<0.001$), RANKL–OPG ($p<0.001$), TRAIL–OPG ($p<0.001$).

Πίνακας 2.9. Συσχέτιση των ζευγών των συνεκφράσεων των μορίων με το status ΚΛΝΜ

Ζεύγη συνεκφράσεων	Παρουσία ΚΛΝΜ n (%)	Απουσία ΚΛΝΜ n (%)	p-value
KRAS– c-Fos	22 (19.3)	22 (19.3)	0.482
RANKL–KRas	26 (22.8)	18 (15.8)	0.129
TRAIL–KRas	26 (22.8)	10 (8.8)	0.011
OPG–KRas	26 (22.8)	10 (8.8)	0.11
RANKL–c-Fos	36 (32.1)	30 (26.8)	0.194
TRAIL–c-Fos	34 (29.8)	16 (14)	0.006
OPG–c-Fos	34 (29.8)	20 (17.5)	0.024
RANKL–TRAIL	46 (40.4)	20 (17.5)	<0.001
RANKL–OPG	46 (40.4)	22 (19.3)	<0.001
TRAIL–OPG	44 (38.6)	20 (17.5)	<0.001
KRAS–p53	2 (1.8)	4 (3.5)	0.540
c-Fos–p53	2 (1.8)	6 (5.3)	0.347
RANKL–p53	2 (1.8)	6 (5.3%)	0.347
TRAIL–p53	2 (1.8)	4 (3.5%)	0.54
OPG–p53	2 (1.8)	6 (5.3%)	0.347

Επεξηγήσεις: όπως στον **πίνακα 2.4**

Συντομογραφίες: όπως στον **πίνακα 2.2**

2.5.7. Συσχέτιση των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών με το λεμφαδενικό status

Με σκοπό τη διαλεύκανση του κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ των όγκων που μεθίστανται στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα, αναλύθηκε η συσχέτιση των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της διήθησης της κάψας και του σταδίου T3 των όγκων με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ($p=0.019$, $p=0.006$, αντίστοιχα). Οι δύο υποομάδες των ασθενών σύμφωνα με το status των λεμφαδενικών μεταστάσεων δε διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ως προς τα υπόλοιπα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν.

Πίνακας 2.10. Συσχέτιση των χαρακτηριστικών με το status ΚΛΝΜ

Χαρακτηριστικά	Παρουσία ΚΛΝΜ	Απουσία ΚΛΝΜ	p value
	n (%)	n (%)	
Ηλικία (έτη)			
Μέση τιμή(±SD)	36.42(14.66)	42.12 (12.25)	0.197
<45	21 (77.8)	15 (50)	0.071
≥45	5 (18.5)	11 (36.7)	
Φύλο			
Άρρεν	7 (25.9)	3 (10)	0.162
Θήλυ	19 (70.4)	27 (90)	
Υπότυπος PTC			
c PTC	17 (63)	20 (66.7)	0.137
FVPTC	6 (22.2)	10 (33.3)	
TC PTC	3 (11.1)	0(0)	
Πολλαπλές εστίες			
Ναι	13 (48.1)	16 (53.3)	0.803
Όχι	13 (48.1)	14 (46.7)	
Διήθηση κάψας			
Ναι	20 (74.1)	13 (43.3)	0.019
Όχι	7 (25.9)	17 (56.7)	
HT			
Yes	16 (59.3)	19 (63.3)	0.752
No	11 (40.7)	11 (36.7)	
Στάδιο T			
1a	4 (14.8)	17 (56.7)	0.006
1b	7 (25.9)	6 (20)	
2	2(7.4)	0 (0)	
3	14 (51.9)	7 (23.3)	
Στάδιο AJCC/TNM			
I	23 (85.2)	26 (86.7)	0.557
II	1 (3.7)	0	
III	3 (11.1)	4 (13.1)	

Επεξηγήσεις: όπως στον πίνακα 2.4

Συνομογραφίες: όπως στον πίνακα 2.2

2.6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καταιγισμός των ερευνητικών δεδομένων που αφορούν την πολυσχιδή φύση των εν δυνάμει μοριακών δεικτών RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas και c-Fos στον καρκίνο εξακολουθεί να εκπλήσσει τους ερευνητές μολονότι έχουν παρέλθει αρκετές δεκαετίες από την ανακάλυψη τους.

Το *continuum* σηματοδότησης που σκιαγραφείται από τα εν λόγω μόρια καθώς και από τη συνομιλία μεταξύ αυτών εκτείνεται από την κυτταρική μεμβράνη μέχρι τον πυρήνα, διέποντας όλες τις λειτουργίες των κυττάρων, φυσιολογικών και καρκινικών.

Οι κυτταροκίνες RANKL, TRAIL και OPG διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στο φλεγμονώδες *milieu* – ακρογωνιαίο λίθο του μικροπεριβάλλοντος του όγκου– ενορχηστρώνοντας την οστεοαναστολία, πεδίο συνυφασμένο με τη γένεση και εξέλιξη του καρκίνου. Ως “πρώτος αγγελιοφόρος” κατά τη μεταγωγή των πυροδοτούμενων από τα μόρια RANKL, TRAIL και OPG σημάτων δρουν οι ογκοπρωτεΐνες Ras. Η ολοκλήρωση των επαγόμενων μεταγραφικών προγραμμάτων πραγματοποιείται μέσω της υπερέκφρασης της ογκοπρωτεΐνης c-Fos. Άρρηκτα συνδεδεμένη με όλες τις διεργασίες της γένεσης και εξέλιξης του καρκίνου είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53.

Ωστόσο, ανεξερεύνητο παραμένει το *status* της έκφρασης των προαναφερθέντων μορίων στο *milieu* του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Μόνο δύο προγενέστερες μελέτες πραγματεύονται την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων RANKL, OPG και TRAIL στον καρκινικό θυρεοειδικό ιστό με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Υπό έρευνα βρίσκεται ο φαινότυπος του θηλώδους καρκινώματος που φέρει Ras μεταλλάξεις με στόχο τη μοριακή ταξινόμηση των όγκων. Δεδομένης της αιτιοπαθογενετικής συσχέτισης του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς με την ακτινοβολία, ιδιαίτερη θέση στη διερεύνηση του μοριακού προφίλ του όγκου αυτού κατέχει η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos που αποτελεί, μεταξύ άλλων, απόκριση στην ακτινοβολία. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα φέρνουν στο προσκήνιο του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς τον ρόλο των μεταλλάξεων ή/και της υπερέκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, ορόσημο της αποδιαφοροποίησης.

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε για πρώτη φορά την ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών RANKL, OPG, TRAIL, KRas, c-Fos και p53 στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς και εστιάστηκε στη συσχέτιση των υπό μελέτη μορίων με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων που θεωρούνται παράγοντες επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς. Επίκεντρο του ενδιαφέροντος αποτέλεσε η συσχέτιση των εκφράσεων καθώς και των συνεκφράσεων των μορίων αυτών με το λεμφαδενικό *status*. Τέλος, διερευνήθηκε το κλινικοπαθολογοανατομικό προφίλ του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς που μεθίσταται στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα.

Υπό το πρίσμα της σύγχρονης βιβλιογραφίας, η ερμηνεία των ευρημάτων μας επιχειρεί να φωτίσει ένα σχετικά άγνωστο μέχρι σήμερα πεδίο έρευνας διευρύνοντας τους ορίζοντες του μοριακού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς.

Το αίτιο της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς

Διττή είναι η σημασία της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της πρωτεΐνης p53: αντικατοπτρίζει είτε την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 είτε την υπερέκφραση και άθροιση στον πυρήνα πρωτεΐνης p53 με δομή φυσιολογική αλλά διαταραγμένη λειτουργία. Υπογραμμίζεται ότι η πρωτεΐνη p53 υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν ανιχνεύεται με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο λόγω του

σύντομου χρόνου ημίσειας ζωής της, που απορρέει από την αποδόμηση της μέσω εξειδικευμένων πρωτεϊνών, όπως είναι η MDM2⁴⁷¹.

Μία πιθανή ερμηνεία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p53 που διαπιστώθηκε στο 7% του θηλώδους καρκινώματος στην παρούσα μελέτη, και ειδικότερα στο 6% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου και στο 2% του θυλακιδώδους υπότυπου, είναι ότι αντανάκλα την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53. Στην περίπτωση αυτή, το εύρημα μας συνάδει με τα νεότερα ερευνητικά δεδομένα που φέρνουν στο προσκήνιο τον ρόλο των μεταλλάξεων TP53 στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς.

Πρόσφατα, η μελέτη των Nikiforova και συνεργατών ανέδειξε την παρουσία TP53 μεταλλάξεων στο 3.5% των ασθενών με θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς και στο 22% του ογκοκυτταρικού θυλακιδώδους καρκινώματος⁴⁶⁷. Ο “Ατλαντας του Γονιδιώματος του Καρκίνου” επιβεβαιώνει την παρουσία των μεταλλάξεων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, μεταξύ πλήθους γνωστών ογκοκατασταλτικών γονιδίων.⁷ Επιπλέον, οι Zhao και συνεργάτες διαπίστωσαν την αλληλεπίδραση του γονιδίου TP53 με γονίδια που υπερεκφράζονται στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς σε σχέση με τον φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό και με το γονίδιο S100A6, του οποίου η συμβολή στο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων είναι γνωστή⁴⁶⁹. Τον ρόλο των μεταλλάξεων TP53 στα πρώιμα στάδια του καρκίνου υπογραμμίζουν επίσης μελέτες στον καρκίνο του μαστού⁶⁹⁵, του στομάχου⁶⁹⁶ και του ήπατος⁶⁹⁷.

Τα δεδομένα αυτά ανοίγουν νέους ορίζοντες στην αναγνώριση του μοριακού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς, θέτοντας υπό αμφισβήτηση την εδραιωμένη αντίληψη ότι οι μεταλλάξεις TP53 αποτελούν αποκλειστικά “σήμα κατατεθέν” του αναπλαστικού καρκινώματος θυρεοειδούς⁶. Εδραιωμένος θεωρείται ο ρόλος των μεταλλάξεων αυτών στο *continuum* της αποδιαφοροποίησης των όγκων του θυρεοειδούς. Η συνεργιστική δράση των μεταλλάξεων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 με μεταλλάξεις σε γνωστά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια έχει θεωρηθεί εννοησυστημένη της εξέλιξης των όγκων⁴⁶⁰⁻⁴⁶⁴. Ωστόσο, η ανεύρεση των TP53 μεταλλάξεων στους διαφοροποιημένους όγκους θυρεοειδούς υποδεικνύει τον ρόλο τους στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης. Πράγματι, η σκιαγράφηση του γενετικού τοπίου του καρκίνου από τους Knijnenburg και συνεργάτες, ανέδειξε τη συμβολή των μεταλλάξεων του γονιδίου TP53 σε εννέα μονοπάτια σηματοδότησης άρρηκτα συνδεδεμένα με την απόκτηση τεσσάρων ιδιοτήτων—“σήμα κατατεθέν” των καρκινικών κυττάρων, εναρκτήριο βήμα της καρκινογένεσης⁴⁶⁸.

Μία εναλλακτική ερμηνεία των ευρημάτων μας είναι ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 αποτελεί φαινόμενο ανεξάρτητο από την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 και αντικατοπτρίζει την υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53, εύρημα που απαντάται στο 11–59% του διαφοροποιημένου καρκινώματος θυρεοειδούς⁴⁷¹. Εντούτοις, η σημασία της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p53 δεν είναι πλήρως κατανοητή⁴⁷¹. Ως μοριακό υπόβαθρο της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p53 θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα πολυσύνθετο σηματοδοτικό δίκτυο που οδηγεί στη λειτουργική αδρανοποίηση της⁴⁸⁸, όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος της παρούσας εργασίας. Η μη λειτουργική πρωτεΐνη p53 αδυνατεί να επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών MDM που είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση της, γεγονός που δυνητικά ερμηνεύει την άθροιση αυτής στον πυρήνα. Από την άλλη, αξιοσημείωτο είναι ότι μεταξύ των προτεινόμενων μηχανισμών αδρανοποίησης της πρωτεΐνης p53 συγκαταλέγεται η υπερέκφραση των MDM λόγω μείωσης της έκφρασης των πρωτεϊνών HUWE1⁴⁸⁸. Μολονότι οι υποθέσεις αυτές είναι ενδιαφέρουσες δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς.

Όσον αφορά την απουσία συσχέτισης της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της πρωτεΐνης p53 με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν επιθετική βιολογική συμπεριφορά του θηλώδους καρκίνου θυρεοειδούς, το εύρημα αυτό είναι δυσερμήνευτο. Εάν υποθεθεί ότι η

ανοσοϊστοχημική έκφραση της p53 αντιπροσωπεύει την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό TP53 ή τη λειτουργική αδρανοποίηση της πρωτεΐνης p53, το παραπάνω εύρημα είναι φαινομενικά παράδοξο. Η άρση της ογκοκατασταλτικής λειτουργίας της πρωτεΐνης p53 ως απόρροια των μεταλλάξεων ή της λειτουργικής αδρανοποίησης της ή/και οι νέες ογκογόνες ιδιότητες αυτής ως απόρροια των μεταλλάξεων αναμένεται να οδηγήσουν στη διαμόρφωση επιθετικού φαινότυπου του όγκου, υπόθεση που δεν επιβεβαιώνεται στη μελέτη μας. Μια πιθανή ερμηνεία του ευρήματος μας αντλείται από τη μελέτη των Marcello και συνεργατών⁶⁹⁸. Οι ερευνητές αυτοί έδειξαν ότι η διαταραγμένη έκφραση της πρωτεΐνης p53 στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα συντελεί στη διαμόρφωση ενός *milieu* ανοσολογικής επαγρύπνησης που αναχαιτίζει τον όγκο με πρωταγωνιστές τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (TAM: Tumor associated macrophages) και την έκφραση CD8+ T- λεμφοκυττάρων^{698,699}.

Συνολικά, διαφαίνεται ότι πολλά ερωτήματα αναφορικά με την ερμηνεία της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της πρωτεΐνης p53 στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς παραμένουν αναπάντητα, σηματοδοτώντας ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας.

Η ανεύρεση KRas μεταλλάξεων στο θηλώδες καρκίνωμα εκτείνεται πέραν του θυλακιδίου υπότυπου

Μολονότι στον καρκίνο θυρεοειδούς ανευρίσκονται μεταλλάξεις και των τριών ισομορφών των πρωτεϊνών Ras (NRas, KRas, HRas), ελάχιστα είναι τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την ανάλυση των μεταλλάξεων των επιμέρους ισομορφών. Το γεγονός αυτό επιβάλλει την ερμηνεία των ευρημάτων μας μέσα στο πλαίσιο των πληροφοριών που αφορούν όλο το φάσμα των Ras μεταλλάξεων.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της KRas πρωτεΐνης στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη θεωρείται ότι αντανάκλα την παρουσία μεταλλάξεων του KRas γονιδίου, δεδομένης της πρόσφατης διαπίστωσης ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της NRas πρωτεΐνης αποτελεί αξιόπιστο δείκτη του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς που φέρει NRas μεταλλάξεις⁷⁰⁰. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο ρόλος της KRas πρωτεΐνης στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς προσήλθε πρόσφατα στο προσκήνιο λόγω της διαπίστωσης της συσχέτισης των πολυμορφισμών του γονιδίου KRas με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης αυτού του τύπου καρκίνου⁷⁰¹.

Ως “σήμα κατατεθέν” των θυλακιδίων όγκων, οι Ras μεταλλάξεις παρατηρούνται στο 30–45% των θυλακιδίων καρκινωμάτων, στο 20–25% των θυλακιδίων αδενωμάτων και στο 30–45% του θυλακιδίου υπότυπου του θηλώδους καρκινώματος⁷⁰². Ενδιαφέρουσα είναι η υπόθεση των Howell και συνεργατών ότι η χαμηλή επίπτωση των μεταλλάξεων Ras στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, που κυμαίνεται από 0% έως 21%, προέρχεται από μελέτες οι οποίες δεν περιλαμβάνουν τον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους καρκινώματος²⁸⁷. Υπό το πρίσμα αυτό, η διαπίστωση στη μελέτη μας της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της KRas πρωτεΐνης και άρα της παρουσίας KRas μεταλλάξεων στο 50% του θυλακιδίου υπότυπου του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς επιβεβαιώνει τα σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το μοριακό προφίλ αυτού του ιστολογικού υπότυπου.

Ωστόσο, η μελέτη μας υποδεικνύει για πρώτη φορά την ανοσοϊστοχημική έκφραση της KRas πρωτεΐνης και άρα την παρουσία KRas μεταλλάξεων σε αξιοσημείωτο ποσοστό του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς (47.4%), η οποία εκτείνεται πέραν του θυλακιδίου υπότυπου αυτού και ανευρίσκεται στο 47.4% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου και στο 33.3% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Καινοτόμος είναι επίσης η διαπίστωση ότι στο σύνολο του θηλώδους που φέρει KRas μεταλλάξεις το κλασσικό θηλώδες καρκίνωμα αποτελεί την πλειοψηφία –το 66.67%– ενώ ο θυλακιδώδης

υπότυπος του θηλώδους αντιπροσωπεύει μόνο το 29.6%, ποσοστό εξαιρετικά μικρότερο από το αντίστοιχο – 96%– που περιγράφεται στη μελέτη των Kakarmath και συνεργατών⁷⁰³.

Εύλογα συμπεραίνεται ότι τα ευρήματα μας θέτουν υπό αμφισβήτηση την εδραιωμένη πεποίθηση ότι οι Ras μεταλλάξεις απαντώνται σπάνια στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς και χαρακτηρίζουν σχεδόν αποκλειστικά τον θυλακιδώδη υπότυπο αυτού.

Η απουσία συσχέτισης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της KRas πρωτεΐνης με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν επιθετική βιολογική συμπεριφορά στην παρούσα μελέτη αντιτίθεται στα αποτελέσματα πληθώρας μελετών που δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις Ras ενέχονται στην εκδήλωση του μεταστατικού φαινότυπου του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς⁷⁰⁴⁻⁷⁰⁷.

Διϊστάμενα είναι τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με την προγνωστική σημασία των Ras μεταλλάξεων στον καρκίνο θυρεοειδούς. Σε αντιπαράθεση προς την ήδη ανακοινωθείσα συσχέτιση των Ras μεταλλάξεων με αύξηση του κινδύνου θανάτου οφειλόμενου στη νόσο κατά 2.9 φορές σε σύγκριση με την απουσία αυτών⁷⁰⁸, η πρόσφατη μελέτη ορόσημο των Medici και συνεργατών έδειξε συσχέτιση των Ras μεταλλάξεων με ευνοϊκή πρόγνωση⁷⁰⁹. Διαφαίνεται ότι η επαγόμενη από τις Ras μεταλλάξεις σηματοδότηση είναι αμφίσημη. Οι Park και συνεργάτες διατύπωσαν την υπόθεση ότι η συμβολή των μεταλλάξεων Ras στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνων για τη διατήρηση του επιθηλιακού φαινότυπου των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε να θεωρηθεί ως το μοριακό υπόβαθρο της σχετιζόμενης με τις εν λόγω μεταλλάξεις ευνοϊκής πρόγνωσης. Επιχείρημα που συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης αυτής αποτελεί η διαπίστωση από τους ίδιους ερευνητές του ρόλου των μεταλλάξεων Ras ως θετικού ρυθμιστή της έκφρασης του γονιδίου Wnt4, του οποίου η καταστολή έχει σχετιστεί με ενίσχυση του διηθητικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων και συνεπώς με εξωθυρεοειδική επέκταση του όγκου⁷¹⁰. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις Ras αποδεικνύονται παράγοντας δυσμενούς έκβασης του καρκίνου του θυρεοειδούς όταν δρουν συνεργιστικά με συνυπάρχουσες γενετικές αλλαγές. Για παράδειγμα, πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια δείχνουν ότι ο επαγόμενος από τις KRas μεταλλάξεις νεοπλασματικός μετασχηματισμός των θυρεοειδικών επιθηλιακών κυττάρων *in vivo* προϋποθέτει την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της οδού PI3K/ERK⁷¹¹. Επιπλέον, σε ένα μοντέλο μελέτης του καρκίνου του προστάτη στα ποντίκια διαπιστώθηκε ότι η συνεργιστική δράση των μεταλλάξεων KRas, της σταθεροποίησης της β κατενίνης και της ενεργοποίησης της οδού PI3K/Akt μέσω απώλειας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN οδηγεί στην εκδήλωση επιθετικού φαινότυπου του όγκου⁷¹².

Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την αποκρυπτογράφηση της αιγιματικής φύσης των μεταλλάξεων Ras στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς με στόχο την αναγνώριση του διακριτού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς που φέρει Ras μεταλλάξεις. Ιδιαίτερο νόημα στη συνέχιση της έρευνας προσδίδει η προοπτική αναθεώρησης της ταξινόμησης των θηλωδών καρκινωμάτων θυρεοειδούς βάσει του μοριακού status⁷¹³.

Ογκοπρωτεΐνη c-Fos: ένα νέο μέλος του μοριακού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς;

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos σε αξιοσημείωτο ποσοστό (73.7%) του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς και ειδικότερα στο 71% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, στο 81.3% του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους και στο 66.7% του υπότυπου "υψηλών κυττάρων". Το εύρημα αυτό εμπλουτίζει τα δεδομένα που υποστηρίζουν τον ρόλο της ογκοπρωτεΐνης αυτής στον καρκίνο³⁶⁰⁻³⁷⁰. Επίσης, συνηγορεί υπέρ μελετών που καταδεικνύουν

την έκφραση της σε ευρύ φάσμα νεοπλασιών, όπως στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα³⁶⁸, στο νευροβλάστωμα, στο νευρίνωμα³⁶², στο μηνιγγίωμα³⁶², στο καρκίνωμα του παγκρέατος³⁶⁰ και του μαστού³⁶⁰ καθώς και στα κακοήθη νοσήματα του αιμοποιητικού συστήματος³⁶⁴.

Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι όχι μόνο ελάχιστα αλλά και αντικρουόμενα. Δύο προηγούμενες μελέτες έδειξαν υψηλά επίπεδα c-Fos mRNA στο διαφοροποιημένο καρκίνωμα θυρεοειδούς^{409,410}, ενώ οι Liu και συνεργάτες παρατήρησαν χαμηλά επίπεδα c-Fos mRNA στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς⁴¹¹. Το γεγονός ότι στις μελέτες αυτές δεν προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης c-Fos δυσχεραίνει τη σύγκριση με τα αποτελέσματά μας. Το εύρημα μας συνάδει με τη διαπίστωση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της c-Fos στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς στη μελέτη των Lee και συνεργατών⁷¹⁴. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι Liu και συνεργάτες πρότειναν τη θεώρηση του status της πρόσληψης ιωδίου ως καθοριστικό παράγοντα της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης c-Fos⁴¹¹, αν και η υπόθεση αυτή δεν έχει διαλευκανθεί.

Δεδομένου του εδραιωμένου ρόλου της c-Fos ως ογκοπρωτεΐνης, φαινομενικά παράδοξο εύρημα αποτελεί η διαπίστωση στην παρούσα μελέτη της απουσίας συσχέτισης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν επιθετικό φαινότυπο του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos ως απόκριση σε μιτογόνα ερεθίσματα οδηγεί στον σχηματισμό διμερών που συνιστούν τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1^{379,396}. Υπενθυμίζεται ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες AP-1 μετατρέπουν τα εξωκυττάρια ερεθίσματα σε μεταγραφικά προγράμματα, προάγοντας τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, την αναστολή της απόπτωσης, τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση, διεργασίες που ενορχηστρώνουν τη γένεση και εξέλιξη του καρκίνου³⁸⁰⁻³⁸¹.

Από την άλλη πλευρά, αντικρουόμενα είναι τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με την προγνωστική σημασία της έκφρασης της c-Fos: Αποτελεί παράγοντα δυσμενούς έκβασης στον καρκίνο του μαστού³⁹¹ και του πνεύμονα³⁹⁰ καθώς και στο οστεοσάρκωμα³⁹², ενώ έχει συσχετιστεί με ευοίωνη πρόγνωση στον καρκίνο του στομάχου³⁷⁰, στο προχωρημένο καρκίνωμα παχέος εντέρου³⁹⁴ και στο επιθηλιακό καρκίνωμα ωθηκών³⁹⁵. Η προαναφερθείσα ευοίωνη πρόγνωση ίσως αντανακλά τον ευοδωτικό στην απόπτωση ρόλο της c-Fos που απορρέει από την επαγωγή του FasL καθώς και της εξαρτώμενης αλλά και της ανεξάρτητης από την p53 απόπτωσης³⁷⁹. Αντίθετα, την αντιαποπτωτική δράση της c-Fos υποδεικνύουν ερευνητικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η μείωση της έκφρασης της προάγει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα τραχήλου μέσω αναστολής της οδού ERK1/2³⁷².

Από διαφορετική οπτική γωνία φωτίζει τον διττό ρόλο της ογκοπρωτεΐνης c-Fos η μελέτη των Mikula και συνεργατών στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η οποία έδειξε ότι η πρώιμη έκφραση της c-Fos ευοδώνει την εξέλιξη του όγκου, ενώ η συνεχής υπερέκφραση της δρα ογκοκατασταλτικά³⁶⁸. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η μελέτη μας υποδεικνύει την αναγκαιότητα συνέχισης της έρευνας με στόχο τη διαλεύκανση όχι μόνο της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης c-Fos στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αλλά και της αμφίσημης φύσης της.

Ο RANKL ευοδώνει το μεταστατικό δυναμικό του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε έκφραση του RANKL στο 78.6% του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς, και ειδικότερα στο 75.6% του κλασσικού θηλώδους, στο 81.3% του

θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους και στο 100% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Τα ευρήματα αυτά εναρμονίζονται με τα αποτελέσματα μελετών που υποστηρίζουν την έκφραση του RANKL σε ποικίλους τύπους καρκίνου με προεξάρχοντες τον καρκίνο του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης και του στομάχου⁵⁵⁰. Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, ελάχιστα είναι τα δεδομένα αναφορικά με την έκφραση του RANKL στον θυρεοειδικό καρκινικό ιστό. Μόνο δύο, μέχρι σήμερα, ανοσοϊστοχημικές μελέτες πραγματεύονται το θέμα αυτό με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Heymann και συνεργάτες κατέδειξαν την απουσία έκφρασης του RANKL στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς⁶⁷², σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μελέτης των Sood και συνεργατών⁶⁷¹.

Ισχυρό επιχείρημα υπέρ του *bona fide* ρόλου του RANKL στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αποτελεί η διαπίστωση ότι η επαγόμενη από τον TRAF6 ενεργοποίηση του NFκB, η προεξάρχουσα οδός μεταγωγής του σήματος του RANKL, συγκαταλέγεται μεταξύ των 87 οδών σηματοδότησης που αναδείχθηκαν ως σήμα κατατεθέν του θηλώδους στη μελέτη των Qiu και συνεργατών⁷¹⁵.

Η καινοτόμος σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του RANKL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό διαμέρισμα στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, και ειδικότερα στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο, που αναδύεται από τη μελέτη μας υποδεικνύει τη δυναμική συμβολή του RANKL στη γένεση μεταστάσεων. Το εύρημα αυτό συνάδει με τη συσχέτιση της έκφρασης του RANKL με την εκδήλωση επιθετικού φαινότυπου των όγκων, όπως έχει διαπιστωθεί στον καρκίνο του προστάτη⁷¹⁶ και του μαστού⁷¹⁶, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα⁷¹⁷ και στο οστεοσάρκωμα⁷¹⁸.

Όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος του παρόντος πονήματος, πληθώρα μελετών αναδεικνύουν τον ρόλο του RANKL ως χημειοκίνης που κατευθύνει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων αλλά και ως παράγοντα που καθιστά τη μεταστατική εστία “γόνιμο έδαφος” για την εξέλιξη του όγκου. Ένα πολύπλοκο δίκτυο ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης το οποίο πυροδοτείται από τον RANKL θεωρείται ως το μοριακό υπόβαθρο του μεταστατικού δυναμικού που εικάζεται ότι προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα ο RANKL. Η αλληλεπίδραση του RANKL με τον υποδοχέα του RANK έχει ως επακόλουθο τη στράτευση πρωτεϊνών, κυρίως του TRAF6, οδηγώντας στην ενεργοποίηση πολυάριθμων κινασών – Src/PLCγ, PI3K/Akt, mTOR, MAPK– οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν καίριους μεταγραφικούς παράγοντες (NFκB, NFATc1, CREBP, MITF, AP-1), επάγοντας ένα μεταγραφικό πρόγραμμα που ευοδώνει τη γένεση και εξέλιξη των όγκων. Πρόσφατες μελέτες στον καρκίνο του προστάτη υποστηρίζουν τη συμβολή της RANKL/RANK αλληλεπίδρασης στη γένεση μεταστάσεων μέσω υπερέκφρασης της MMP 1⁷¹⁵, ενεργοποίησης της IKKα⁵⁶⁵ και ευόδωσης της EMT⁵⁷⁵. Επίσης, η επαγόμενη από τον RANKL σηματοδότηση στον καρκίνο του πνεύμονα, οδηγεί στην υπερέκφραση του ICAM-1⁵⁶⁷, προάγοντας τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Στον καρκίνο του μαστού, η έκφραση του RANKL στα T ρυθμιστικά κύτταρα που διηθούν τον όγκο προτείνεται ως πιθανός συνδετικός κρίκος μεταξύ του φλεγμονώδους *milieu* και της δημιουργίας πνευμονικών μεταστάσεων⁷¹⁹. Η αλληλεπίδραση RANKL/RANK οδηγεί στην ενεργοποίηση της οδού Akt/β-catenin/Snail⁵⁶⁸, στην υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Slug και TCF8 καθώς και στην υπερέκφραση της N-cadherin,⁷²⁰ θεμελιωδών μηχανισμών της διηθητικής και μεταναστευτικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, συνιστώσα της επαγόμενης από τον RANKL ενίσχυσης του μεταστατικού δυναμικού είναι η ευόδωση της νεοαγγειογένεσης⁷²¹. Επίσης, νεότερα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση του RANKL με τον υποδοχέα LGR4, η οποία πιστεύεται ότι προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων⁵³⁸.

Δεδομένης της θεμελιώδους συμβολής της αλληλεπίδρασης RANKL/RANK στη γένεση των λεμφαδένων, όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τα ευρήματα μας ίσως υποδεικνύουν την εγγενή ικανότητα του RANKL να ενορχηστρώνει την μετανάστευση των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων προς τους λεμφαδένες. Υπέρ της υπόθεσης αυτής συνηγορούν τα

ευρήματα της μελέτης των Sood και συνεργατών οι οποίοι διαπίστωσαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων RANKL/RANK/OPG στις λεμφαδενικές μεταστάσεις του μυελοειδούς καρκινώματος θυρεοειδούς⁶⁷¹. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής καθώς και για την αποκρυπτογράφηση των υποκείμενων μηχανισμών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαλεύκανση του ενδεχόμενου η πρόσφατα περιγραφείσα συσχέτιση της απουσίας της έκφρασης της E-cadherin με επιθετική βιολογική συμπεριφορά του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς⁷²² να αντανακλά το μεταστατικό δυναμικό της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης, δεδομένης της επαγόμενης από τον RANKL μείωσης της έκφρασης της E-cadherin⁷²⁰.

Ωστόσο, η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του RANKL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αντιτίθεται στα αποτελέσματα μελετών που δείχνουν ότι τα χαμηλά επίπεδα της έκφρασης του RANKL και η απουσία της έκφρασης αυτού σχετίζονται με την εκδήλωση επιθετικού φαινότυπου του καρκίνου του μαστού^{723,578,579}. Επίσης, το προαναφερθέν εύρημα αντίκειται στο αποτέλεσμα της μελέτης των Park και συνεργατών που έδειξε συσχέτιση της έκφρασης του RANKL με χαμηλά επίπεδα Ki 67 στον καρκίνο του μαστού, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ευνοϊκή πρόγνωση της νόσου⁵⁹⁰. Επιπλέον, εκ διαμέτρου αντίθετη προς το εύρημα μας είναι η παρατήρηση των Owen και συνεργατών ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του RANKL σχετίζονται με υποτροπή της νόσου⁷²³. Εικάζεται ότι οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν έναν καινοτόμο αντινεοπλασματικό ρόλο του RANKL.

Δυσεπίλυτο, βάσει των μέχρι σήμερα βιβλιογραφικών δεδομένων, αίνιγμα παραμένει η αμφίσημη συμβολή του RANKL στον καρκίνο –ευοδωτική στον όγκο αλλά και ανασταλτική αυτού. Ενδέχεται να απορρέει από τις διακριτές λειτουργίες των ισομορφών του RANKL⁵⁷⁹, τη διττή επίδραση του RANKL στην ανοσολογική επαγρύπνηση έναντι του όγκου⁵⁸¹ και από την αντινεοπλασματική σηματοδότηση που επάγεται από την πρόσφατα ανακαλυφθείσα ισομορφή του RANK (RANK-c)⁵⁸⁰. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση των υποθετικών αυτών μηχανισμών.

Ο διττός ρόλος της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης δεν επιτρέπει, προς το παρόν, την εδραίωση του RANKL ως διαγνωστικού και προγνωστικού βιοδείκτη του καρκίνου. Υπό το πρίσμα της δυνατότητας της φαρμακευτικής αναστολής του RANKL μέσω του denosumab, θεωρείται αναγκαίος ο σχεδιασμός μελλοντικών μελετών με στόχο την αποσαφήνιση της αμφίσημης φύσης αυτού.

Το παράδοξο εύρημα της επαγόμενης από τον TRAIL ευόδωσης του μεταστατικού δυναμικού του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς

Αξιοσημείωτο εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η ανοσοϊστοχημική έκφραση του TRAIL στο 61.4% του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς, και συγκεκριμένα στο 57.8% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, στο 62.5% του θυλακιδώδους υπότυπου και στο 100% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Οι παρατηρήσεις αυτές θεωρούνται αναμενόμενες βάσει του τεκμηριωμένου ρόλου του TRAIL στον καρκίνο. Επίσης, υπογραμμίζουν τα αποτελέσματα της μελέτης των Sood και συνεργατών, των ερευνητών που ανέδειξαν πρώτοι την ανοσοϊστοχημική έκφραση του TRAIL στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς⁶⁷¹.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση στην παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά, της στατιστικά σημαντικής συσχέτισης της έκφρασης του TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό διαμέρισμα, η οποία αφορά τόσο τον κλασσικό θηλώδη υπότυπο όσο και τον θυλακιδώδη υπότυπο του θηλώδους καρκινώματος. Το εύρημα αυτό ενισχύεται από την ανάδειξη του TRAIL ως ανεξάρτητου παράγοντα εκδήλωσης λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό

τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα κατά την εφαρμογή μοντέλων λογαριθμικής παλινδρόμησης προσαρμοσμένων για παράγοντες που σχετίζονται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά, και συγκεκριμένα για την ηλικία, το φύλο και το στάδιο T της νόσου σύμφωνα με την 7^η έκδοση του συστήματος σταδιοποίησης AJCC/TNM.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας ενδέχεται να υποδηλώνουν ότι η επαγόμενη από τον TRAIL σηματοδότηση όχι μόνο δεν αναχαιτίζει την εξέλιξη του όγκου, όπως αναμένεται, αλλά επιπλέον την ευοδώνει, πιθανότατα μέσω πυροδότησης *bona fide* ογκογόνων οδών. Υπέρ της υπόθεσης αυτής συνηγορεί η ανευρεθείσα από τους Sood και συνεργάτες συσχέτιση της έκφρασης του TRAIL με τη λεμφαγγειακή διήθηση⁶⁷¹.

Η αναδυόμενη από την παρούσα μελέτη στατιστικά σημαντική συσχέτιση του μεταστατικού δυναμικού των όγκων με την έκφραση του TRAIL εγείρει προβληματισμό βάσει του εδραιωμένου ρόλου του TRAIL στην αναχαίτιση του όγκου μέσω της ενεργοποίησης της εξωγενούς οδού της απόπτωσης⁶³⁹. Επίσης, αντιτίθεται στα αποτελέσματα μελετών που δείχνουν ότι ο TRAIL ανακόπτει την εκδήλωση και την εξέλιξη του επιθετικού φαινότυπου του τραχηλικού καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων⁷²⁴ και του νεφρικού καρκινώματος⁷²⁵.

Η ερμηνεία των φαινομενικά παράδοξων ευρημάτων μας ενδέχεται να αντικατοπτρίζει την ιδιότητα –“σήμα κατατεθέν” των καρκινικών κυττάρων να διαφεύγουν από την διαμεσολαβούμενη από τον TRAIL ανοσολογική επιτήρηση του όγκου. Η έκβαση της πυροδοτούμενης από τον TRAIL αποπτωτικής σηματοδότησης παραμένει αδιευκρίνιστη. Μολονότι έχει διαπιστωθεί *in vitro* ευαισθησία των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση^{726,727}, προνόμιο επιβίωσης στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να προσδίδει η OPG, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί στα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος⁷²⁸ καθώς και στα καρκινικά κύτταρα μαστού⁷²⁹ και προστάτη⁷³⁰. Παραδόξως, οι Zinopoulos και συνεργάτες διαπίστωσαν την πραγμάτωση του αποπτωτικού σήματος που μεταβιβάζει ο TRAIL στα καρκινικά θυρεοειδικά κύτταρα παρά την έκφραση της OPG. Όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, οι ερευνητές αυτοί υπέθεσαν ότι οι σχετικές συγκεντρώσεις των μορίων OPG, RANKL, TRAIL διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκβαση της αλληλεπίδρασης αυτών⁵⁹⁸. Επιπλέον, οι Bad'huin και συνεργάτες έδειξαν ότι ο παράγοντας VIII- von Willebrand, γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος με πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία της πήξης του αίματος, συνδέεται με την OPG και ευοδώνει την απόπτωση, αίροντας την ανασταλτική δράση της OPG στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση⁷³¹. Από την άλλη πλευρά, πλήθος ερευνητικών δεδομένων καταδεικνύουν την πολυπλοκότητα της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση, στην οποία ενέχονται πολυσύνθετοι μηχανισμοί πέραν της αμφιλεγόμενης δράσης της OPG, όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος του παρόντος πονήματος⁶⁴⁵.

Εάν υποτεθεί ότι τα ευρήματα μας αντανακλούν την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση που επιτρέπει την περαιτέρω εξέλιξη τους, τότε η στατιστικά σημαντική συσχέτιση των λεμφαδενικών μεταστάσεων με την έκφραση TRAIL υποδηλώνει επιπλέον ότι η μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων υποκρύπτεται στην επαγόμενη από τον TRAIL σηματοδότηση. Μία πιθανή ερμηνεία των ευρημάτων μας είναι ότι τα ανθεκτικά στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση καρκινικά κύτταρα σφετερίζονται τους σηματοδοτικούς “καταρράκτες” που συνθέτουν τη μη κλασική οδό της επαγόμενης από τον TRAIL σηματοδότησης. Όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος του παρόντος πονήματος, πρωταγωνιστή της οδού αυτής αποτελεί το δευτερογενές σύμπλεγμα, το οποίο σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της σύνδεσης του TRAIL με τους υποδοχείς του TRAILR1 και TRAILR2 και απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες NEMO, FADD, TRAF-2, κασπάση 8 και Rip-1. Ακολουθεί η ενεργοποίηση καίριων κινασών –JNK, p38, ERK, TAK1, PKC, PI3K/Akt, Src– η οποία δίνει το

έναυσμα για την επαγωγή πληθώρας γονιδίων με αμφίσημο ρόλο: την ευόδωση αλλά και την αναχαίτιση του όγκου⁶⁴⁴.

Τα ευρήματα μας ενδέχεται να αντανakλούν το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα *per se* μέσω μηχανισμών άγνωστων προς το παρόν στρέφουν τη μη κλασσική οδό σηματοδότησης προς την προαγωγή της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης τους, με επακόλουθο την εξέλιξη του όγκου και τη γένεση μεταστάσεων.

Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση καθώς και των μηχανισμών που στρέφουν τη σηματοδότηση προς τη μη κλασσική οδό ως στρατηγική επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς. Απώτερος στόχος είναι η διαλεύκανση των παραγόντων που καθορίζουν την έκβαση της πυροδοτούμενης από τον TRAIL σηματοδότησης.

Η OPG ευοδώνει το μεταστατικό δυναμικό του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς

Η ερμηνεία της έκφρασης του RANKL και του TRAIL στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς επιβάλλει, ως *conditio sine qua non*, τη μελέτη της έκφρασης του ψευδούς υποδοχέα τους, της OPG. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων RANKL, TRAIL και OPG περιπλέκεται από το γεγονός ότι ο ρόλος της OPG είναι πολύπλευρος και εκτείνεται πέραν της αναστολής των επαγόμενων από τον RANKL και τον TRAIL σηματοδοτήσεων.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε την έκφραση της OPG στο 63.2% του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς και ειδικότερα στο 57.9% του κλασσικού θηλώδους υπότυπου, στο 68.8% του θυλακιδώδους υπότυπου του θηλώδους και στο 100% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Τα ευρήματα αυτά εναρμονίζονται με την τεκμηριωμένη έκφραση της OPG σε πληθώρα νεοπλασιών, όπως στον καρκίνο του προστάτη⁵⁹², του μαστού⁵⁹¹, του στομάχου⁵⁹³, του παγκρέατος⁵⁸⁹, του παχέος εντέρου⁵⁸⁸ και στο μελάνωμα.⁵⁹⁰ Όσον αφορά το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, οι Sood και συνεργάτες διαπίστωσαν την παρουσία της έκφρασης της OPG⁶⁷¹, εύρημα που συνάδει με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, ενώ οι Heymann και συνεργάτες παρατήρησαν απουσία έκφρασης της OPG⁶⁷².

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της OPG με τη μεταστατική διήθηση του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, και ειδικότερα στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο, υποδεικνύοντας ότι η επαγόμενη από την OPG σηματοδότηση προάγει τη γένεση μεταστάσεων. Το εύρημα αυτό ενδέχεται να αντανakλά τον ευοδωτικό στον όγκο ρόλο της παραγόμενης από τα καρκινικά κύτταρα OPG, που ανακύπτει από πλήθος μελετών. Δύο συνιστώσες συνθέτουν τον ρόλο αυτό: η παρακρινής που συντελεί στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων και η αυτοκρινής που προσδίδει προνόμιο επιβίωσης και εξέλιξης στα καρκινικά κύτταρα. Υπέρ του ρόλου αυτού συνηγορεί η άμεση συμβολή της OPG σε όλες τις κυτταρικές διεργασίες που αποτελούν ορόσημο της γένεσης και εξέλιξης των όγκων, όπως η ανευπλοειδία, η νεοαγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διηθητική ικανότητα και το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων^{582,596,609,610}.

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της OPG με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό διαμέρισμα ενδέχεται να αντικατοπτρίζει ένα πολυσύνθετο δίκτυο σηματοδοτικών οδών ευοδωτικών στον όγκο. Το έναυσμα των οδών αυτών δίνεται από τη σύνδεση της OPG σε πληθώρα πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, όπως οι ιντεγκρίνες, η νουκλεολίνη και οι πρωτεογλυκάνες που περιέχουν θειϊκή ηπαρίνη. Για παράδειγμα, περιγράφηκε πρόσφατα ο ρόλος της ιντεγκρίνης ανβ6 στην προαγωγή του πολλαπλασιασμού των θυρεοειδικών

καρκινικών κυττάρων⁷³². Τον άμεσο ρόλο της OPG στη γένεση και εξέλιξη των όγκων τεκμηρίωσε πρόσφατη μελέτη φασματοσκοπησης μαζών σε καρκινικά και φλεγμονώδη κύτταρα μαστού, όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος του παρόντος πονήματος. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε μυριάδες πρωτεΐνες που συνδέονται στην OPG, πιθανότατα στη δεσμεύουσα την ηπαρίνη περιοχή και ενεργοποιούν σηματοδοτικές οδούς που ενέχονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, της μετάφρασης, της διαφοροποίησης, της οργάνωσης του κυτταρικού σκελετού, της επιδιόρθωσης του DNA και του πολλαπλασιασμού⁵⁸².

Επιπλέον, η σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της OPG με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς θεωρείται αναμενόμενο εύρημα βάσει του έμμεσου ρόλου της OPG στη γένεση και εξέλιξη των όγκων. Ο ρόλος αυτός απορρέει από την αναστολή των ογκοκατασταλτικών εκφάνσεων των επαγόμενων από τα μόρια RANKL και TRAIL σηματοδοτήσεων, συγκεκριμένα της επαγόμενης από τον RANKL ανοσολογικής επιτήρησης του όγκου και της πυροδοτούμενης από τον TRAIL απόπτωσης των κυττάρων.

Υπό το πρίσμα αυτό, η διαπίστωση μας ενδυναμώνει τα αποτελέσματα μελετών που δείχνουν τη συσχέτιση της έκφρασης της OPG με επιθετική βιολογική συμπεριφορά πληθώρας καρκίνων, όπως του καρκίνου του μαστού⁵⁹¹, του προστάτη⁵⁹², του στομάχου⁵⁹³, του παχέος εντέρου⁵⁸⁸ και του παγκρέατος⁵⁸⁹.

Εκ διαμέτρου αντίθετα είναι τα αποτελέσματα της μελέτης των Park και συνεργατών που αναδεικνύουν τη συσχέτιση της OPG με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του καρκίνου του μαστού που υποδηλώνουν ευνοϊκή πρόγνωση, όπως το μικρό μέγεθος του όγκου, η απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και τα χαμηλά επίπεδα Ki67⁵⁹¹. Παρομοίως, η πρόσφατη διαπίστωση αντίστροφης σχέσης ανάμεσα στην έκφραση της OPG και στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού υποδεικνύει τον δυνητικό ρόλο της OPG στην αναχαίτιση του όγκου⁵⁹⁴.

Η πιθανότερη ερμηνεία των αντιφατικών ευρημάτων πηγάζει από την αινιγματική φύση της OPG. Η πυροδοτούμενη από την OPG σηματοδότηση καθίσταται αμφίσημη, αντικατοπτρίζοντας την αναστολή των επίσης αμφίσημων σηματοδοτήσεων που επάγονται από τον RANKL και τον TRAIL. Η επαγόμενη από την OPG σηματοδότηση ενέχεται στην αναχαίτιση των όγκων μέσω αναστολής των επαγόμενων από τον RANKL ευοδωτικών στον όγκο διεργασιών, όπως είναι η οστεόλυση, η νεοαγγειογένεση, η δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού *milieu* και το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, καθώς και μέσω αναστολής της ευοδωτικής στον όγκο έκφρασης της μη κλασσικής οδού σηματοδότησης του TRAIL.

Υπό το φως των διπτών σηματοδοτήσεων μέσω των οποίων η OPG καθορίζει την τύχη των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων, απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να διαλευκανθεί η προγνωστική αξία της έκφρασης της OPG και η εφαρμογή της στη Θεραπευτική.

Η “συνομιλία” μεταξύ των μορίων RANKL, OPG, TRAIL, c-Fos ευοδώνει τη γένεση μεταστάσεων στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η καινοτόμος στατιστικά σημαντική συσχέτιση έξι ζευγών συνεκφράσεων των υπό μελέτη μορίων – KRas–TRAIL, c-Fos–OPG, c-Fos–TRAIL, RANKL–TRAIL, TRAIL–OPG και RANKL–OPG – με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό διαμέρισμα.

Όπως αναλύθηκε εκτενώς στο γενικό μέρος του παρόντος πονήματος, οι σηματοδοτικές οδοί που πυροδοτούνται από την αλληλεπίδραση του RANKL, της OPG και του TRAIL με τους λειτουργικούς υποδοχείς τους καθώς και από την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση των μεταλλαγμένων KRas πρωτεϊνών

συγκλίνουν στους “καταρράκτες” κινασών MAPK και PI3K/Akt. Το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση ποικίλων πρωτεϊνών υπεύθυνων για τη μεταγωγή του σήματος των μορίων RANKL, OPG, TRAIL και KRas, οι οποίες ενεργοποιούν πληθώρα σηματοδοτικών μορίων που με τη σειρά τους συγκλίνουν στην υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos. Η ογκοπρωτεΐνη c-Fos ετεροδιμερίζεται με πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας Jun και δίνει γένεση στον μεταγραφικό παράγοντα AP-1, ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων που ενέχονται στην πραγμάτωση αλλά και στην ενίσχυση του ογκογόνου και μεταστατικού δυναμικού των υπό μελέτη μορίων. Το *continuum* σηματοδότησης που σκιαγραφείται^{550,582,644} υποδεικνύει τη συνεργιστική δράση των μορίων RANKL, TRAIL, OPG, KRas, c-Fos, η οποία ενδέχεται να ερμηνεύει τη στατιστικά σημαντική συσχέτιση των συνεκφράσεων τους με τη μεταστατική διήθηση του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος.

Από διαφορετική οπτική γωνία φωτίζει τη συνεργιστική δράση μεταξύ των μεταλλαγμένων KRas πρωτεϊνών και του TRAIL η μελέτη των Hoogwater και συνεργατών στον καρκίνο παχέος εντέρου, αναδεικνύοντας την ικανότητα της δαμεσολαβούμενης από την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών KRas σηματοδότησης να μετατρέπει το αποπτωτικό σήμα των υποδοχέων του TRAIL σε σήμα ευοδωτικό στη διήθηση⁷³³. Απαιτείται περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού αυτού στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, ώστε να διαλευκανθεί η δυναμική συμβολή του στο μοριακό υπόβαθρο της στατιστικά σημαντικής συσχέτισης της συνέκφρασης KRas–TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα.

Ένας μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης που συνδέει την OPG με την πρωτεΐνη c-Fos απορρέει από την επαγόμενη από την OPG έκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos, η οποία με τη σειρά της ενισχύει την έκφραση της OPG, όπως διαπιστώθηκε στα παγκρεατικά β κύτταρα ενός πειραματικού μοντέλου ποντικού⁷³⁴. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για να διαλευκανθεί εάν ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται και στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, γεγονός που θα συνηγορούσε υπέρ του μεταστατικού δυναμικού που φαίνεται να προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα η συνέκφραση OPG-c-Fos στη μελέτη μας.

Προβληματισμό εγείρει η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της συνέκφρασης OPG-RANKL με τη λεμφαδενική συμμετοχή, καθώς αντίκειται στην υπόθεση ότι η OPG αναχαιτίζει την πυροδοτούμενη από τον RANKL ενίσχυση του μεταστατικού δυναμικού. Η λύση του γρίφου αυτού πιθανότατα βρίσκεται στην υπεροχή του εγγενούς μεταστατικού δυναμικού της επαγόμενης από την OPG σηματοδότησης ή/και στην αναχαιτίση της επαγόμενης από τον RANKL ανοσολογικής επιτηρήσης του όγκου. Δεδομένης της ακαθόριστης κλινικής έκβασης των αμφίσημων επαγόμενων από την OPG και τον RANKL σηματοδοτήσεων απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αποδειχθεί η προαναφερθείσα υπόθεση.

Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της συνέκφρασης OPG-TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ίσως αντανακλά το προνόμιο επιβίωσης που προσδίδει η OPG στα θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα μέσω αναστολής της επαγόμενης από τον TRAIL απόπτωσης. Εντούτοις, αυτό το ενδεχόμενο δεν επιβεβαιώνεται, προς το παρόν, από κλινικές μελέτες. Επίσης, το εύρημα αυτό είναι πιθανό να αντικατοπτρίζει τη συνεργιστική δράση της ευοδωτικής στην εξέλιξη του όγκου σηματοδότησης που επάγεται από την OPG με την αντίστοιχη που επάγεται από τον TRAIL σε καρκινικά κύτταρα που ανθίστανται στην επαγόμενη από τον TRAIL απόπτωση.

Οι προαναφερθείσες υποθέσεις σηματοδοτούν ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Δεδομένου ότι η συγγένεια σύνδεσης της OPG με τον RANKL είναι ίση με την αντίστοιχη της σύνδεσης της με τον TRAIL, καθίσταται αναγκαίος ο σχεδιασμός μελλοντικών μελετών με στόχο τον προσδιορισμό των σχετικών συγκεντρώσεων των μορίων OPG, RANKL και TRAIL στο μικροπεριβάλλον του όγκου, που εικάζεται ότι αποτελούν καθοριστικό παράγοντα της έκβασης της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.

Υπό το πρίσμα της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ των μορίων OPG, RANKL, TRAIL, εύλογη είναι η διατύπωση της υπόθεσης ότι τα καρκινικά κύτταρα διαμορφώνουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου, μέσω μηχανισμών άγνωστων προς το παρόν, ένα *milieu* που ευοδώνει την εξέλιξη τους. Για παράδειγμα, μία υπόθεση που δυνητικά ερμηνεύει τα ευρήματά μας είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα επάγουν την έκφραση του TRAIL στα κύτταρα του ανοσοποιητικού που διηθούν τον όγκο, σε επίπεδα που υπερβαίνουν τα επίπεδα της OPG και/ή του RANKL, με αποτέλεσμα ο TRAIL να δεσμεύει την OPG και να παρεμποδίζει την αναχαίτιση από αυτήν του μεταστατικού δυναμικού του RANKL. Επομένως, το μεταστατικό δυναμικό της επαγόμενης από τον RANKL σηματοδότησης δρα συνεργιστικά με το εγγενές ογκογόνο δυναμικό της μη κλασσικής οδού του TRAIL και μέσω υπερέκφρασης της ογκοπρωτεΐνης c-Fos ευοδώνει την εξέλιξη του όγκου και άρα και τη γένεση λεμφαδενικών μεταστάσεων. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η συσχέτιση της έκφρασης της OPG με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις ίσως αντανάκλα τον ευοδωτικό στον όγκο ρόλο αυτής ή έναν αντιρροπιστικό μηχανισμό που επιχειρεί να αναχαίτισει την εξέλιξη του όγκου. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, η οποία προϋποθέτει ότι τόσο οι πυροδοτούμενες από τον TRAIL και από τον RANKL σηματοδοτικές οδοί όσο και τα επαγόμενα από τον c-Fos μεταγραφικά προγράμματα στρέφονται προς την ευόδωση της εξέλιξης του όγκου.

Η OPG ως δυνητικός δείκτης της πολυεστιακής φύσης του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς

Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πολυεστιακής φύσης του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς με την έκφραση της OPG που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας αντικατοπτρίζει τον ευοδωτικό στη γένεση και εξέλιξη των όγκων ρόλο της OPG, δεδομένου ότι οι πολλαπλές εστίες αντανάκλουν είτε ανεξάρτητους όγκους προερχόμενους από διακριτά προγονικά κύτταρα είτε την ενδοθυρεοειδική διασπορά του αρχικού όγκου.

Η ερμηνεία του ευρήματός μας δυσχεραίνεται από την ασάφεια που διέπει την προγνωστική σημασία της πολυεστιακής φύσης του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς, χαρακτηριστικού που απαντάται στο 18-87% των όγκων. Μολονότι η σημασία της πολυεστιακής φύσης ως προγνωστικού δείκτη δεν επιβεβαιώνεται στο σύνολο των μελετών, υποκλινική λεμφαδενική συμμετοχή του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος απαντάται συχνότερα σε όγκους με πολλαπλές εστίες και άθροισμα των μεγεθών των μεγαλύτερων εστιών μεγαλύτερο από 1 εκ. ή παρουσία μεγάλου αριθμού εστιών. Η προαναφερθείσα διαπίστωση αποτελεί το έρεισμα της σύστασης διενέργειας προληπτικού λεμφαδενικού καθαρισμού στην υποομάδα αυτή των ασθενών με στόχο τη μείωση του κινδύνου υποτροπής της νόσου⁷³⁵. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, ο δυνητικός ρόλος της OPG ως δείκτη της παρουσίας πολλαπλών εστιών του όγκου ενδέχεται να αποδειχθεί πολύτιμη γνώση που θα κατευθύνει τη χειρουργική στρατηγική προς την προληπτική λεμφαδενική αφαίρεση. Εντούτοις, περισσότερες μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής.

Η προγνωστική σημασία της διήθησης της κάψας και της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης αναφορικά με το λεμφαδενικό status στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς

Όσον αφορά το κλινικοπαθολογοανατομικό προφίλ του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς που μεθίσταται στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα, η παρούσα μελέτη ανέδειξε δύο

χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων: τη μικροσκοπική διήθηση της κάψας και το στάδιο T3.

Σύμφωνα με την 7^η έκδοση του συστήματος ταξινόμησης AJCC/TNM που εφαρμόστηκε στη μελέτη μας, το στάδιο T3 περιλαμβάνει όγκους μεγέθους μεγαλύτερου από 4 εκ. που περιορίζονται στον θυρεοειδή ή όγκους οποιουδήποτε μεγέθους με ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση. Δεδομένου ότι στη μελέτη μας δεν συμπεριλαμβάνονται όγκοι μεγέθους μεγαλύτερου από 4 εκ., το στάδιο T3 αντιπροσωπεύει την παρουσία της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης, δηλαδή της διήθησης του σπληνικού μύος και των περιθυρεοειδικών μαλακών ιστών.

Η ερμηνεία των ευρημάτων μας δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι η προγνωστική σημασία τόσο της διήθησης της κάψας όσο και της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης αποτελεί αντικείμενο διχογνωμιών. Απουσία συσχέτισης της διήθησης της κάψας με υποτροπή της νόσου διαπιστώθηκε στη μελέτη των Furlan και συνεργατών⁷³⁶ σε αντίθεση με τη μελέτη των Spinelli και συνεργατών⁷³⁷. Όσον αφορά την ανεύρεση ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης κατά την παθολογοανατομική εξέταση σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 45 ετών, το εύρημα αυτό κατατάσσει τη νόσο στο στάδιο III σύμφωνα με την εφαρμογή της 7^{ης} έκδοσης του συστήματος ταξινόμησης AJCC/TNM. Ωστόσο, πολυάριθμες μελέτες καταδεικνύουν την απουσία συμβολής του χαρακτηριστικού αυτού στην έκβαση της νόσου⁷³⁸⁻⁷⁴¹. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το έρεισμα της υποβάθμισης της προγνωστικής αξίας της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης όπως αποτυπώνεται στην 8^η έκδοση του συστήματος ταξινόμησης AJCC/TNM. Σύμφωνα με την έκδοση αυτή, η ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση δεν περιλαμβάνεται στα κριτήρια ταξινόμησης της νόσου. Ωστόσο, οι νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες της ATA (2015) επισημαίνουν τη συσχέτιση της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης με ενδιάμεσο κίνδυνο υποτροπής της νόσου⁹.

Η συσχέτιση της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα που αναδύεται από τη μελέτη μας συνάδει με τη μετα-ανάλυση των Sun και συνεργατών που ανέδειξε την ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση ως παράγοντα κινδύνου εκδήλωσης λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα⁷⁴². Επιπλέον, η μετα-ανάλυση των Yin και συνεργατών έδειξε ότι η ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση αποτελεί στατιστικά σημαντικό παράγοντα κινδύνου υποτροπής της νόσου, αν και οι ερευνητές υπογράμμισαν ότι απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την εδραίωση του στην κλινική πράξη⁷⁴³.

Δεδομένου ότι το σύστημα σταδιοποίησης AJCC/TNM προβλέπει την επιβίωση των ασθενών, παράμετρο που δεν μελετήθηκε στη παρούσα μελέτη, τα ευρήματά μας δεν είναι δυνατό να σχολιαστούν υπό το πρίσμα της 8^{ης} έκδοσης AJCC/TNM.

Τα προαναφερθέντα δεδομένα υποδεικνύουν την αναγκαιότητα συνέχισης της έρευνας με αντικείμενο τη συσχέτιση της διήθησης της κάψας και της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα.

Τα υπό μελέτη μόρια αδυνατούν να λύσουν τον γρίφο της συσχέτισης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στο γεγονός ότι η παρούσα μελέτη αδυνατεί να αναδείξει τα μόρια RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas και c-Fos ως δείκτες της συνύπαρξης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς. Το εύρημα αυτό προκαλεί εντύπωση καθώς πρόκειται για μόρια που εννορηστώνουν τόσο το φλεγμονώδες όσο και το ανοσολογικό *milieu* του μικροπεριβάλλοντος του

όγκου, δύο θεμελιώδεις συνιστώσες του δυνητικού μοριακού υπόβαθρου της συσχέτισης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές αντιμετωπίζουν με σκεπτικισμό τη συσχέτιση *per se*, υποστηρίζοντας ότι δεν είναι αληθής αλλά επιφαινόμενο των αποτελεσμάτων μελετών που διενεργήθηκαν σε θυρεοειδικούς ιστούς προερχόμενους από θυρεοειδεκτομή, όπου *a priori* ανευρίσκεται συχνότερα καρκίνος θυρεοειδούς σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της FNAB.

Υπό το πρίσμα αυτό, η παρατήρηση μας υποδεικνύει την αναγκαιότητα περαιτέρω διερεύνησης της συνύπαρξης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, ένα θέμα εξαιρετικά περίπλοκο όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος του παρόντος πονήματος. Δεδομένου ότι η αποκρυπτογράφηση του μοριακού υπόβαθρου της συσχέτισης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς ενδέχεται να αποτελέσει τον “Μίτο της Αριάδνης” στο μυστήριο της γένεσης και εξέλιξης του καρκίνου του θυρεοειδούς, η διερεύνηση των εν λόγω μορίων μέσα σε αυτό το πλαίσιο αποκτά ιδιαίτερη αξία.

Αποτίμηση της μελέτης

Ορισμένα μειονεκτήματα της παρούσας μελέτης πρέπει να αναφερθούν. Η μελέτη μας συμπεριέλαβε σχετικά μικρό αριθμό ασθενών και περιορίστηκε στους τρεις συχνότερους υπότυπους του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς: τον κλασσικό θηλώδη υπότυπο, τον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους και τον υπότυπο “υψηλών κυττάρων”. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει τη γενίκευση των συμπερασμάτων μας σε όλο το φάσμα του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Επίσης, τεχνικά ζητήματα εγγενή στην ανοσοϊστοχημική μέθοδο ενδέχεται να αποκλείουν την ανάδειξη ορισμένων συσχετίσεων. Ένα επιπλέον μειονέκτημα της μελέτης μας είναι το γεγονός ότι δεν διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος που ενδεχομένως θα ενδυνάμωνε τα αποτελέσματά μας.

Ωστόσο, το εγχείρημα της παρούσας μελέτης είναι η ταυτόχρονη διερεύνηση έξι εν δυνάμει μοριακών δεικτών στο θηλώδες καρκίνωμα, τεσσάρων ανεξερεύνητων (OPG, RANKL, TRAIL, c-Fos) και δύο των οποίων η σημασία αποτελεί δυσεπίλυτο γρίφο παρά την πληθώρα των ερευνητικών δεδομένων (p53, KRas). Τα καινοτόμα ευρήματά μας οδηγούν στη διατύπωση νέων επιστημονικών υποθέσεων που υποδεικνύουν την αναγκαιότητα σχεδιασμού περαιτέρω μελετών με σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου των εν λόγω μορίων στη γένεση και εξέλιξη του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Απαραίτητη κρίνεται η συνέχιση της έρευνας που πραγματεύεται τη συμβολή των υπό μελέτη μορίων στο μοριακό προφίλ των όγκων με μεταστατικό δυναμικό. Δεδομένου του ρόλου των λεμφαδενικών μεταστάσεων ως πρωταρχικής θέσης υποτροπής της νόσου, απώτερο στόχο συνιστά η εδραίωση αξιόπιστων μοριακών δεικτών ικανών να κατευθύνουν την εξατομίκευση της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης, επιλύοντας τη διχογνωμία που αναλύθηκε εκτενώς στο γενικό μέρος του παρόντος πονήματος.

2.7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εξελισσόμενη έρευνα στο πεδίο αποκρυπτογράφησης της συμβολής των μορίων RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas, c-Fos στο μοριακό προφίλ του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς φωτίζει αινιγματικές πτυχές των εν λόγω μορίων αλλά ταυτόχρονα γεννά νέα ερωτήματα που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Τα συμπεράσματα της μελέτης μας συνοψίζονται ως εξής:

1. Η διαπίστωση της έκφρασης των μορίων RANKL και TRAIL –κυτταροκινών-μελών της οικογένειας TNF– και της OPG –μέλους της οικογένειας TNFR– στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς φέρνει στο προσκήνιο ένα ανεξερεύνητο πεδίο έρευνας, υπογραμμίζοντας τον ρόλο του φλεγμονώδους *milieu* στο μικροπεριβάλλον του όγκου.
2. Η παρούσα μελέτη ανέδειξε για πρώτη φορά τη στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του RANKL και της OPG με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, και ειδικότερα στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν το μεταστατικό δυναμικό το οποίο προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα οι σηματοδοτικές οδοί που πυροδοτούνται από τα εν λόγω μόρια.
3. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του TRAIL συσχετίστηκε για πρώτη φορά σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα στο θηλώδες καρκίνωμα και ειδικότερα στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο αλλά και στον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους. Αναδείχτηκε, επίσης, ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας όσον αφορά την παρουσία των εν λόγω λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι ο TRAIL ευοδώνει το μεταστατικό δυναμικό του όγκου και υποδεικνύουν την αναγκαιότητα διερεύνησης των υποκείμενων μηχανισμών.
4. Η παρούσα μελέτη έδειξε, για πρώτη φορά, ότι η OPG σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την πολυεστιακή φύση του θηλώδους καρκινώματος, γνώση που ενδυναμώνει την υπόθεση ότι η OPG συμβάλλει στη γένεση και εξέλιξη των όγκων.
5. Καινοτόμος είναι η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα με τις ακόλουθες συνεκφράσεις KRas–TRAIL, c-Fos–OPG, c-Fos–TRAIL, RANKL–TRAIL, TRAIL–OPG και RANKL–OPG στο σύνολο του θηλώδους. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η συνομιλία των κυτταροκινών τόσο μεταξύ τους όσο και με τις ογκοπρωτεΐνες KRas και c-Fos οδηγεί στην ενίσχυση του μεταστατικού δυναμικού των όγκων.
6. Η διαπίστωση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς ενισχύει την υπόθεση ότι οι μεταλλάξεις και/ή η υπερέκφραση της ογκοκατασταλτικής αυτής πρωτεΐνης ενέχονται στην παθογένεια του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς.
7. Η διαπίστωση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης c-Fos στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς υποδεικνύει ένα ελάχιστα μελετημένο μέχρι σήμερα πεδίο έρευνας.
8. Η έκφραση των KRas μεταλλάξεων στον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους συνάδει με τα σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με το μοριακό προφίλ αυτού του υπότυπου. Ωστόσο, οι καινοτόμες διαπιστώσεις ότι αξιοσημείωτο ποσοστό του κλασσικού θηλώδους υπότυπου φέρει KRas μεταλλάξεις καθώς και ότι η πλειοψηφία των θηλωδών καρκινωμάτων που φέρουν KRas μεταλλάξεις ανήκει στον κλασσικό θηλώδη υπότυπο υποδεικνύουν την αναγκαιότητα διερεύνησης και, ενδεχομένως, αναθεώρησης του κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος που φέρει Ras μεταλλάξεις.

9. Η παρούσα μελέτη αδυνατεί να αναδείξει τα υπό διερεύνηση μόρια ως δείκτες της συνύπαρξης της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, αντανακλώντας πιθανότατα τη συγκεχυμένη αιτιοπαθογενετική θεώρηση της συνύπαρξης αυτής, γεγονός που επιβάλλει τη συνέχιση της έρευνας.
10. Η λεμφαδενική διήθηση του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος συσχετίστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με τη διήθηση της κάψας και με την ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση ανεξαρτήτως του μεγέθους του όγκου, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα παθολογοανατομικά αυτά χαρακτηριστικά σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς.

2.8 ΕΝΑΥΣΜΑ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η παρούσα μελέτη δίνει το έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της έκφρασης των μορίων RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas, c-Fos στη διαμόρφωση της “μοριακής υπογραφής” του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς, ώστε οι πληροφορίες που θα αποκομισθούν να αξιοποιηθούν για τον σχεδιασμό της βέλτιστης θεραπευτικής παρέμβασης. Ειδικότερα, πολύτιμο εφόδιο στην κλινική πράξη ενδέχεται να αποτελέσει η τεκμηρίωση, μέσω μελλοντικών ερευνών, της δυνατότητας πρόβλεψης του κινδύνου εκδήλωσης λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό διαμέρισμα βάσει της έκφρασης και της συνέκφρασης των μορίων RANKL, OPG, TRAIL καθώς και της συνέκφρασης αυτών με τις μεταλλαγμένες KRas πρωτεΐνες και την υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos. Εικάζεται ότι η γνώση αυτή θα συμβάλλει στην αναγνώριση του υποπληθυσμού των ασθενών με εν δυνάμει μεταστατική νόσο, κατευθύνοντας την εξατομίκευση της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης συγχρόνως με την ολική θυρεοειδεκτομή κατά την αρχική χειρουργική προσέγγιση με στόχο τη μείωση του κινδύνου υποτροπής. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, ο δυνητικός ρόλος της έκφρασης της OPG ως δείκτη της παρουσίας νόσου με πολλαπλές εστίες χρήζει περαιτέρω μελέτης,

Η αποκρυπτογράφηση του status των μεταλλάξεων και της υπερέκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς ενδέχεται να συμβάλλει στην κατανόηση του *continuum* της αποδιαφοροποίησης.

Η διαλεύκανση του κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς που φέρει Ras μεταλλάξεις αναμένεται να διευρύνει τους ορίζοντες της μοριακής ταξινόμησης. Η αποσαφήνιση του status της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης c-Fos στο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς πιθανόν να εμπλουτίσει το μοριακό προφίλ αυτού του τύπου του καρκίνου.

Ιδιαίτερο νόημα προσδίδει στα ευρήματά μας το γεγονός ότι τα εν λόγω μόρια αποτελούν στόχο καινοτόμων φαρμάκων που εφαρμόζονται ήδη στην κλινική πράξη, όπως το denosumab, και άλλων που βρίσκονται υπό ανάπτυξη, όπως το μονοκλωνικό αντίσωμα maratumumab (αγωνιστής του TRAILR1) και ο recombinant human TRAIL (Dulanermin).

Η ανάδειξη των μορίων που πραγματεύεται η παρούσα μελέτη ως προγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων προϋποθέτει τη διαλεύκανση των παραγόντων που καθορίζουν εάν το *continuum* των αμφίσημων σηματοδοτικών οδών θα οδηγήσει στην αναχαίτιση ή, αντίθετα, στην εξέλιξη του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς. Η ανάπτυξη αντινεοπλασματικών θεραπειών που θα στρέψουν τις ευοδωτικές στον όγκο σηματοδοτήσεις προς την εκ διαμέτρου αντίθετη αναχαίτιση του όγκου αναμένεται να αποτελέσει ελπιδοφόρο στρατηγική της Θεραπευτικής του καρκίνου θυρεοειδούς.

Τέλος, υπό το πρίσμα της επικείμενης υιοθέτησης της 8^{ης} έκδοσης του συστήματος AJCC/TNM, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της προγνωστικής σημασίας της διήθησης της κάψας και της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης.

2.9. ANTI ΕΠΙΛΟΓΟΥ

Ως επιστέγασμα των όσων αναλύθηκαν στο παρόν πόνημα παρατίθεται η εύστοχη θεώρηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Βιολογίας του Καρκίνου και της Χειρουργικής Τέχνης που διατύπωσε ο Grant: Παραφράζοντας το αλληγορικό σχόλιο του Blake Cady⁷⁴⁴, ο Grant επισημαίνει: *“η Βιολογία του Καρκίνου είναι ο Βασιλιάς και η εξατομίκευση της Θεραπευτικής η Βασίλισσα, ενώ στο Βασίλειο του Καρκίνου η Χειρουργική Τέχνη συνιστά τον Πρίγκιπα και την Πριγκίπισσα που επιχειρούν να απελευθερωθούν από την κυριαρχία του Βασιλιά και της Βασίλισσας μάταια, καθώς τα εμπόδια που ορθώνει η Βιολογία είναι ανυπέρβλητα”*.

Η ανατολή της εποχής της εξατομικευμένης μοριακής και γονιδιωματικής ιατρικής (precision medicine) σκιαγραφεί την ευοίωνη προοπτική να υπερνικηθούν τα προαναφερθέντα εμπόδια χάρη στη γνώση που απορρέει από την αποκρυπτογράφηση της Βιολογίας του Καρκίνου. Η γεφύρωση των ερευνητικών δεδομένων με την κλινική πράξη διέπεται από τη θεμελιώδη αρχή *“primum non nocere”*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Η ανάδειξη των πλειοτροπικών κυτταροκινών OPG, RANKL και TRAIL ως ενορχηστρωτών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου αποτελεί το έρεισμα της μελέτης της δυναμικής συμβολής τους στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Ο συγκερασμός των σηματοδοτικών οδών που πυροδοτούνται από τις κυτταροκίνες OPG, RANKL και TRAIL με τις μεταλλάξεις της KRas πρωτεΐνης, την υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos και τις μεταλλάξεις αλλά και την υπερέκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 σκιαγραφεί ένα πολύπλευρο και σύνθετο δίκτυο που ενέχεται στη γένεση και εξέλιξη του καρκίνου. Η παρούσα μελέτη διερευνά για πρώτη φορά την υπόθεση ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas και c-Fos χαρακτηρίζει ένα υποσύνολο του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς με δυνάμει επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Δευτερεύων σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση του κλινικοπαθολογοανατομικού προφίλ του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς που μεθίσταται στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα.

Υλικό – Μέθοδοι

Στην παρούσα μελέτη εισήχθησαν 114 ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ολική θυρεοειδεκτομή με σύγχρονη αφαίρεση των λεμφαδένων του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος από το 2009 έως το 2014. Κριτήριο επιλογής των ασθενών ήταν η παθολογοανατομική τεκμηρίωση της παρουσίας θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Προσδιορίστηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas και c-Fos στον θυρεοειδικό καρκινικό ιστό στο σύνολο του θηλώδους και ανά ιστολογικό υπότυπο αυτού. Διερευνήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που θεωρείται ότι καθορίζουν δυσσίωση κλινική έκβαση των όγκων, όπως η ηλικία μεγαλύτερη από 45 έτη (σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM), το άρρεν φύλο, ο ιστολογικός υπότυπος, η πολυεστιακή φύση του όγκου, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα, το στάδιο της νόσου σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM καθώς και η συνύπαρξη θυρεοειδίτιδας Hashimoto. Πιθανές συσχετίσεις της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο σύνολο του θηλώδους αναλύθηκαν με μοντέλα λογαριθμικής παλινδρόμησης κατάλληλα προσαρμοσμένα για τρεις τεκμηριωμένους προγνωστικούς παράγοντες, την ηλικία, το φύλο και το στάδιο T (7^η έκδοση AJCC/TNM) της νόσου. Επίσης, αναλύθηκε η συσχέτιση των ζευγών των συνεκφράσεων των υπό μελέτη μορίων με το *status* των λεμφαδενικών μεταστάσεων στο σύνολο του θηλώδους καρκινώματος. Τέλος, διερευνήθηκε η συσχέτιση των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών του πληθυσμού της μελέτης με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα.

Αποτελέσματα

Ανοσοϊστοχημική έκφραση RANKL, OPG, TRAIL, KRas, c-Fos, p53 παρατηρήθηκε στο 78.6%, 63.2%, 61.4%, 47.4%, 73.7%, 7% αντίστοιχα, στο σύνολο του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς. Η έκφραση RANKL, OPG και TRAIL παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ($p=0.007$, $p<0.001$ και $p=0.002$, αντίστοιχα). Επιπλέον, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της OPG με την

πολυεστιακή φύση του όγκου ($p=0.045$). Οι εκφράσεις RANKL και OPG συσχετίστηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα στον κλασικό θηλώδη υπότυπο ($p=0.027$, $p=0.006$, αντίστοιχα). Η έκφραση του TRAIL συσχετίστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα τόσο στον κλασικό θηλώδη όσο και στον θυλακιώδη υπότυπο του θηλώδους ($p=0.043$, $p=0.049$, αντίστοιχα). Η εφαρμογή μοντέλων λογαριθμικής παλινδρόμησης προσαρμοσμένων για την ηλικία, το φύλο, το στάδιο T σύμφωνα με την 7^η έκδοση AJCC/TNM- έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του TRAIL με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα (OR=10.335, 95% CI: 1.23-86.87). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των ακόλουθων έξι ζευγών συνεκφράσεων των υπό μελέτη μορίων με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό διαμέρισμα: TRAIL-KRas ($p=0.011$), TRAIL-c-Fos ($p=0.006$), OPG- c-Fos ($p=0.024$), RANKL-TRAIL ($p<0.001$), RANKL-OPG ($p<0.001$), TRAIL-OPG ($p<0.001$). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, KRas, c-Fos δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κανένα από τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της KRas πρωτεΐνης, αντανακλώντας την παρουσία KRas μεταλλάξεων, παρατηρήθηκε στο 50% του θυλακιώδους υπότυπου του θηλώδους. Καινοτόμο εύρημα της μελέτης μας είναι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της KRas πρωτεΐνης σχεδόν στο ήμισυ του συνόλου του θηλώδους (47.4%) και ειδικότερα στο 47.4% του κλασικού θηλώδους και στο 33.3% του υπότυπου “υψηλών κυττάρων”. Επισημαίνεται ότι επί του συνόλου του θηλώδους που παρουσιάζει ανοσοϊστοχημική έκφραση της KRas πρωτεΐνης, το κλασικό θηλώδες καρκίνωμα συνιστά την πλειοψηφία – το 66.67% – ενώ ο θυλακιώδης υπότυπος αντιπροσωπεύει μόλις το 29.6%. Τέλος, η διήθηση της κάψας και το στάδιο T3 (7^η έκδοση AJCC/TNM) το οποίο στη μελέτη μας αντιπροσωπεύει την ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση συσχετίστηκαν σε σημαντικό βαθμό με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στο κεντρικό τραχηλικό λεμφαδενικό διαμέρισμα ($p=0.019$, $p=0.006$, αντίστοιχα).

Συμπεράσματα

Περαιτέρω έρευνα απαιτείται ώστε να εφαρμοσθούν στην κλινική Θεραπευτική τα καινοτόμα ευρήματα της παρούσας μελέτης που αναδεικνύουν τις κυτταροκίνες OPG, RANKL και TRAIL ως μόρια με κάρριο ρόλο στο μεταστατικό δυναμικό του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς όχι μόνο *per se* αλλά και ως αποτέλεσμα συνεργιστικής δράσης με τις μεταλλάξεις KRas και την υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Fos. Παρομοίως, η διαλεύκανση του ρόλου της διήθησης της κάψας και της ελάχιστης εξωθυρεοειδικής επέκτασης στο μεταστατικό δυναμικό του θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς παραμένει ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Η εδραίωση προγνωστικών βιοδεικτών θα αποτελέσει ρηξικέλευθο βήμα στην εξατομίκευση της προληπτικής λεμφαδενικής αφαίρεσης του κεντρικού τραχηλικού λεμφαδενικού διαμερίσματος στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

Λέξεις-κλειδιά

Θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, Λεμφαδενικές μεταστάσεις, μοριακοί βιοδείκτες, OPG, RANKL, TRAIL, p53, KRas, c-Fos

Summary

Introduction

The designation of pleiotropic cytokines OPG, RANKL, TRAIL as orchestrators of tumor microenvironment provides the rationale for pursuing their potential involvement in the milieu of papillary thyroid carcinoma (PTC). The integration of signaling transduction cascades induced by OPG, RANKL, TRAIL with mutations of KRas protein, overexpression of c-Fos oncoprotein, and mutations as well as overexpression of tumor-suppressor p53 protein delineates a nuanced and sophisticated network implicated in genesis and progression of cancer. The present study investigates for the first time the hypothesis that the immunohistochemical expression of RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas, and c-Fos configures a subpopulation of PTC with aggressive biological behavior. Secondary scope of our study was to explore the clinicopathological profile of PTC with a propensity to metastasize to central lymph node compartment.

Patients–Methods

The present study enrolled 114 patients who underwent total thyroidectomy with simultaneous dissection of lymph nodes of central cervical compartment from 2009 to 2014. Inclusion criterion was the diagnosis of histologically confirmed papillary thyroid carcinoma (PTC). The expression of RANKL, OPG, TRAIL, p53, KRas, c-Fos was evaluated immunohistochemically in total PTC as well as according to histological PTC subtype. The immunohistochemical (IHC) expression of the under investigation molecules was explored in correlation with adverse clinicopathological characteristics, such as age older than 45 years old (according to AJCC/TNM 7th edition), male sex, histological subtype, multifocality, stage disease (AJCC/TNM 7th edition), central lymph node metastases (CLNM) status, as well as with coexistence of Hashimoto's thyroiditis (HT). Putative associations of expressions of the under investigation molecules with presence of CLNM were analyzed applying multivariable-adjusted logistic regression models controlling for age, sex and T stage (AJCC/TNM 7th edition). Moreover, the correlation of pairs of coexpressions of examined molecules with CLNM status was analyzed in total PTC. Finally, the association of the clinicopathological characteristics of study population with presence of CLNM was explored.

Results

RANKL, OPG, TRAIL, KRas, c-Fos, and p53 IHC expression was demonstrated in 78.6%, 63.2%, 61.4%, 47.4% 73.7% , and 7% of PTC, respectively. The IHC expression of RANKL, OPG and TRAIL showed significant association with CLNM ($p=0.007$, $p<0.001$, and $p=0.002$, respectively). Additionally, the OPG IHC expression correlated significantly with multifocality ($p=0.045$). The association of RANKL and OPG IHC expressions with CLNM proved to be significant as regards classical PTC (c PTC) ($p=0.027$ and $p=0.006$, respectively). TRAIL IHC expression associated significantly with CLNM in both c PTC ($p=0.043$) and follicular variant of PTC (FVPTC) ($p=0.049$). Multivariable-adjusted logistic regression models controlling for age, sex and T stage revealed a significant correlation of TRAIL IHC expression with CLNM (OR:10.335, 95% CI: 1.23-86.87). Six pairs of IHC coexpressions of the examined molecules demonstrated a significant correlation with CLNM: TRAIL–KRas ($p=0.011$), TRAIL–c-Fos ($p=0.006$), OPG–c-Fos ($p=0.024$), RANKL–TRAIL ($p<0.001$), RANKL–OPG ($p<0.001$), TRAIL–OPG ($p<0.001$). p53, KRas and c-Fos IHC expressions showed no significant association with any of the investigated characteristics. IHC expression of KRas protein,

reflecting the presence of KRas mutation, was observed in 50% of FVPTC. A novel finding of our study is the IHC expression of KRas protein in almost half of PTC (47.4%), in particular in 47.4% of c PTC and 33.3% of TCV PTC. Importantly, in the context of KRas-expressing PTC, the c PTC constitutes the most prevalent subtype (66.7%), while FVPTC represented only 29.6% of total PTC. Finally, the capsular invasion and the stage T3 (AJCC/TNM 7th edition) reflecting herein the minimal extrathyroidal extension were correlated significantly with the presence of CLNM ($p=0.019$, $p=0.006$, respectively).

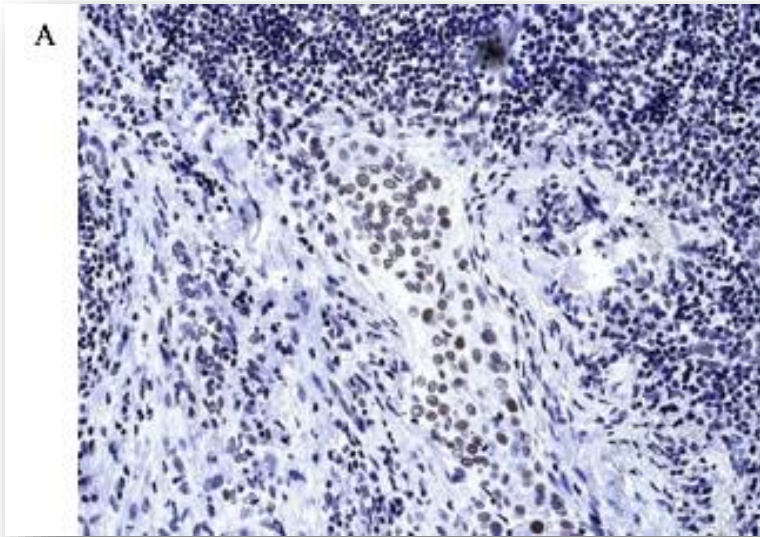
Conclusions

Further research is mandatory for clinical translation of the novel findings of the present study that designate the cytokines OPG, RANKL, TRAIL as crucial players of the metastatic potential of PTC not only *per se* but also in concert with KRas mutations and c-Fos overexpression. Likewise, deciphering the role of the capsular invasion and the minimal extrathyroidal extension in the metastatic potential of PTC remains an appealing realm of research. The establishment of prognostic biomarkers will revolutionize the individualization the prophylactic central lymph node dissection in PTC.

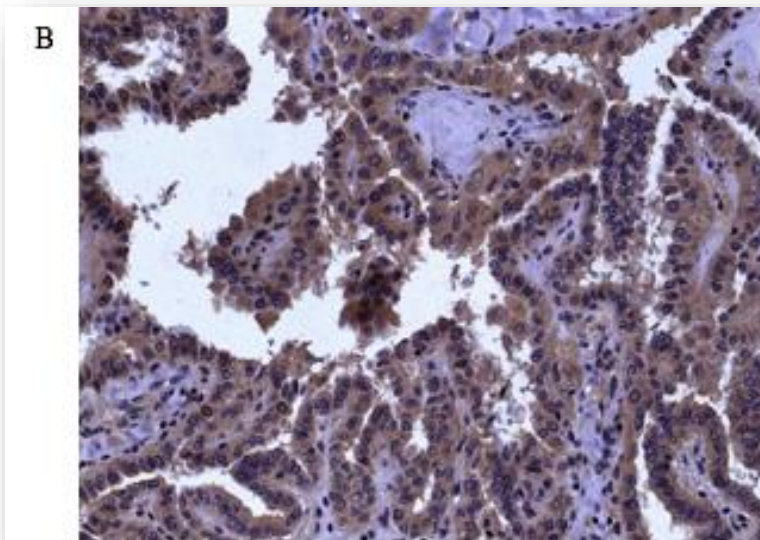
Keywords

Papillary thyroid carcinoma, Lymph node metastases, molecular biomarkers, OPG, RANKL, TRAIL, p53, KRas, c-Fos

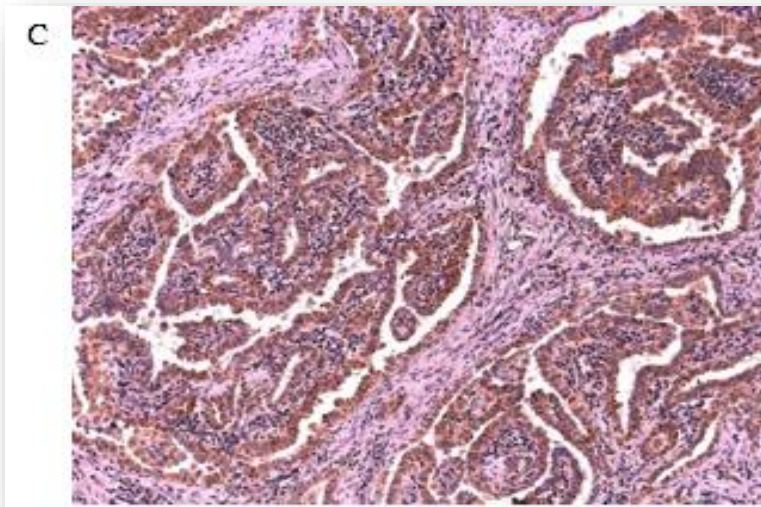
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



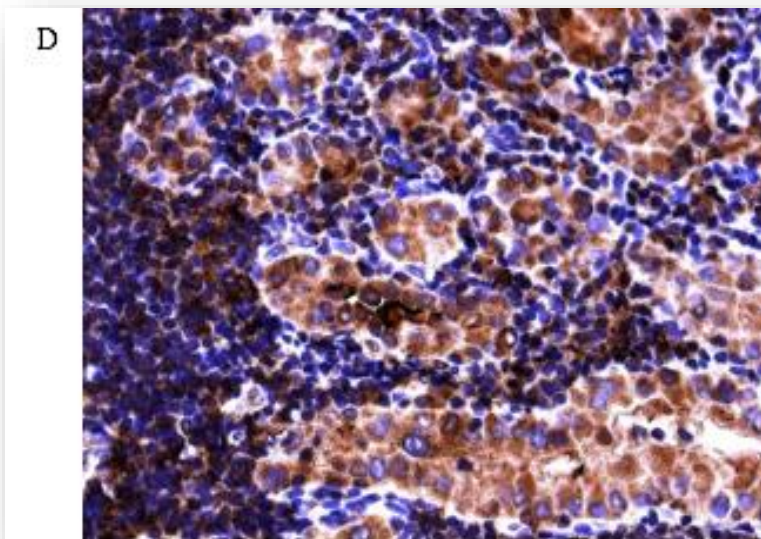
Εικόνα 2.1. Α: Θετική ανοσοϊστοχημική πυρηνική έκφραση p53 σε ΡΤC (μεγέθυνση ×20)



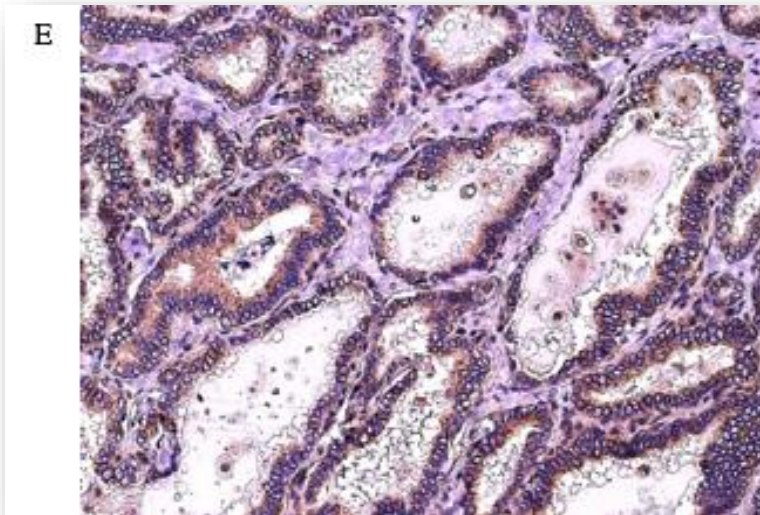
Εικόνα 2.2. Β: Θετική ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση KRas σε ΡΤC (μεγέθυνση ×20).



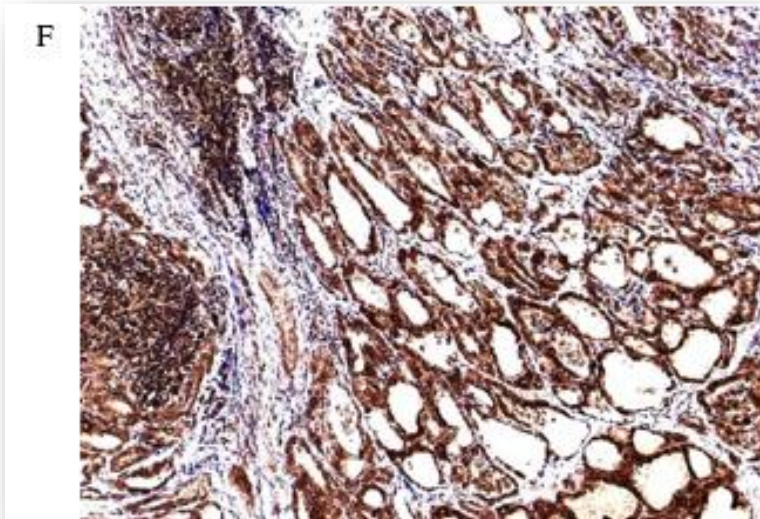
Εικόνα 2.3. C: Θετική ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση c-Fos σε PTC (μεγέθυνση $\times 10$)



Εικόνα 2.4. D: Θετική ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση RANKL σε PTC (μεγέθυνση $\times 40$)



Εικόνα 2.5. Ε: Θετική ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση TRAIL σε PTC (μεγέθυνση $\times 20$)



Εικόνα 2.6. F: Θετική ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση OPG σε PTC (μεγέθυνση $\times 10$)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–E386.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(1):7-30.
3. Aschebrook-Kilfoy B, Schechter RB, Shih YC, et al. The clinical and economic burden of a sustained increase in thyroid cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22(7):1252-1259.
4. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *Int J Cancer* 2015;136(9):2187-2195.
5. Dal Maso L, Tavilla A, Pacini F, et al. Survival of 86,690 patients with thyroid cancer: A population-based study in 29 European countries from EUROCare-5. *Eur J Cancer* 2017;77:140-152.
6. Tiedje V, Stuschke M, Weber F, Dralle H, Moss L, Führer D. Anaplastic thyroid carcinoma: review of treatment protocols. *Endocr Relat Cancer* 2018; 25(3):R153-R161.
7. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* 2014; 159(3):676-690.
8. Scopa CD. Histopathology of Thyroid Tumors. An Overview. *Hormones* 2004;3(2):100-110.
9. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, 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):1-133.
10. Wells SA, Asa SL, Dralle H, et al. Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2015;25(6):567-610.
11. Hegerova L, Griebeler ML, Reynolds JP, Henry MR, Gharib H. Metastasis to the thyroid gland: Report of a large series from the Mayo Clinic. *Am J Clin Oncol* 2015;38(4):338-3342.
12. Moghaddam PA, Cornejo KM, Khan A. Metastatic carcinoma to the thyroid gland: a single institution 20-year experience and review of the literature. *Endocr Pathol* 2013;24(3):116-124.
13. [https://www.uptodate.com/contents/search/Papillary thyroid cancer/](https://www.uptodate.com/contents/search/Papillary%20thyroid%20cancer/) Accessed October 2017
14. Wong KP, Lang BHH. The Role of Prophylactic Central Neck Dissection in Differentiated Thyroid Carcinoma: Issues and Controversies. *Journal of Oncology* 2011;2011:127929.
15. Mazzaferri EL, Kloos RT. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(4):1447–1463.
16. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol* 2016;2(8):1023–1029.
17. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam AK, Wan KY. Classical and follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study on clinicopathologic features and long-term outcome. *World J Surg* 2006;30(5):752-758.
18. Lam AK, Lo CY, Lam KS. Papillary carcinoma of thyroid: a 30-yr clinicopathological review of the histological variants. *Endocr Pathol* 2005;16(4):323-330.
19. Kazaure HS, Roman SA, Sosa JA. Aggressive variants of papillary thyroid cancer: incidence, characteristics and predictors of survival among 43,738 patients. *Ann Surg Oncol* 2012;19(6):1874-1880.
20. Gonzalez-Gonzalez R, Bologna-Molina R, Carreon-Burciaga RG, Gómezpalacio-Gastelum M, Molina-Frechero N, Salazar-Rodríguez S. Papillary Thyroid Carcinoma: Differential Diagnosis and Prognostic Values of Its Different Variants: Review of the Literature. *ISRN Oncology* 2011;2011:915925.

21. Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, Caudill CM, Lloyd RV. Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior. *American Journal of Surgical Pathology* 2001;25(12):1478–1484.
22. Grile G Jr, Hazard JB. Relationship of the Age of the Patient to the Natural History and Prognosis of Carcinoma of the Thyroid. *Ann Surg* 1953;138(1):33–38.
23. Chem KT, Rosai J. Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases. *Am J Surg Pathol* 1977;1(2):123–130.
24. Yoon JH, Kwon HJ, Kim E-K, Moon HJ, Kwak JY. The follicular variant of papillary thyroid carcinoma: characteristics of preoperative ultrasonography and cytology. *Ultrasonography* 2016;35(1):47-54.
25. Rusinek D, Chmielik E, Krajewska J, et al. Current Advances in Thyroid Cancer Management. Are We Ready for the Epidemic Rise of Diagnoses? *Int J Mol Sci* 2017;18(8):pii:E1817.
26. Zhao L, Dias-Santagata D, Sadow PM, Faquin WC. Cytological, molecular, and clinical features of noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features versus invasive forms of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 2017;125(5):323-331.
27. Yang GCH, Fried KO, Scognamiglio T. Sonographic and cytologic differences of NIFTP from infiltrative or invasive encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: A Review of 179 Cases. *Diagn Cytopathol* 2017;45(6):533-5541.
28. Paulson VA, Shivdasani P, Angell TE, et al. Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features Accounts for More Than Half of "Carcinomas" Harboring RAS Mutations. *Thyroid* 2017;27(4):506-511.
29. Hawk WA, Hazard JB. The many appearances of papillary carcinoma of the thyroid. *Cleveland Clinic Quarterly* 1976;43 (4):207–215.
30. Merino MJ, Monteagudo. Tall cell carcinoma of the thyroid: an aggressive variant of papillary cancer. *Pathology Case Rev* 1997;2:196–199.
31. Jalisi S, Ainsworth T, Lavalley M. Prognostic outcomes of tall cell variant papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *J Thyroid Res* 2010;2010:325602.
32. Basolo F, Giannini R, Monaco C et al. Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160(1):247–254.
33. Choi YJ, Shin JH, Kim JH, Jung SL, Son EJ, Oh YL. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: sonographic and clinical findings. *J Ultrasound Med* 2011;30(60):853–858.
34. Campo E, Merino MJ, Liotta L, Neumann R, Stetler-Stevenson W. Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. *Hum Pathol* 1992;23(12):1395–1401.
35. [https://www.uptodate.com/contents/search/Follicular thyroid cancer/](https://www.uptodate.com/contents/search/Follicular%20thyroid%20cancer/) Accessed October 2017.
36. Volante M, Bussolati G, Papotti M. The story of poorly differentiated thyroid carcinoma: From Langhans' description to the Turin proposal via Juan Rosai. *Semin Diagn Pathol* 2016; 33(5):277-283.
37. DeLellis RA. World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. 3rd ed. Lyon: IARC Press; 2004. Chapter 2. Poorly differentiated carcinoma; pp. 73–76.
38. Volante M, Collini P, Nikiforov YE et al. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(8): 1256-1264.
39. Ibrahimpasic T, Ghossein R, Carlson DL, et al. Outcomes in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(4):1245-1252.
40. Cherkaoui GS, Guensi A, Taleb S, et al. Poorly differentiated thyroid carcinoma: a retrospective clinicopathological study. *Pan Afr Med J* 2015;21:137.

41. Tanaka K, Sonoo H, Saito W, et al. Analysis of clinical outcome of patients with poorly differentiated thyroid carcinoma. *ISRN Endocrinol* 2011;2011:308029.
42. Volante M, Landolfi S, Chiusa L, et al. Poorly differentiated carcinomas of the thyroid with trabecular, insular, and solid patterns: a clinicopathologic study of 183 patients. *Cancer* 2004;100(5):950-957.
43. Yu MG, Rivera J, Jimeno C. Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: 10-Year Experience in a Southeast Asian Population. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2017;32(2):288-295.
44. Gerber TS, Schad A, Hartmann N, Springer E, Zechner U, Muscholt TJ. Targeted next-generation sequencing of cancer genes in poorly differentiated thyroid cancer. *Endocr Connect* 2018;7(1):47-55.
45. [https://www.uptodate.com/contents/search/Anaplastic thyroid cancer/](https://www.uptodate.com/contents/search/Anaplastic%20thyroid%20cancer/) Accessed October 2017
46. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer* 1997;79(3):564-573.
47. Haddad RI, Lydiatt WM, Ball DW, et al. Anaplastic Thyroid Carcinoma, Version 2.2015: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw: JNCCN* 2015;13(9):1140-1150.
48. Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, et al. American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines Taskforce. American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid* 2012;22(11):1104-11039.
49. Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(1):17-44.
50. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>. Accessed February 2018.
51. Zheng T, Holford TR, Chen Y, et al. Time trend and age-period-cohort effect on incidence of thyroid cancer in Connecticut, 1935-1992. *Int J Cancer* 1996; 67(4):504-509.
52. Miller JM, Horn RC, Block MA. The increasing incidence of carcinoma of the thyroid in a surgical practice. *JAMA* 1959;171:1176-1179.
53. Zheng T, Holford TR, Chen Y, et al. Time trend and age-period-cohort effect on incidence of thyroid cancer in Connecticut, 1935-1992. *Int J Cancer* 1996;67:504-509.
54. Davies L, Welch GH. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006; 295(18):2164-2167.
55. Kent WDT, Hall SF, Isotalo PA, Houlden RL, George RL, Groome PA. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ* 2007;177(11):1357-1361.
56. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Eng J Med* 1993;328(8):553-559.
57. 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.
58. 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.
59. Mazzaferri EL. Managing thyroid microcarcinomas. *Yonsei Medical Journal* 2012;53(1):1-14.
60. Morris LG, Myssiorek D. Improved detection does not fully explain the rising incidence of well-differentiated thyroid cancer: a population-based analysis. *Am J Surg* 2010;200(4):454-461.
61. Cramer JD, Fu P, Harth KC, Margevicius S, Wilhelm SM. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results national cancer data registry. *Surgery* 2010;148(6): 1147-1153.
62. Vigneri R, Malandrino P, Vigneri P. The changing epidemiology of thyroid cancer: Why is incidence increasing? *Curr Opin Oncol* 2015;27(1):1-7.
63. Sarne D, Schneider AB. External radiation and thyroid neoplasia. *Endocrin Metab Clin North Am* 1996;25:181-196.

64. Mettler FA Jr, Bhargavan M, Thomadsen BR, et al. Nuclear Medicine Exposure in the United States, 2005–2007: preliminary results. *Seminars in Nuclear Medicine* 2008;38(5):384–391.
65. Mazonakis M, Tzedakis A, Damilakis J, Gourtsoyiannis N. Thyroid dose from common head and neck CT examinations in children: is there an excess risk for thyroid cancer induction? *European Radiology* 2007; 17(5):1352–1357.
66. Ron E, Lubin JH, Shore RE et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiation Research* 1995;141(3):259–277.
67. Shore RE. Issues and epidemiological evidence regarding radiation-induced thyroid cancer. *Radiat Res* 1992;131(1):98-111.
68. Jereczek-Fossa BA, Alterio D, Jassen J, Gibelli B, Tradati N, Orecchia R. Radiotherapy-induced thyroid disorders. *Cancer Treat Rev* 2004;30(4):369-84.
69. Williams D. Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. *Oncogene* 2008;27(supplement 2):S9–S18.
70. Cardis E, Kesminierne A, Ivanov V, et al. Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(10):724-732.
71. Tronko MD, Howe GR, Bogdanova TI, et al. A cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the chornobyl accident: thyroid cancer in Ukraine detected during first screening. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(13):897-903.
72. McLeod DS, Watters KF, Carpenter AD, Ladenson PW, Cooper DS, Ding EL. Thyrotropin and Thyroid Cancer Diagnosis: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(8):2682–2692.
73. Matsuo K, Friedman E, Gejman PV, Fagin JA. The thyrotropin receptor (TSH-R) is not an oncogene for thyroid tumors: structural studies of the TSH-R and the α -subunit of Gs in human thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(6):1446–1451.
74. Derwahl M, Broecker M, Kraiem Z. Thyrotropin may not be the dominant growth factor in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;84(3):829–834.
75. Mazzaferri EL. Thyroid cancer and Graves' disease: the controversy 10 years later. *Endocr Pract* 2000;6(2):221–225.
76. Shi Y, Zou M, Farid NR. Expression of thyrotropin receptor gene in thyroid carcinoma is associated with good prognosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39(3):269–274.
77. Satta MA, DeRosa G, Testa A, Maussier ML, Valenza V, Rabitti C, Saletrich I, D'Ugo D, Picciocchi A. Thyroid cancer in suppressed contralateral lobe of patients with hot thyroid nodule. *Eur J Cancer* 1993; 29A(8):1190–1192.
78. Du Villard JA, Wicker R, Crespo P, Russo D, Filetti S, Gutkind JS, Sarasin A, Suárez HG. Role of the cAMP and MAPK pathways in the transformation of mouse 3T3 fibroblasts by a TSHR gene constitutively activated by point mutation. *Oncogene* 2000;19(42):4896–4905.
79. Haymart MR, Repplinger DJ, Levenson GE, et al. Higher Serum Thyroid Stimulating Hormone Level in Thyroid Nodule Patients Is Associated with Greater Risks of Differentiated Thyroid Cancer and Advanced Tumor Stage. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(3):809-814.
80. Dijkstra B, Prichard RS, Lee A, et al. Changing patterns of thyroid carcinoma. *Ir J Med Sc* 2007;176(2): 87–90.
81. Harach HR, Escalante DA, Onativia A, Lederer Outes J, Saravia Day E, Williams ED. Thyroid carcinoma and thyroiditis in an endemic goitre region before and after iodine prophylaxis. *Acta Endocrinologica* 1985;108(1):55–60.

82. Mathur A, Moses W, Rahbari R, et al. Higher rate of BRAF mutation in papillary thyroid cancer over time: a single-institution study. *Cancer* 2011;117(19):4390–4395.
83. Moleti M, Sturniolo G, Di Mauro M, Russo M, Vermiglio F. Female Reproductive Factors and Differentiated Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:111.
84. Farahati J, Bucsky P, Parlowsky T, Mader U, Reiners C. Characteristics of differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents with respect to age, gender, and histology. *Cancer*. 1997;80(11):2156–2162.
85. Shindo H, Amino N, Ito Y, et al. Papillary thyroid microcarcinoma might progress during pregnancy. *Thyroid* 2014;24(5):840–844.
86. Ito Y, Miyauchi A, Kudo T, 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):156-160.
87. Kimura M, Amino N, Tamaki H, Mitsuda N, Miyai K, Tanizawa O. Physiologic thyroid activation in normal early pregnancy is induced by circulating hCG. *Obstetrics and Gynecology* 1990;75(5):775–778.
88. Santin AP, Furlanetto TW. Role of Estrogen in Thyroid Function and Growth Regulation. *Journal of Thyroid Research* 2011;2011:875125.
- 89 Derwahl M, Nicula D. Estrogen and its role in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(5):T273-T283.
90. Son EJ, Nosé V. Familial Follicular Cell-Derived Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol* 2012;3:61.
91. Peterson E, De P, Nuttall R. BMI, Diet and Female Reproductive Factors as Risks for Thyroid Cancer: A Systematic Review. Ludgate M, ed. *PLoS ONE* 2012;7(1): e29177.
92. Choi WJ, Kim J. Dietary Factors and the Risk of Thyroid Cancer: A Review. *Clinical Nutrition Research*. 2014;3(2):75-88.
93. Kitahara CM, Platz EA, Freeman LE, et al. Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(3):464–472.
94. Rinaldi S, Lise M, Clavel-Chapelon F, et al. Body size and risk of differentiated thyroid carcinomas: findings from the EPIC study. *Int J Cancer* 2012;131(6):E1004–E1014.
95. Paes JE, Hua K, Nagy R, Kloos RT, Jarjoura D, Ringel MD. The relationship between body mass index and thyroid cancer pathology features and outcomes: a clinicopathological cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(9):4244–4250.
96. Santini F, Marzullo P, Rotondi M, et al. Mechanisms in endocrinology: the crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease. *Eur J Endocrinol* 2014;171(4):R137-52.
97. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371(9612):569-578.
98. Almquist M, Johansen D, Björge T, et al. Metabolic factors and risk of thyroid cancer in the Metabolic syndrome and Cancer project (Me-Can). *Cancer Causes Control* 2011;22(5):743-7451.
99. Ning J, Xi G, Clemmons DR. Suppression of AMPK activation via S485 phosphorylation by IGF-I during hyperglycemia is mediated by AKT activation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2011;152(8): 3143–3154.
100. Antico Arciuch VG, Russo MA, Kang KS, Di Cristofano A. Inhibition of AMPK and Krebs cycle gene expression drives metabolic remodeling of *Pten*-deficient preneoplastic thyroid cells. *Cancer Res* 2013; 73(17):5459-5472.
101. Pappa T, Alevizaki M. Obesity and thyroid cancer: a clinical update. *Thyroid* 2014; 24(2): 190–199.
102. Catalano S, Marsico S, Giordano C, et al. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J Biol Chem* 2003;278(31):28668–28676.

103. Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A, Normanno N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. *J Cell Biochem* 2008;105(4):956–964.
104. Kim WG, Park JW, Willingham MC, Cheng S. Diet-induced obesity increases tumor growth and promotes anaplastic change in thyroid cancer via activation of the JAK2-STAT3 signaling pathway in a mouse model. *Endocrinology* 2013;154(8):2936–2947.
105. Uddin S, Bavi P, Siraj AK, et al. Leptin-R and its association with PI3K/Akt signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* 2010;17(1):191–202.
106. Gonzalez-Perez RR, Xu Y, Guo S, Watters A, Zhou W, Leibovich SJ. Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signalling pathways and NFκB/HIF-1α activation. *Cell Signal* 2010; 22(9):1350–1362.
107. Ilie MI, Lassalle S, Long-Mira E, et al. In papillary thyroid carcinoma, TIMP-1 expression correlates with BRAF (V600E) mutation status and together with hypoxia-related proteins predicts aggressive behavior. *Virchows Archiv* 2013;463(3):437–444.
108. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews* 2015;36(6):E1-E150.
109. Malandrino P, Scollo C, Marturano I, et al. Descriptive Epidemiology of Human Thyroid Cancer: Experience From a Regional Registry and The "Volcanic Factor." *Front Endocrinol* 2013;4:65.
110. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-674.
111. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 2008;659(1-2):15-30.
112. Dailey ME, Lindsay S, Skahen R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto's disease of the thyroid gland. *Arch Surg* 1955;70(2):291-297.
113. Ye Z, Gu D, Hu H, Zhou Y, Hu X, Zhang X. Hashimoto's Thyroiditis, microcalcification and raised thyrotropin levels within normal range are associated with thyroid cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 2013;11:56.
114. 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.
115. Reppinger D, Bargren A, Zhang YW, Adler J, Haymart M, Chen H. Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *The Journal of surgical research* 2008;150(1):49-52.
116. Uhliarova B, Hajtman A. Hashimoto's thyroiditis - an independent risk factor for papillary carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol* 2017; pii: S1808-8694(17)30153-2.
117. Resende de Paiva C, Grønhøj C, Feldt-Rasmussen U, von Buchwald C. Association between Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer in 64,628 Patients. *Front Oncol* 2017;7:53.
118. Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3603-3610.
119. Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 2002;41(4):357-362.
120. Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, et al. RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2414-2423.
121. Wirtschafter A, Schmidt R, Rosen D, et al. Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope* 1997;107(1):95–100.
122. Larson SD, Jackson L, Riall T, et al. Increased incidence of well-differentiated thyroid cancer associated with Hashimoto's thyroiditis and the role of the PI3K/AKT pathway. *J Am Coll Surg* 2007;204(5):764–775.

123. Kang DY, Kim KH, Kim JM, Kim SH, Kim JY, Baik HW, Kim YS: High prevalence of RET, RAS, and ERK expression in Hashimoto's thyroiditis and in papillary thyroid carcinoma in the Korean population. *Thyroid* 2007;17(11):1031–1038.
124. Unger P, Ewart M, Wang B, Gan L, Kohtz S, Burstein D. Expression of p63 in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis: a pathological link? *Hum Pathol* 2003;34(8):764–769.
125. Burstein D, Chandandeep N, Wang B, Unger P. Immunohistochemical detection of p53 homolog p63 in solid cell nests, papillary thyroid carcinoma, and Hashimoto's thyroiditis: a stem cell hypothesis of papillary carcinoma oncogenesis. *Hum Pathol* 2004;35(4):465–473.
126. Jankovic B, Le KT, Hershman JM. Hashimoto's Thyroiditis and Papillary Thyroid Carcinoma: Is There a Correlation? *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(2):474–482.
127. Matesa-Anić D, Matesa N, Dabelić N, Kusić Z. Coexistence of papillary carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. *Acta Clin Croat* 2009;48(1):9-12.
128. Mukasa K, Noh JY, Kunii Y, et al. Prevalence of malignant tumors and adenomatous lesions detected by ultrasonographic screening in patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 2011;21(1):37–41.
129. Anil C, Goksel S, Gursoy A. Hashimoto's thyroiditis is not associated with increased risk of thyroid cancer in patients with thyroid nodules: a single-center prospective study. *Thyroid* 2010;20(6):601–606.
130. Shen G, Ji T, Hu S, Liu B, Kuang A. Coexistence of papillary thyroid carcinoma with thyroid MALT lymphoma in a patient with Hashimoto's thyroiditis: a clinical case report. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(52):e2403.
131. Ahn D, Heo SJ, Park JH, et al. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. *Acta Oncol* 2011;50(8):1228-1234.
132. Girardi FM, Barra MB, Zettler CG. Papillary thyroid carcinoma: does the association with Hashimoto's thyroiditis affect the clinicopathological characteristics of the disease? *Braz J Otorhinolaryngol* 2015;81(3): 283-287.
133. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2013;168(3):343-349.
134. Lun Y, Wu X, Xia Q, et al. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor of papillary thyroid cancer may improve cancer prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;148(3):396-402.
135. Schaffler A, Palitzsch KD, Seiffarth C, et al. Coexistent thyroiditis is associated with lower tumour stage in thyroid carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1998;28(10):838–844.
136. Kebebew E, Treseler PA, Ituarte PH, Clark OH. Coexisting chronic lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer revisited. *World J Surg* 2001;25(5):632-637.
137. Del Rio P, Cataldo S, Sommaruga L, Concione L, Arcuri MF, Sianesi M. The association between papillary carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis: does it modify the prognosis of cancer? *Minerva Endocrinol* 2008;33(1):1–5.
138. Konturek A, Barczyński M, Wierzchowski W, Stopa M, Nowak W. Coexistence of papillary thyroid cancer with Hashimoto thyroiditis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2013;398(3):389-394.
139. Kashima K, Yokoyama S, Noguchi S, et al. Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 1998;8(3):197-202.
140. Azizi G, Keller JM, Lewis M, Piper K, Puett D, Rivenbark KM, Malchoff CD. Association of Hashimoto's thyroiditis with thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21(6):845–852.
141. Fiore E, Latrofa F, Vitti P. Iodine, Thyroid Autoimmunity and Cancer. *European Thyroid Journal* 2015; 4(1):26-35.
142. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(5):1941-1946.

143. Nam-Goong IS, Kim HY, Gong G, Lee HK, Hong SJ, Kim WB, Shong YK. Ultrasonography-guided fine-needle aspiration of thyroid incidentaloma: correlation with pathological findings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60(1):21-28.
144. Mortensen JD, Woolner LB, Bennett WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1955;15(10):1270-1280.
145. Singer PA. Evaluation and management of the solitary thyroid nodule. *Otolaryngol Clin North Am* 1996; 29(4):577-591.
146. Russ G, Leboulleux S, Leenhardt L, Hegedüs L. Thyroid Incidentalomas: Epidemiology, Risk Stratification with Ultrasound and Workup. *European Thyroid Journal* 2014;3(3):154-163.
147. Barroeta JE, Wang H, Shiina N, Gupta PK, Livolsi VA, Baloch ZW. Is fine-needle aspiration (FNA) of multiple thyroid nodules justified? *Endocr Pathol* 2006;17(1):61-65.
148. Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, et al. Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary and multiple thyroid nodules on sonography. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3411-3417.
149. Bomeli SR, LeBeau SO, Ferris RL. Evaluation of a thyroid nodule. *Otolaryngologic clinics of North America* 2010;43(2):229-238.
150. Mitchell AL, Gandhi A, Scott-Coombes D, Perros P. Management of thyroid cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *The Journal of Laryngology and Otology* 2016;130(Suppl 2):S150-S160.
151. Moreno-Reyes R, Kyrilli A, Lytrivi M, Bourmorck C, Chami R, Corvilain B. Is there still a role for thyroid scintigraphy in the workup of a thyroid nodule in the era of fine needle aspiration cytology and molecular testing? *F1000Research* 2016;5:F1000 Faculty Rev-763.
152. Mirfakhraee S, Mathews D, Peng L, Woodruff S, Zigman JM. A solitary hyperfunctioning thyroid nodule harboring thyroid carcinoma: review of the literature. *Thyroid Res* 2013;6(1):7.
153. Mitchell JC, Grant F, Evenson AR, Parker JA, Hasselgren PO, Parangi S. Preoperative evaluation of thyroid nodules with 18FDG-PET/CT. *Surgery* 2005;138(6): 1166-1174; discussion 1174-1175.
154. Porterfield JR Jr, Grant CS, Dean DS, et al. Reliability of benign fine needle aspiration cytology of large thyroid nodules. *Surgery* 2008;144(6):963-968. discussion 968-969.
155. Ogilvie JB, Piatigorsky EJ, Clark OH. Current status of fine needle aspiration for thyroid nodules. *Adv Surg* 2006;40:223-238.
156. Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004;351(17):1764-1771.
157. Gharib H, Goellner JR Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993;118(4):282-289.
158. Cesur M, Corapcioglu D, Bulut S, Gursoy A, Yilmaz AE, Erdogan N, Kamel N. Comparison of palpation-guided fine-needle aspiration biopsy to ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in the evaluation of thyroid nodules. *Thyroid* 2006;16(6):555-561.
159. Karadeniz Cakmak G, Emre AU, Tascilar O, Gultekin FA, Ozdamar SO, Comert M. Diagnostic adequacy of surgeon-performed ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Surg Oncol* 2013;107(2):206-210.
160. Robitschek J, Straub M, Wirtz E, Klem C, Sniezek J. Diagnostic efficacy of surgeon-performed ultrasound-guided fine needle aspiration: a randomized controlled trial. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 142(3):306-309.
161. Hamberger B, Gharib H, Melton LJ 3rd, Goellner JR, Zinsmeister AR. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Impact on thyroid practice and cost of care. *Am J Med* 1982;73(3):381-384.
162. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer* 2007;111(6):508-516.

163. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2017; 27(11):1341-1346.
164. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *J Am Soc Cytopathol* 2017;6(6):217-222.
165. Bagga PK, Mahajan NC. Fine needle aspiration cytology of thyroid swellings: how useful and accurate is it? *Indian J Cancer* 2010;47(4):437-442.
166. Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, et al. A Large Multicenter Correlation Study of Thyroid Nodule Cytopathology and Histopathology. *Thyroid* 2011;21(3):243-251.
167. Furlan JC, Bedard YC, Rosen IB. Single versus sequential fine-needle aspiration biopsy in the management of thyroid nodular disease. *Canadian Journal of Surgery* 2005;48(1):12-18.
168. Na DG, Kim JH, Sung JY, et al. Core-needle biopsy is more useful than repeat fine-needle aspiration in thyroid nodules read as nondiagnostic or atypia of undetermined significance by the Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid* 2012;22(5):468–475.
169. Choi SH, Baek JH, Lee JH, et al. Thyroid nodules with initially nondiagnostic, fine-needle aspiration results: comparison of core-needle biopsy and repeated fine-needle aspiration. *Eur Radiol* 2014;24(11): 2819–2826.
170. Yeon JS, Baek JH, Lim HK, et al. Thyroid nodules with initially nondiagnostic cytologic results: the role of core-needle biopsy. *Radiology* 2013;268(1):274–280.
171. Yoon JH, Kim E-K, Kwak JY, Moon HJ. Effectiveness and Limitations of Core Needle Biopsy in the Diagnosis of Thyroid Nodules: Review of Current Literature. *J Pathol Transl Med* 2015;49(3):230-235.
172. Lang BHH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Staging Systems for Papillary Thyroid Carcinoma: A Review and Comparison. *Annals of Surgery* 2007;245(3):366-378.
173. Tran Cao HS, Johnston LE, Chang DC, Bouvet M. A critical analysis of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for differentiated thyroid carcinoma in young patients on the basis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry. *Surgery* 2012;152(2):145-151.
174. 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.
175. Oyer SL, Smith VA, Lentsch EJ. Reevaluating the prognostic significance of age in differentiated thyroid cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;147(2):221-226.
176. Adam MA, Thomas S, Hyslop T, Scheri RP, Roman SA, Sosa JA. Exploring the relationship between patient age and cancer-specific survival in papillary thyroid cancer: rethinking current staging systems. *J Clin Oncol* 2016;34(36):4415-4420.
177. Ganly I, Nixon IJ, Wang LY, et al. Survival from differentiated thyroid cancer: what has age got to do with it? *Thyroid* 2015;25(10):1106-1114.
178. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold RJ, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993;114 (6):1050-1057; discussion 1057-1058.
179. Papaleontiou M, Haymart MR. New Insights in Risk Stratification of Differentiated Thyroid Cancer. *Current opinion in oncology* 2014;26(1): 1-7.
180. Tuttle RM, Tala H, Shah J, et al. Estimating risk of recurrence in differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine remnant ablation: using response to therapy variables to modify the initial risk estimates predicted by the new American Thyroid Association staging system. *Thyroid* 2010; 20(12):1341–1349.

181. Pitoia F, Bueno F, Urcluoli C, et al. Outcome of patients with differentiated thyroid cancer risk stratified according to the American Thyroid Association and Latin-American Thyroid Society risk of recurrence classification systems. *Thyroid* 2013;23(11):1401-1407.
182. Nixon IJ, Ganly I, Patel SG, et al. The results of selective use of radioactive iodine on survival and on recurrence in the management of papillary thyroid cancer, based on Memorial Sloan-Kettering Cancer Center risk group stratification. *Thyroid* 2013;23(6):683-694.
183. Tuttle RM, Leboeuf R. Follow up approaches in thyroid cancer: A risk adapted paradigm. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2008;37(2):419-435.
184. So YK, Kim MW, Son YI. Multifocality and Bilaterality of Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 2015;8(2):174-178.
185. Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PPB. Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;82(11):3553-3562.
186. Guerrero MA, Clark OH. Controversies in the Management of Papillary Thyroid Cancer Revisited. *ISRN Oncology* 2011;2011:303128.
187. Wormald R, Sheahan P, Rowley S, Rizkalla H, Toner M, Timon C. Hemithyroidectomy for benign thyroid disease: who needs follow-up for hypothyroidism? *Clin Otolaryngol* 2008;33(6):587-591.
188. Lang BH, Lo CY. Total thyroidectomy for multinodular goiter in the elderly. *Am J Surg* 2005; 190(3): 418-423.
189. Lo CY, Kwok KF, Yuen PW. A prospective evaluation of recurrent laryngeal nerve paralysis during thyroidectomy. *Arch Surg* 2000;135(2):204-207.
190. Shah JP, Loree TR, Dharker D, Strong EW. Lobectomy versus total thyroidectomy for differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis. *Am J Surg* 1993;166(4):331-335.
191. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Low-risk differentiated thyroid cancer: the need for selective treatment. *Ann Surg Oncol* 1997;4(4):328-333.
192. Wanebo H, Coburn M, Teates D, Cole B. Total thyroidectomy does not enhance disease control or survival even in high-risk patients with differentiated thyroid cancer. *Ann Surg* 1998;227(6):912-921.
193. Hay ID, Bergstralh EJ, Grant CS, et al. Impact of primary surgery on outcome in 300 patients with pathologic tumor-node-metastasis stage III papillary thyroid carcinoma treated at one institution from 1940 through 1989. *Surgery* 1999;126(6):1173-1181;discussion 1181-1182.
194. Adam MA, Pura J, Gu L, et al. Extent of Surgery for Papillary Thyroid Cancer Is Not Associated with Survival: An Analysis of 61,775 Patients. *Ann Surg* 2014;260(4):601-607.
195. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, et al. Extent of Surgery Affects Survival for Papillary Thyroid Cancer. *Ann Surg* 2007;246(3):375-384.
196. Kim SK, Park I, Woo JW, Lee JH, Choe JH, Kim JH, Kim JS. Total thyroidectomy versus lobectomy in conventional papillary thyroid microcarcinoma: Analysis of 8,676 patients at a single institution. *Surgery* 2017;161(2):485-492.
197. Udelsman R, Lakatos E, Ladenson P. Optimal surgery for papillary thyroid carcinoma. *World J Surgery* 1996;20(1):88-93.
198. Blumhardt R, Wolin EA, Phillips WT, Salman UA, Walker RC, Stack BC Jr, Metter D. Current controversies in the initial post-surgical radioactive iodine therapy for thyroid cancer: a narrative review. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(6):R473-484.
199. Kim TY, Kim WG, Kim WB, Shong YK. Current Status and Future Perspectives in Differentiated Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab* 2014;29(3):217-225.

200. Sugitani I, Fujimoto Y. Does postoperative thyrotropin suppression therapy truly decrease recurrence in papillary thyroid carcinoma? A randomized controlled trial. *J Clinical Endocrinol Metab* 2010;95(10):4576–4583.
201. Hellevik AI, Åsvold BO, Bjørø T, Romundstad PR, Nilsen TIL, Vatten LJ. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2009;18(2):570–574.
202. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 2005;146(7):2864–2871.
203. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940–1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World Journal of Surgery* 2002;26(8):879–885.
204. Grant CS. Recurrence of papillary thyroid cancer after optimized surgery. *Gland Surgery* 2015;4(1):52–62.
205. Scheumann GFW, Gimm O, Wegener G, Hundeshagen H, Dralle H, Cady B. Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in papillary thyroid cancer. *World Journal of Surgery* 1994; 18(4): 559–568.
206. Tisell LE, Nilsson B, Molne J, et al. Improved survival of patients with papillary thyroid cancer after surgical microdissection. *World J Surg* 1996;20(7):854–859.
207. Ito Y, Jikuzono T, Higashiyama T, et al. Clinical significance of lymph node metastasis of thyroid papillary carcinoma located in one lobe. *World J Surg* 2006;30(10):1821–1828.
208. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97(5):418–428.
209. Loh KC, Greenspan FS, Gee L, et al. Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(11):3553–3562.
210. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(11):1167–1214.
211. Barczyński M, Konturek A, Stopa M, Nowak W. Nodal recurrence in the lateral neck after total thyroidectomy with prophylactic central neck dissection for papillary thyroid cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2014;399(2):237–244.
212. Venkat R, Guerrero MA. Recent Advances in the Surgical Treatment of Differentiated Thyroid Cancer: A Comprehensive Review. *The Scientific World Journal* 2013;2013:425136.
213. Zaydfudim V, Feurer ID, Griffin MR, Phay JE. The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Surgery* 2008;144(6):1070–1078.
214. White ML, Gauger PG, Doherty GM. Central lymph node dissection in differentiated thyroid cancer. *World J Surg* 2007;31(5):895–904.
215. Carling T, Carty SE, Ciarleglio MM, et al. American Thyroid Association Surgical Affairs Committee American Thyroid Association design and feasibility of a prospective randomized controlled trial of prophylactic central lymph node dissection for papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2012;22(3):237–244.
216. Wada N, Masudo K, Nakayama H, et al. Clinical outcomes in older or younger patients with papillary thyroid carcinoma: impact of lymphadenopathy and patient age. *Eur J Surg Oncol* 2008;34(2):202–207.

217. Podnos YD, Smith D, Wagman LD, Ellenhorn JDI. The implication of lymph node metastasis on survival in patients with well-differentiated thyroid cancer. *American Surgeon*. 2005;71(9):731–734.
218. Barczyński M, Konturek A, Stopa M, Nowak W. Prophylactic central neck dissection for papillary thyroid cancer. *British Journal of Surgery* 2013;100(3):410–418.
219. Wang TS, Cheung K, Farrokhyar F, Roman SA, Sosa JA. A meta-analysis of the effect of prophylactic central compartment neck dissection on locoregional recurrence rates in patients with papillary thyroid cancer *Ann Surg Oncol* 2013;20(11):3477-3483.
220. Kim E, Park JS, Son KR, Kim JH, Jeon SJ, Na DG. Preoperative diagnosis of cervical metastatic lymph nodes in papillary thyroid carcinoma: comparison of ultrasound, computed tomography, and combined ultrasound with computed tomography. *Thyroid* 2008;18(4):411–418.
221. Kouvaraki MA, Shapiro SE, Fornage BD, et al. Role of preoperative ultrasonography in the surgical management of patients with thyroid cancer. *Surgery* 2003;134(6):946-954;discussion 954-955.
222. Wang TS, Evans DB, Fareau GG, Carroll T, Yen TWE. Effect of prophylactic central compartment neck dissection on serum thyroglobulin and recommendations for adjuvant radioactive iodine in patients with differentiated thyroid cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19(13):4217-4222.
223. Shindo M, Wu JC, Park EE, Tanzella F. The importance of central compartment elective lymph node excision in the staging and treatment of papillary thyroid cancer. *Archives of Otolaryngology* 2006;132(6): 650–654.
224. Liu LS, Liang J, Li JH, et al. The incidence and risk factors for central lymph node metastasis in cN0 papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. *EurArch Otorhinolaryncol* 2017;274(3):1327-1338.
225. Sywak M, Cornford L, Roach P, et al. Routine ipsilateral level VI lymphadenectomy reduces postoperative thyroglobulin levels in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2006;140:1000-1005; discussion 1005-1007.
226. So YK, Seo MY, Son YI. Prophylactic central lymph node dissection for clinically node-negative papillary thyroid microcarcinoma: influence on serum thyroglobulin level, recurrence rate, and postoperative complications. *Surgery* 2012;151(12):192-198.
227. Segal K, Friedental R, Lubin E, et al. Papillary carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113(4):356-363.
228. Zetoune T, Keutgen X, Buitrago D, et al. Prophylactic central neck dissection and local recurrence in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2010;17(12):3287-3293.
229. Shan CX, Zhang W, Jiang DZ, Zheng XM, Liu S, Qiu M. Routine central neck dissection in differentiated thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope* 2012;122(4):797-804.
230. Hughes DT, White ML, Miller BS, et al. Influence of prophylactic central lymph node dissection on postoperative thyroglobulin levels and radioiodine treatment in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2010; 148(6):1100-1106; discussion 1006-1007.
231. Alvarado R, Sywak MS, Delbridge L, Sidhu SB. Central lymph node dissection as a secondary procedure for papillary thyroid cancer: Is there added morbidity? *Surgery* 2009;145(5):514-518.
232. Shah MD, Harris LD, Nassif RG, Kim D, Eski S, Freeman JL. Efficacy and safety of central compartment neck dissection for recurrent thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;138(1):33–37
233. Machens A, Hinze R, Thomusch O, Dralle H. Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer. *World Journal of Surgery* 2002;26(1):22–28.
234. Gimm O, Rath FW, Dralle H. Pattern of lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *British Journal of Surgery* 1998;85(2):252–254.
235. Noguchi S, Noguchi A, Murakami N. Papillary carcinoma of the thyroid. I. Developing pattern of metastasis. *Cancer* 1970;26(5):1053–1060.

236. Sivanandan R, Soo KC. Pattern of cervical lymph node metastases from papillary carcinoma of the thyroid. *British Journal of Surgery* 2001;88(9):1241–1244.
237. Lee YS, Kim SW, Kim SW, et al. Extent of routine central lymph node dissection with small papillary thyroid carcinoma. *World Journal of Surgery* 2007;31(10):1954–1959.
238. Son YI, Jeong HS, Baek CH, et al. Extent of prophylactic lymph node dissection in the central neck area of the patients with papillary thyroid carcinoma: comparison of limited versus comprehensive lymph node dissection in a 2-year safety study. *Annals of Surgical Oncology* 2008;15(7):2020–2026.
239. Koo BS, Choi EC, Yoon YH, Kim DH, Kim EH, Lim YC. Predictive factors for ipsilateral or contralateral central lymph node metastasis in unilateral papillary thyroid carcinoma. *Annals of Surgery* 2009;249(5):840–844.
240. Koo BS, Choi EC, Park YH, Kim EH, Lim YC. Occult contralateral central lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma with unilateral lymph node metastasis in the lateral neck. *J Am Coll Surg* 2010;210(6):895-900.
241. Kupferman ME, Patterson M, Mandel SJ, LiVolsi V, Weber RS. Patterns of lateral neck metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Archives of Otolaryngology* 2004;130(7):857–860.
242. Coatesworth AP, MacLennan K. Cervical metastasis in papillary carcinoma of the thyroid: a histopathological study. *Int J Clin Pract* 2002;56(4):241–242.
243. Ducci M, Appetecchia M, Marzetti M. Neck dissection for surgical treatment of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1997;16(3):333–335.
244. Lee YS, Shin SC, Lim YS, et al. Tumor location-dependent skip lateral cervical lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *Head Neck* 2014;36(6):887–891.
245. Viola D, Materazzi G, Valerio L, et al. Prophylactic central compartment lymph node dissection in papillary thyroid carcinoma: clinical implications derived from the first prospective randomized controlled single institution study. *J Clin Endocrinol Metabol* 2015;100(4):1316-1324.
246. Soto AM, Sonnenschein C. The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2011;33(5):332-340.
247. Brash D, Cairns J. The mysterious steps in carcinogenesis. *Br J Cancer* 2009;101(3):379-380.
248. Boveri T. *The Origin of Malignant Tumors*. Williams & Wilkins; Baltimore, MD: 1929. pp. 62–63.
249. Rosenfeld S. Are the somatic mutation and tissue organization field theories of carcinogenesis incompatible? *Cancer Inform* 2013;12:221-229.
250. Versteeg R. Cancer: Tumours outside the mutation box. *Nature* 2014;506(7489):438-439.
251. Mack SC, Witt H, Piro RM, et al. Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* 2014;506(7489):445-450.
252. Brücher BL, Jamall IS. Somatic Mutation Theory - Why it's Wrong for Most Cancers. *Cell Physiol Biochem* 2016;38(5):1663-1680.
253. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, et al.: Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet* 2012;44(6):651-658.
254. Forsberg LA, Absher D, Dumanski JP: Non-heritable genetics of human disease: spotlight on post-zygotic genetic variation acquired during lifetime. *J Med Genet* 2013;50(1):1-10.
255. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature reviews Genetics* 2013;14(10):703-718.
256. Sigston EAW, Williams BRG. An Emergence Framework of Carcinogenesis. *Front Oncol* 2017;7:198.
257. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research* 2017;7(5):1016-1036.

258. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; 26(22):3279-3290.
259. Omerovic J, Laude AJ, Prior IA. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(19-20):2575–8259.
260. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1177-11795.
261. Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases *SciSTKE*.2004; 2004(250):RE13.
262. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005;118 (Pt5):843–846.
263. Wittinghofer A, Nassar N. How Ras-related proteins talk to their effectors *Trends Biochem Sci* 1996; 21(12):488-491.
264. Romero F. Aiolos transcription factor controls cell death in Tcells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization *EMBO J* 1999;18(12):3419-3430.
265. Singh A, Sowjanya AP, Ramakrishna G. The wild-type Ras: road ahead *FASEB J* 2005;19(2):161-169.
266. Gysin S, Salt M, Young A, McCormick F. Therapeutic Strategies for Targeting Ras Proteins. Santos E, ed. *Genes Cancer* 2011;2(3):359-372.
267. Appels NM, Beijnen JH, Schellens JH. Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. *Oncologist* 2005;10(8):565-5678.
268. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008;9(7):517-531.
269. Downward J. The GRB2/Sem-5 adaptor protein *FEBS Lett* 1994;338(2):113-117.
270. Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling *Cell Signal* 2000;12(3):123-133.
271. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(Database issue): D945-950.
272. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research* 2012;72(10):2457-2467.
273. Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, Martin-Zanca D, Barbacid M. Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 1985;315(6018): 382–385.
274. Barbacid M. ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest* 1990;20(3):225–235.
275. Tormanen VT, Pfeifer GP. Mapping of UV photoproducts within ras proto-oncogenes in UV-irradiated cells: correlation with mutations in human skin cancer. *Oncogene* 1992;7(9):1729–1736.
276. Seo KY, Jelinsky SA, Loechler EL. Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens. *Mutat Res* 2000;463(3):215–246.
277. Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res* 2005;65(12):5076–5083.
278. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10):733–744.
279. Porta M, Crous-Bou M, Wark PA, et al. Cigarette smoking and K-ras mutations in pancreas, lung and colorectal adenocarcinomas: etiopathogenic similarities, differences and paradoxes. *Mutat Res* 2009; 682(2-3):83–93.
280. Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991;93:125–131.

281. Henis YI, Hancock JF, Prior IA. Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review) *Mol Membr Biol* 2009; 26(1):80–92.
282. Mor A, Philips MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:771–800.
283. Rocks O, Peyker A, Bastiaens PI. Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18(4):351–357.
284. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature genetics* 2008;40(5):600-608.
285. Kreeger PK, Wang Y, Haigis KM, Lauffenburger DA. Integration of multiple signaling pathway activities resolves K-RAS/N-RAS mutation paradox in colon epithelial cell response to inflammatory cytokine stimulation. *Integr Biol (Camb)* 2010;2(4):202–208.
286. Burmer GC, Levine DS, Kulander BG, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. c-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology* 1990;99(2):416–420.
287. Howell GM, Hodak SP, Yip L: RAS Mutations in Thyroid Cancer. *Oncologist* 2013;18(8):926-932.
288. Liu RT, Hou CY, You HL, et al. Selective occurrence of ras mutations in benign and malignant thyroid follicular neoplasms in Taiwan. *Thyroid* 2004;14(8):616–621.
289. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J et al. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2745–2752.
290. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR rearrangement in thyroid tumors: Evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5):2318–2326.
291. Nikiforova MN, Nikiforov YE. In: *Molecular Testing of Thyroid FNA Samples*. Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LDR, eds. *Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins 2009:94–102.
292. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(10):569–580.
293. Gupta N, Dasyam A, Carty SE et al. RAS mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low risk follicular-pattern cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(5):E914-922.
294. Garcia-Rostan G, Tallini F, Herrero A, et al. Frequent mutation and nuclear localization of betacatenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59(8):1811–1815.
295. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, et al. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993; 91(1):179–184.
296. Gianoukakis AG, Giannelli SM, Salameh WA, et al. Well differentiated follicular thyroid neoplasia: Impact of molecular and technological advances on detection, monitoring and treatment. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332(1-2):9-20.
297. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892):949-954.
298. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63(7):1454–1457.
299. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(2):245–262.
300. Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(8):625–627.
301. Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Modern Pathology* 2011;24 Suppl 2:S34-43.

302. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006;30(2):216–222.
303. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5399–5404.
304. Begum S, Rosenbaum E, Henrique R, et al. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol* 2004;17(11):1359–1363.
305. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(9):4393–4397.
306. Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer* 2012;118(7):1764–1773.
307. Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(12):6373–6379.
308. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, et al. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(9):4197–4205.
309. Elisei R, Viola D, Torregrossa L, et al. The BRAF^{V600E} mutation is an independent, poor prognostic factor for the outcome of patients with low-risk intrathyroid papillary thyroid carcinoma: single-institution results from a large cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(12):4390–4398.
310. Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007;246(3):466–470.
311. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007;28(7):742–762.
312. Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2010;321(1):86–93.
313. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nature Communications*. 2014;5:4846.
314. Fusco A, Grieco M, Santoro M, et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* 1987;328(6126):170–172.
315. Wirtschafter A, Schmidt R, Rosen D, et al. Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope* 1997;107(1):95–100.
316. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60(4):557–5563.
317. Romei C, Elisei R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol* 2012;3:54.
318. Hamatani K, Eguchi H, Ito R, et al. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res* 2008;68(17):7176–7182.
319. Akiyama M, Ito T, Seyama T, et al. In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res* 1993;53(13):2940–2943.
320. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 1994;65(1):7–17.
321. Caudill CM, Zhu Z, Ciampi R, Stringer JR, Nikiforov YE. Dose-dependent generation of RET/PTC in human thyroid cells after in vitro exposure to gamma-radiation: a model of carcinogenic chromosomal rearrangement induced by ionizing radiation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(4):2364–2369.

322. Pierotti MA, Greco A. Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett* 2006; 232(1):90–98.
323. Greco A, Miranda C, Pierotti MA. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2010;321(1):44-49.
324. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* 2015;5(1):25–34.
325. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115(1):94-101.
326. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000;289(5483):1357-1360.
327. Gregory Powell J, Wang X, Allard BL, et al. The PAX8/PPARgamma fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARgamma inhibition. *Oncogene* 2004;23(20):3634-3641.
328. Giordano TJ, Au AY, Kuick R, Thomas DG, et al. Delineation, functional validation, and bioinformatic evaluation of gene expression in thyroid follicular carcinomas with the PAX8-PPARG translocation. *Clin Cancer Res* 2006;12(7 Pt 1):1983-1993.
329. Reddi HV, McIver B, Grebe SK, Eberhardt NL. The paired box-8/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma oncogene in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007;148(3):932-935.
330. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2318–2326.
331. French CA, Alexander EK, Cibas ES, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 2003;162(4):1053–1060.
332. Armstrong MJ, Yang H, Yip L, et al. PAX8/PPAR γ Rearrangement in Thyroid Nodules Predicts Follicular-Pattern Carcinomas, in Particular the Encapsulated Follicular Variant of Papillary Carcinoma. *Thyroid* 2014; 24(9):1369-1374.
333. Eberhardt NL, Grebe SKG, McIver B, Reddi HV. The Role of the PAX8/PPAR γ Fusion Oncogene in the Pathogenesis of Follicular Thyroid Cancer. *Molecular and cellular endocrinology* 2010;321(1):50-56.
334. Sobrinho Simoes M, Maximo V, Rocha AS, et al. Intragenic mutations in thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37:333–362.
- 335.** Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V. Expression of PAX8–PPAR γ 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3947–3952.
336. Xing M. Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway in Thyroid Cancer. *Thyroid* 2010;20(7):697-706.
337. Alonso-Gordoa T, Díez JJ, Durán M, Grande E. Advances in thyroid cancer treatment: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2015;7(1):22-38.
338. Hennige AM, Lammers R, Arlt D, et al. Ret oncogene signal transduction via a IRS-2/PI 3-kinase/PKB and a SHC/Grb-2 dependent pathway: possible implication for transforming activity in NIH3T3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2000;167(1-2):69-76.
339. Segouffin-Cariou C, Billaud M. Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem* 2000;275(5):3568-3576.
340. Miyagi E, Braga-Basaria M, Hardy E, et al. Chronic expression of RET/PTC 3 enhances basal and insulin-stimulated PI3 kinase/AKT signaling and increases IRS-2 expression in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Carcinog* 2004;41(2):98-107.

341. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* 2009;69(11):4885–4893.
342. Cassinelli G, Favini E, Degl'Innocenti D, et al. RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and beta-catenin nuclear translocation. *Neoplasia* 2009;11(1):10–21.
343. Tartari CJ, Donadoni C, Manieri E, et al. Dissection of the RET/beta-catenin interaction in the TPC1 thyroid cancer cell line. *Am J Cancer Res* 2011;1(6):716–725.
344. Castellone MD, De Falco V, Rao DM, et al. The beta-catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation. *Cancer Res* 2009;69(5):1867–1876.
345. Yang D, Wang C, Luo Y, et al. Activated E2F activity induces cell death in papillary thyroid carcinoma K1 cells with enhanced Wnt signaling. Samant R, ed. *PLoS ONE* 2017; 12(6):e0178908.
346. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149(6):1192-1205.
347. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(1):11-26.
348. Karunamurthy A, Panebianco F, Hsiao SJ, et al. Prevalence and phenotypic correlations of *EIF1AX* mutations in thyroid nodules. *Endocrine-related cancer* 2016;23(4):295-301.
349. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(18):6622-6626.
350. Alsina J, Alsina R, Gulec S. A Concise Atlas of Thyroid Cancer Next-Generation Sequencing Panel ThyroSeq v.2. *Molecular Imaging and Radionuclide Therapy* 2017; 26(Suppl 1):102-117.
351. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(15): 6021–6026.
352. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 2013; 339(6122):957–959.
353. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 2013; 339(6122):959–961.
354. Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20(4):603-610.
355. Landa I, Ganly I, Chan TA, et al. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013;98(9):E1562–E1566.
356. Alsina J, Alsina R, Gulec S. A Concise Atlas of Thyroid Cancer Next-Generation Sequencing Panel ThyroSeq v.2. *Molecular Imaging and Radionuclide Therapy* 2017;26(Suppl 1):102-117.
357. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, et al. ^{V600E}BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF–MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proct Natl Acad Sci USA* 2009;106(11): 4519-4524
358. Faam B, GhaffarI MA, Ghadiri A, Azizi F. Epigenetic modifications in human thyroid cancer. *Biomedical Reports*. 2015;3(1):3-8. 359 Hu S, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and *BRAF* mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 2006;119(10): 2322–2329.
360. Walker RA, Cowl J. The expression of c-fos protein in human breast. *J Pathol* 1991; 163(4): 323-327.

361. Wakita K, Ohyanagi H, Yamamoto K, Tokuhisa T, Saitoh Y. Overexpression of c-Ki-ras and c-fos in human pancreatic carcinomas. *Int J Pancreatol* 1992;11(1):43-47.
362. Riva P, Larizza L. Expression of c-sis and c-fos genes in human meningiomas and neurinomas. *Int J Cancer* 1992;51(6):873-877.
363. Yamanishi DT, Buckmeier JA, Meyskens FJ. Expression of c-jun, jun-B, and c-fos proto-oncogenes in human primary melanocytes and metastatic melanomas. *J Invest Dermatol* 1991;97(2):349-353.
364. Pinto A, Colletta G, Del VL, Rosati R, Attadia V, Cimino R, Colombatti A. c-fos oncogene expression in human hematopoietic malignancies is restricted to acute leukemias with monocytic phenotype and to subsets of B cell leukemias. *Blood* 1987;70(5):1450-1457.
365. Li S, Xu X, Xu X, et al. MicroRNA-490-5p inhibits proliferation of bladder cancer by targeting c-Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;441(4):976-981.
366. Ivanova MM, Luken KH, Zimmer AS et al. Tamoxifen increases nuclear respiratory factor 1 transcription by activating estrogen receptor β and AP-1 recruitment to adjacent promoter binding sites. *FASEB J* 2011;25(4):1402-1416.
367. Guo JC, Li J, Zhao YP, et al. Expression of c-fos was associated with clinicopathologic characteristics and prognosis in pancreatic cancer. *PLoS One* 2015;10(3):e0120332.
368. Mikula M, Gotzmann J, Fischer AN, Wolschek MF, et al. The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis *Oncogene* 2003; 22(43):6725-6738.
369. Oliveira-Ferrer L, Rößler K, Hausteiner V, et al. c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion. *British Journal of Cancer* 2014;110(3):753-763.
370. Zhou L, Zhang JS, Yu JC, Cui QC, Zhou WX, Kang WM, Ma ZQ. Negative association of c-fos expression as a favorable prognostic indicator in gastric cancer. *Archives of medical research* 2010;41(3):201–206.
371. Pruschy M, Shi YQ, Crompton NE, et al. The proto-oncogene c-fos mediates apoptosis in murine T-lymphocytes induced by ionizing radiation and dexamethasone. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241(2):519–524.
372. Bai L, Mao R, Wang J, et al. ERK1/2 promoted proliferation and inhibited apoptosis of human cervical cancer cells and regulated the expression of c-Fos and c-Jun proteins. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2015;32(3): 57.
373. Shi R, Peng H, Yuan X, et al. Down-regulation of c-fos by shRNA sensitizes adriamycin-resistant MCF-7/ADR cells to chemotherapeutic agents via P-glycoprotein inhibition and apoptosis augmentation. *J Cell Biochem* 2013;114(8):1890–1900.
374. Hong JH, Chiang CS, Sun JR, Withers HR, McBride WH. Induction of c-fos and junB mRNA following in vivo brain irradiation. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;48(2):223–228.
375. Martin M, Pinton P, Crechet F, Lefaix JL, Daburon F. Preferential induction of c-fos versus c-jun protooncogene during the immediate early response of pig skin to gamma-rays. *Cancer Res* 1993;53(14): 3246–3249.
376. Prasad AV, Mohan N, Chandrasekar B, Meltz ML. Induction of transcription of “immediate early genes” by low-dose ionizing radiation. *Rad Res* 1995;143(3):263–272.
377. Weichselbaum RR, Hallahan D, Fuks Z, Kufe D. Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30(1):229–234.
378. Miao GG, Curran T. Cell transformation by c-fos requires an extended period of expression and is independent of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1994;14(6):4295-4310.
379. ShaulianShaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001;20(19):2390-2400.

380. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M: AP-1 subunits: Quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 2004; 117 (Pt 25):5965-5973.
381. Ye N, Ding Y, Wild C, Shen Q, Zhou J. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1). *J Med Chem* 2014;57(16):6930-6948.
382. Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 1992;71(4):577-5786.
383. Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rütter U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 1992;360(6406):741-745.
384. Thomas DP, Sunter A, Gentry A, Grigoriadis AE. Inhibition of chondrocyte differentiation in vitro by constitutive and inducible overexpression of the c-fos proto-oncogene. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 3):439-450.
385. Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 1993;122(3):685-701.
386. Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* 2005; 41(16):2449-2461.
387. Bakin AV, Curran T. Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* 1999; 283(5400):387–390.
388. Hu E, Mueller E, Oliviero S, Papaioannou VE, Johnson R, Spiegelman BM. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J* 1994;13(13):3094–3103.
389. Fialka I, Schwarz H, Reichmann E, Oft M, Busslinger M, Beug H. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* 1996;132(6):1115–1132.
390. Volm M, Drings P, Wodrich W. Prognostic significance of the expression of c-fos, c-jun and c-erbB-1 oncogene products in human squamous cell lung carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119(9):507–510.
391. Bland KI, Konstadoulakis MM, Vezeridis MP, Wanebo HJ. Oncogene protein co-expression. Value of Ha-ras, c-myc, c-fos, and p53 as prognostic discriminants for breast carcinoma. *Ann Surg* 1995;221(6): 706–718.
392. Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, et al. C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology* 1998;55(6):556–563.
393. Jin SP, Kim JH, Kim MA, et al. Prognostic significance of loss of c-fos protein in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2007;13(4):284–289.
394. Singh A, Tong A, Ognoskie N, Meyer W, Nemunaitis J. Improved survival in patients with advanced colorectal carcinoma failing 5-fluorouracil who received irinotecan hydrochloride and have high intratumor C-fos expression. *Am J Clin Oncol* 1998;21(5):466–469.
395. Mahner S, Baasch C, Schwarz J, et al. C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2008;99(8):1269–1275.
396. Yan B, Broek RV, Saleh AD, Mehta A, Van Waes C, Chen Z. Signaling Networks of Activated Oncogenic and Altered Tumor Suppressor Genes in Head and Neck Cancer. *J Carcinog Mutagen* 2013; Suppl 7:4
397. Palcy S, Bolivar I, Goltzman D. Role of activator protein 1 transcriptional activity in the regulation of gene expression by transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2 in ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 2000;15(12):2352-2361.
398. Passequé E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 2001;20(19): 2401-2412.

399. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(2):241-257.
400. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 1995;82(5):721-732.
401. Ozanne BW, McGarry L, Spence HJ, et al. Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme. *Eur J Cancer* 2000; 36(13 Spec No):1640-1648.
402. Hennigan RF, Hawker KL, Ozanne BW. Fos-transformation activates genes associated with invasion. *Oncogene* 1994;9(12):3591-3600.
403. Lamb RF, Hennigan RF, Turnbull K, et al. AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol* 1997;17(2):963-976.
404. Jooss KU, Müller R. Deregulation of genes encoding microfilament-associated proteins during Fos-induced morphological transformation. *Oncogene* 1995;10(3):603-608.
405. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(21):11675-11680.
406. Fan Q, He M, Deng X, et al. Derepression of c-Fos caused by microRNA-139 down-regulation contributes to the metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Cell Biochem Funct* 2013;31(4):319-324.
407. Wang Q, Liu H, Wang Q, et al. Involvement of c-Fos in cell proliferation, migration, and invasion in osteosarcoma cells accompanied by altered expression of Wnt2 and Fzd9. Ahmad A, ed. *PLoS ONE* 2017; 12(6):e0180558.
408. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 2008;10(1):201.
409. Terrier P, Sheng ZM, Schlumberger M, et al. Structure and expression of c-myc and c-fos proto-oncogenes in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 1998;57(1):43-47.
410. Aasland R, Lillehaug JR, Male R et al. Expression of oncogenes in thyroid tumours: coexpression of c-erbB2/neu and c-erbB. *Br J Cancer* 1988;57(4):358-363.
411. Liu G, Takano T, Matsuzuka F, Higashiyama T, Kuma K, Amino N. Screening of specific changes in mRNAs in thyroid tumors by sequence specific differential display: decreased expression of c-fos mRNA in papillary carcinoma. *Endocr J* 1999;46(3):459-466.
412. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10): 749-758.
413. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 2009;137(3):413–431.
414. Hao Q, Cho WC. Battle Against Cancer: An Everlasting Saga of p53. Evans P, ed. *Int J Mol Sci* 2014; 15(12):22109-22127.
415. Rother K, Li YY, Tschöp K, et al. Expression of cyclin-dependent kinase subunit 1 (Cks1) is regulated during the cell cycle by a CDE/CHR tandem element and is downregulated by p53 but not by p63 or p73. *Cell Cycle* 2007;6(7):853-862.
416. St Clair S, Giono L, Varmeh-Ziaie S, et al. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol Cell* 2004;16(5):725-736.
417. Godar S, Ince TA, Bell GW, et al. Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression *Cell* 2008; 134(1):62–73.

418. Johnson RA, Ince TA, Scotto KW. Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *Biol Chem* 2001;276(29):27716–27720.
419. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol* 2015;21(1):84-93.
420. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol* 2014;4:285.
421. Christmann M, Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res* 2013;41(18):8403-8420.
422. Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer cell* 2009;16(5):369-377.
423. Budanov AV. The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism. *Subcell Biochem* 2014;85:337-358.
424. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389(6648):300-305.
425. Italiano D, Lena AM, Melino G, Candi E. Identification of NCF2/p67phox as a novel p53 target gene. *Cell Cycle* 2012; 11(24):4589-4596.
426. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine* 2005;11(12):1306-1313.
427. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358(6381):15-16.
428. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002;192(1):1-15.
429. Kenzelmann Broz D, Attardi LD. TRP53 activates a global autophagy program to promote tumor suppression. *Autophagy* 2013;9(9):1440-1442.
430. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8204-8209.
431. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 2008;10(6):676-687.
432. Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ* 2011;18(10):1598-1607.
433. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8204-8209.
434. Kenzelmann Broz D, Spano Mello S, Biegging KT, et al. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev* 2013;27(9):1016-1031.
435. Morselli E, Shen S, Ruckenstein C, et al. p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle* 2011;10(16):2763-2769.
436. Loayza-Puch F, Drost J, Rooijers K, Lopes R, Elkon R, Agami R. p53 induces transcriptional and translational programs to suppress cell proliferation and growth. *Genome Biol* 2013;14(4):R32.
437. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40(2):280-293.
438. Maddocks OD, Vousden KH. Metabolic regulation by p53. *J Mol Med (Berl)* 2011;89(3):237-245.
439. He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 2007;7(11):819-822.
440. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 2009;460(7254):529-533.

441. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 2007;17(15):1298-307.
442. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007;26(5):745-52.
443. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; 502(7471):333–339.
444. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* 2014;25(3):304-317.
445. Thukral S K, Lu Y, Blain GC, Harvey TS, Jacobsen VL. Discrimination of DNA binding sites by mutant p53 proteins. *Mol. Cell. Biol* 1995;15(9):5196–5202.
446. Chicas A, Molina P, Bargonetti J. Mutant p53 forms a complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279(2):383–390.
447. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 2001; 21(5):1874–1887.
448. Liu D P, Song H, Xu Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* 2010;29(7):949–956.
449. Bom AP, Rangel LP, Costa DC, et al. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer. *J Biol Chem* 2012; 287(33):28152–28162.
450. Xu J, Reumers J, Couceiro JR, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Bio* 2011;7(5):285–295.
451. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993;91(1):179–184.
452. Ito T, Seyama T, Mizuno T, et al. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 1992;52(5):1369–1371.
453. Xu B, Ghossein R. Genomic Landscape of poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Endocr Pathol* 2016;27(3):205-212.
454. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti M A. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1993;91(4): 1753–1760.
455. Pita JM, Figueiredo IF, Moura MM, Leite V, Cavaco BM. Cell cycle deregulation and TP53 and RAS mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(3):E497-507.
456. Gerber TS, Schad A, Hartmann N, Springer E, Zechner U, Musholt TJ. Targeted next-generation sequencing of cancer genes in poorly differentiated thyroid cancer. *Endocr Connect* 2018;7(1):47-55.
457. Sobrinho-Simões M, Máximo V, Rocha AS, et al. Intragenic mutations in thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37(2):333-362, viii.
458. Gauchotte G, Philippe C, Lacomme S, et al. BRAF, p53 and SOX2 in anaplastic thyroid carcinoma: evidence for multistep carcinogenesis. *Pathology* 2011;43(5):447-452.
459. Horie S, Maeta H, Endo K, Ueta T, Takashima K, Terada T. Overexpression of p53 protein and MDM2 in papillary carcinomas of the thyroid: Correlations with clinicopathologic features. *Pathol Int* 2001; 51(1):11-15.
460. La Perle KM, Jhiang SM, Capen CC. Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in ret/PTC1-induced thyroid carcinomas. *Am J Pathol* 2000;157(2):671–677.

461. Arciuch VGA, Russo MA, Dima M, et al. Thyrocyte-specific inactivation of p53 and Pten results in anaplastic thyroid carcinomas faithfully recapitulating human tumors. *Oncotarget* 2011;2(12):1109-1126.
462. McFadden DG, Vernon A, Santiago PM, et al. p53 constrains progression to anaplastic thyroid carcinoma in a Braf-mutant mouse model of papillary thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(16):E1600-E1609.
463. Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, Prinz RA, Xu X. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 2005; 103(11):2261-2268.
464. Wynford-Thomas D. Proliferative lifespan checkpoints: cell-type specificity and influence on tumour biology. *Eur J Cancer* 1997;33(5):716-726.
465. Shahedian B, Shi Y, Zou M, Farid NR. Thyroid carcinoma is characterized by genomic instability: evidence from p53 mutations. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001;72(2):155-163.
466. Liu D, Song H, Xu Y. A common Gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* 2010;29(7):949-956.
467. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted Next-Generation Sequencing Panel (ThyroSeq) for Detection of Mutations in Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1852-E1860.
468. Knijnenburg TA, Bismeyer T, Wessels LFA, Shmulevich I. A multilevel pan-cancer map links gene mutations to cancer hallmarks. *Chi J Cancer* 2015;34(10):439-449.
469. Zhao M, Wang KJ, Tan Z, Zheng CM, Liang Z, Zhao JQ. Identification of potential therapeutic targets for papillary thyroid carcinoma by bioinformatics analysis. *Oncology Letters* 2016;11(1):51-58.
470. Dwivedi SS, Khandeparkar SGS, Joshi AR, et al. Study of Immunohistochemical Markers (CK-19, CD-56, Ki-67, p53) in Differentiating Benign and Malignant Solitary Thyroid Nodules with special Reference to Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Diagn Res* 2016;10(12):EC14-EC19.
471. Shin MK, Kim JW, Min SK, et al. Associations of the BRAF (V600E) mutation and p53 protein expression with clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas patients. *Oncology Lett* 2015;10(3):1882-1888.
472. Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology* 1994; 24(3):205-210.
473. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 1996;73(2):139-143.
474. Park KY, Koh JM, Kim YI, et al. Prevalences of Gs alpha, ras, p53 mutations and ret/PTC rearrangement in differentiated thyroid tumours in a Korean population. *Clinical Endocrinol* 1998;49(3):317-323.
475. Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, Frasca F. p53 family proteins in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(1):43-60.
476. Morita N, Ikeda Y, Takami H. Clinical significance of p53 protein expression in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2008; 32(12):2617-2622.
477. Liu MC, Gelmann EP. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002;29(3):246-257.
478. Horie S, Maeta H, Endo K, et al (2001). Overexpression of p53 protein and MDM2 in papillary carcinomas of the thyroid: Correlations with clinicopathologic features. *Pathol Int* 2001;51(1):11-15.
479. Hosal SA, Apel RL, Freeman JL, et al. Immunohistochemical localization of p53 in human thyroid neoplasms: correlation with biological behavior. *Endocr Pathol* 1997;8(1):21-28.

480. Kim BS, Kang KH, Lim YA, Kim LS. Clinical significance of p53, Ki-67 and Galectin-3 expressions in papillary thyroid carcinoma. *J Korean Surg Soc* 2009;77(1):29-36.
481. Omar E, Madhavan M, Othman NH. Immunohistochemical localisation of RET and p53 mutant protein of thyroid lesions in a North-Eastern Malaysian population and its prognostic implications. *Pathology* 2004; 36(2):152-159.
482. Morita N, Ikeda Y, Takami H. Clinical significance of p53 protein expression in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2008;32(12):2617-2622.
483. Balta AZ, Filiz AI, Kurt Y, Sucullu I, Yucel E, Akin ML. Prognostic value of oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Med Oncol* 2012;29(2):734-741.
484. Jung TS, Kim K-S, Oh YL, Jung JH. p53, p21 and Bcl-2 protein expression and the clinical significance in papillary thyroid carcinoma. *J Korean Endo Soc* 2007;22:98-104.
485. Karlidag T, Cobanoglu B, Keles E, et al (2007). Expression of Bax, p53, and p27/kip in patients with papillary thyroid carcinoma with or without cervical nodal metastasis. *Am J Otolaryngol* 2007;28(1):31-36.
486. Zafon C, Obiols G, Castellvi J, et al. Clinical significance of RET/PTC and p53 protein expression in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 2007;50(2):225-231.
487. Manzella L, Stella S, Pennisi MS, et al. New Insights in Thyroid Cancer and p53 Family Proteins. *Int J Mol Sci* 2017;18(6):pii: E1325.
488. Frasca F, Rustighi A, Malaguarnera R, et al. HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells. *Cancer Res* 2006;66(6):2980–2989.
489. Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: Hubs of nuclear function. *Gene* 2001;277(1-2):63–81.
490. Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, et al. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett* 2004;574(1-3):1–8.
491. Chiappetta G, Valentino T, Vitiello M, et al. PATZ1 acts as a tumor suppressor in thyroid cancer via targeting p53-dependent genes involved in EMT and cell migration. *Oncotarget* 2015;6(7):5310–5323.
492. Zhang J, Cao M, Dong J, et al. ABRO1 suppresses tumorigenesis and regulates the DNA damage response by stabilizing p53. *Nat Commun* 2014;5:5059.
493. Stratford AL, Boelaert K, Tannahill LA, et al. Pituitary tumor transforming gene binding factor: a novel transforming gene in thyroid tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(7):4341-4349.
494. Read ML, Seed RI, Fong JC, et al. The PTTG1-binding factor (PBF/PTTG1IP) regulates p53 activity in thyroid cells. *Endocrinology* 2014; 155(4):1222-1234.
496. Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG. MDMX: from bench to bedside. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 3): 371-378.
495. Ma W, Zhao P, Zang L, Zhang K, Liao H, Hu Z. Tumour suppressive function of HUWE1 in thyroid cancer. *J Biosci* 2016;41(3):395-405.
497. Yang D, Zhang H, Hu X, Xin S, Duan Z. Abnormality of p16/p38MAPK/p53/Wipl pathway in papillary thyroid cancer. *Gland Surgery* 2012;1(1):33-38.
498. Sid B, Langlois B, Sartelet H, Bellon G, Dedieu S, Martiny L. Thrombospondin-1 enhances human thyroid carcinoma cell invasion through urokinase activity. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(9):1890-900.
499. Baxter RC. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer* 2014;14(5): 329-341.
500. Wang Y, He H, Li W, Phay J, Shen R, Yu L, Hancioglu B, de la Chapelle A. MYH9 binds to lncRNA gene PTCS2 and regulates FOXE1 in the 9q22 thyroid cancer risk locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(3): 474-479.
501. Li X, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Kandil E. The nuclear factor kappa-B signaling pathway as a therapeutic target against thyroid cancers. *Thyroid* 2013;23(2):209-218.

502. Pozdeyev N, Berlinberg A, Zhou Q, et al. Targeting the NF- κ B Pathway as a Combination Therapy for Advanced Thyroid Cancer. Dumont JE, ed. PLoS ONE 2015;10(8):e0134901.
503. Pacifico F, Mauro C, Barone C, et al. Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF-kappa B in human thyroid carcinomas. J Biol Chem 2004;279(52):54610-54619.
504. Kato Y, Ying h, Zhao L, Furuya F, Araki O, Willingham MC, Cheng SY. PPARgamma insufficiency promotes follicular thyroid carcinogenesis via activation of the nuclear factor kappaB signaling pathway. Oncogene 2006;25(19):2736-2747.
505. Palona I, Namba H, Mitsutake N, et al. BRAF^{V600E} promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kB activation. Endocrinology 2006;147(12): 5699-5707.
506. Du ZX, Zhang HY, Gao DX, Wang HQ, Li YJ, Liu GL. Significance of VEGF and NF- κ B expression in thyroid carcinoma. Chinese Journal of Clinical Oncology 2006;3:166–171.
507. Ab Mutalib NS, Othman SN, Mohamad Yusof A, Abdullah Suhaimi SN, Muhammad R, Jamal R. Integrated microRNA, gene expression and transcription factors signature in papillary thyroid cancer with lymph node metastasis. Peer J 2016;4:e2119.
508. Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A. Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. Nature 2001;414(6861):313-317.
509. Lv N, Shan Z, Gao Y, Guan H, Fan C, Wang H, Teng W. Twist1 regulates the epithelial-mesenchymal transition via the NF- κ B pathway in papillary thyroid carcinoma. Endocrine 2016;51(3):469-477.
510. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. Calcif Tissue Int 1981;33(4):349-351.
511. Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. J Cell Biochem 1994;56(3):357-366.
512. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev 1992;13(1):66-80.
513. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997;89(2):309-319.
514. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 1997;234(1):137-142.
515. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(7):3597-3602.
516. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998;93(2):165-176.
517. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 1997;390(6656):175-179.
518. Wong BR, Josien R, Lee SY, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J Exp Med 1997;186(12):2075-2080.
519. Walsh N, Alexander K, Manning C, et al. Activated Human T Cells Express Alternative mRNA Transcripts Encoding a Secreted Form of RANKL. Genes Immun 2013;14(5):336-345.
520. Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. Biochem Biophys Res Commun 2000;269(2):532–536.

521. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001; 142(4):1419–1426.
522. Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, et al. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2003;278(47):47217–47222.
523. Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314(4):1021–1027.
524. Mizuno A, Kanno T, Hoshi M. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2002;20(6):337-344.
525. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease *Trends in Molecular Medicine* 2006;12(1):17- 25.
526. Feige U. Osteoprotegerin. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2001;60(Suppl 3):iii81-iii84.
527. Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:21-30.
528. Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, et al. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol* 2002;130(2):338–44.
529. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142 (12):5050–5055.
530. Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port* 2011;36(3):209-218.
531. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(7):3540-3545.
532. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998;273(32):20551-20555.
533. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998;273(51):34120-34127.
534. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL–RANK–OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 2014;5:511.
535. Arron JR, Vologodskaja M, Wong BR, et al. A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation. *J Biol Chem* 2001;276(32):30011–30017.
536. Wong BR, Besser D, Kim N, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 1999;4(6):1041–1049.
537. Kim HJ, Zhang K, Zhang L, Ross FP, Teitelbaum SL, Faccio R. The Src family kinase, Lyn, suppresses osteoclastogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(7):2325–2330.
538. Luo J, Yang Z, Ma, Y, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat Med* 2016;22(5):539-546.
539. Ye H, Arron JR, Lamothe B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 2002 ;418(6896):443-447.
540. Wu H, Arron JR. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays* 2003;25(11):1096-105.
541. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397(6717):315–323.

542. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13(18):2412–2424.
543. Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, et al. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* 2000;192(10):1467–1478.
544. Knoop KA, Butler BR, Kumar N, Newberry RD, Williams IR. Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine. *Am J Pathol* 2011;179(4):1861–71.
545. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397(6717):315–23.
546. Mueller CG, Hess E. Emerging functions of RANKL in lymphoid tissues. *Front Immunol* 2012;3:261.
547. Kim NS, Kim HT, Kwon MC, et al. Survival and differentiation of mammary epithelial cells in mammary gland development require nuclear retention of Id2 due to RANK signaling. *Mol Cell Biol* 2011;31(23):4775–4788.
548. Green EA, Choi Y, Flavell RA. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 2002;16(2):183-191.
549. Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM. RANKL/RANK-beyond bones. *J Mol Med (Berl)* 2011; 89(7):647-656.
- 550.** Renema N, Navet B, Heymann M., Lezot F, Heymann D. RANK–RANKL signalling in cancer. *Biosci Rep* 2016;36(4): pii:e00366.
551. Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, et al. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 2010;468(7320):103–137.
552. Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature* 2010;468(7320):98-102.
553. Roux S, Amazit L, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Milgrom E, Mariette X. RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) and RANK ligand are expressed in giant cell tumors of bone. *Am J Clin Pathol* 2002;117(2):210-216.
554. Chawla S, Henshaw R, Seeger L, et al. Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14(9):901-908.
555. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440(7084):692–696.
556. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989 8(2):98-101.
557. Dougall WC. Molecular pathways: osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis. *Clin Cancer Res* 2012;18(2):326-335.
558. Shemanko CS, Cong Y, Forsyth A. What Is Breast in the Bone? Desiderio MA, ed. *Int J Mol Sci* 2016; 17(10):1764.
559. Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Rezzonico R, Euller-Ziegler L, Rossi B. The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J* 2003;17(12):1751-1753.
560. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. Receptor Activator of NF-κB Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J Invest Dermatol* 2015;135(11):2884-2887.
561. Kim HH, Shin HS, Kwak HJ, et al. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J* 2003 17(14):2163–2165.

562. Kim YM, Kim YM, Lee YM, et al. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277(9):6799–6805.
563. Zhu YB, Xu L, Chen M, Ma HN, Lou F. GPR48 promotes multiple cancer cell proliferation via activation of Wnt signaling. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(8):4775-4778.
564. Liu J, Wei W, Guo CA, Han N, Pan JF, Fei T, Yan ZQ. Stat3 upregulates leucine-rich repeat-containing protein-coupled receptor 4 expression in osteosarcoma cells. *Biomed Res Int* 2013;2013:310691.
565. Luo JL, Tan W, Ricono JM, et al. Nuclear cytokine-activated IKK α controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 2007;446(7136):690-694.
566. Zhang I, Teng Y, Zhang Y, et al. C-Src-mediated RANKL-induced breast cancer cell migration by activation of the ERK and Akt pathway. *Oncology Lett* 2012;3(2):395-400.
567. Chen LM, Kuo CH, Lai TY, et al. RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *J Cell Biochem* 2011;112(3):933-941.
568. Wang J, Liu Y, Wang L, Sun X, Wang Y. Clinical prognostic significance and pro-metastatic activity of RANK/RANKL via the AKT pathway in endometrial cancer. *Oncotarget* 2016;7(5):5564-5575.
569. Julien S, Puig I, Caretti E, et al. Activation of NF- κ B by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene* 2007;26(53):7445–7456.
570. Kurrey NK, K A, Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol Oncol* 2005;97(1):155–165.
571. Moody SE, Perez D, Pan TC, et al. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 2005;8(3):197–209.
572. Fang DX, Hawke D, Zheng YH, et al. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 2007;282:11221–11229.
573. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 2006;107(2):289-298.
574. Zhang X, Song Y, Song N, et al. Rankl expression predicts poor prognosis in gastric cancer patients: results from a retrospective and single-center analysis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2018;51(3):e6265.
575. Mikami S, Katsube K, Oya M, et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J Pathol* 2009;218(4):530-539.
576. Lee J.A. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatric Blood & Cancer* 2011;56(5):738–743.
577. Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, et al. Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Expression in Primary Tumors Associates with Bone Metastasis Occurrence in Breast Cancer Patients. Dent P, ed. *PLoS ONE* 2011; 6(4):e19234.
578. Bhatia P, Sanders MM, Hansen MF. Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2005;11(1):162-165.
579. Timotheadou E, Kalogeras KT, Koliou GA, et al. Evaluation of the Prognostic Value of RANK, OPG, and RANKL mRNA Expression in Early Breast Cancer Patients Treated with Anthracycline-Based Adjuvant Chemotherapy. *Transl Oncol* 2017;10(4):589-598.
580. Papanastasiou AD, Sirinian C, Kalofonos HP. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor- κ B isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res* 2012;14(4):R112.

581. Cheng ML, Fong L. Effects of RANKL-Targeted Therapy in Immunity and Cancer. *Front Oncol* 2013;3:329.
582. Goswami S, Sharma-Walia N. Osteoprotegerin rich tumor microenvironment: implications in breast cancer. *Oncotarget* 2016;7(27):42777-42791.
583. Bergh JJ, Xu Y, Farach-Carson MC. Osteoprotegerin expression and secretion are regulated by calcium influx through the L-type voltage-sensitive calcium channel. *Endocrinology* 2004;145(1):426-346.
584. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002; 169(6):3353-3362.
585. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 2005;146(4):1991-1998.
586. Pérez de Ciriza C, Lawrie A, Varo N. Osteoprotegerin in Cardiometabolic Disorders. *Int J Endocrinol* 2015;2015:564934.
587. Holen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clinical Science* 2006;110(3):279-291.
588. Tsukamoto S, Ishikawa T, Iida S, et al. Clinical Significance of Osteoprotegerin Expression in Human Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2444-2450.
589. Shi W, Qiu W, Wang W, et al. Osteoprotegerin is up-regulated in pancreatic cancers and correlates with cancer-associated new-onset diabetes. *Biosc Trends* 2014;8(6):322-326.
590. Oliver JL, Alexander MP, Norrod AG, Norrod AG, Mullins IM, Mullins DW. Differential expression and tumor necrosis factor-mediated regulation of TNFRSF11b/ osteoprotegerin production by human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26(4):571-579.
591. Park HS, Lee A, Cha BJ, Bae JS, Song BJ, Jung SS. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer. *J Surg Oncol* 2014;110(7):807-812.
592. Eaton CL, Wells JM, Holen I, Croucher PI, Hamdy FC. Serum osteoprotegerin (OPG) levels are associated with disease progression and response to androgen ablation in patients with prostate cancer. *Prostate* 2004;59(3):304-310.
593. Ito R, Nakayama H, Yoshida K, et al. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003;443(2):146-151.
594. Vik A, Brodin EE, Mathiesen EB, et al. Serum osteoprotegerin and future risk of cancer and cancer-related mortality in the general population: the Tromso study. *Eur J Epidemiol* 2015;30(3):219-230.
595. Zinonos I, Luo KW, Labrinidis A, et al. Pharmacologic inhibition of bone resorption prevents cancer-induced osteolysis but enhances soft tissue metastasis in a mouse model of osteolytic breast cancer. *Int J Oncol* 2014;45(2):532-540.
596. Lane D, Matte I, Laplante C, Garde-Granger P, Rancourt C, Piché A. Osteoprotegerin (OPG) activates integrin, focal adhesion kinase (FAK), and Akt signaling in ovarian cancer cells to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *J Ovarian Res* 2013;6(1):82.
597. Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, et al. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo—a role in tumour cell survival? *Breast Cancer Res Treat* 2005;92(3):207-215.
598. Zinonos I, Labrinidis A, Lee M, et al. Anticancer efficacy of Apo2L/TRAIL is retained in the presence of high and biologically active concentrations of osteoprotegerin in vivo. *J Bone Miner Res* 2011;26(3):630-43.

599. Vitovski S, Phillips JS, Sayers J, Croucher PJ. Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF- κ B or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. *J Biol Chem* 2007;282(43):31601–31609.
600. Rachner TD, Benad P, Rauner M, et al. Osteoprotegerin production by breast cancer cells is suppressed by dexamethasone and confers resistance against TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2009;108(1):106–116.
601. Bugler B, Caizergues-Ferrer M, Bouche G, Bourbon H, Amalric F. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur J Biochem* 1982;128(2-3):475-80.
602. Erard MS, Belenguer P, Caizergues-Ferrer M, Pantaloni A, Amalric F. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem* 1988;175(3):525-530.
603. Escande-Geraud ML, Azum MC, Tichadou JL, Gas N. Correlation between rDNA transcription and distribution of a 100 kD nucleolar protein in CHO cells. *Exp Cell Res* 1985;161(2):353-363.
604. Chen X, Kube DM, Cooper MJ, Davis PB. Cell surface nucleolin serves as receptor for DNA nanoparticles composed of pegylated polylysine and DNA. *Molecular therapy* 2008;16(2):333-342.
605. Hovanessian AG, Soundaramourty C, El Khoury D, Nondier I, Svab J, Krust B. Surface expressed nucleolin is constantly induced in tumor cells to mediate calcium-dependent ligand internalization. *PLoS ONE* 2010; 5(12):e15787.
606. Fogal V, Sugahara KN, Ruoslahti E, Christian S. Cell surface nucleolin antagonist causes endothelial cell apoptosis and normalization of tumor vasculature. *Angiogenesis* 2009;12(1):91-100.
607. Christian S, Pilch J, Akerman ME, Porkka K, Laakkonen P, Ruoslahti E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol* 2003;163(4):871-878.
608. Semenkovich CF, Ostlund RE Jr, Olson MO, Yang JW. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry* 1990;29(41):9708-9713.
609. Goswami S, Sharma-Walia N. Osteoprotegerin secreted by inflammatory and invasive breast cancer cells induces aneuploidy, cell proliferation and angiogenesis. *BMC Cancer* 2015;15:935.
610. Weichhaus M, Segaran P, Renaud A, Geerts D, Connelly L. Osteoprotegerin expression in triple-negative breast cancer cells promotes metastasis. *Cancer medicine* 2014;3(5):1112-1125.
611. Nybo M, Rasmussen LM. The capability of plasma osteoprotegerin as a predictor of cardiovascular disease: a systematic literature review. *Eur J Endocrinol* 2008;159(5):603–608.
612. Nybo M, Rasmussen LM. Heparin releases osteoprotegerin from vascular cells *in vitro* and *in vivo*. *Atherosclerosis* 2008;201(1):33-35.
613. Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol* 2005;204(2):714-723.
614. Cross SS, Yang Z, Brown NJ, et al. Osteoprotegerin (OPG)—a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *Int J Cancer* 2006;118(8):1901–1908.
615. Reid PE, Brown NJ, Holen I. Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact. *Molecular Cancer* 2009; 8:49.
616. McGonigle JS, Giachelli CM, Scatena M. Osteoprotegerin and RANKL differently regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis* 2009;12(1):35-46.
617. Benslimane-Ahmim Z, Poirier F, Delomenie C, et al. Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin. *Angiogenesis* 2013;16(3):575-93.

618. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hohen I. Osteoprotegerin induces cytoskeletal reorganization and activates FAK, Src, and ERK signaling in endothelial cells. *Eur J Haematol* 2010;85(1):26–35.
619. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3(6):673–682.
620. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271(22):12687–90.
621. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16(17):5386–5397.
622. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, et al. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer. Nat RevCancer* 2002;2(11):850-861.
623. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 2005;434(7029):88–93.
624. LeBlanc H.N., Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10(1):66–75.
625. Gong B., Almasan A. Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2000;278(3):747–752.
626. Sato K, Hida S, Takayanagi H, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 2001; 31(11):3138–3146.
627. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, et al. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999;163(2):920–926.
628. Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, et al. Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* 1999;11(9):664–672.
629. Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 1999; 163(10):5358–5366.
630. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, et al. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999;163(4):1906–1913.
631. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999;104(2):155–162.
632. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277(5327): 815–818.
633. Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 1997;7(9):693–696.
634. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277(5327):818–821.
635. Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, et al. Doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol* 2002;20(5):949–954.
636. Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 1997;416(3):329–334.
637. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273(23):14363-14367.
638. Song JH, Tse MC, Bellail A, et al. Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 2007;67(14):6946–6955.

639. Cordier SM, Papenfuss K, Walczak H. From biochemical principles of apoptosis induction by TRAIL to application in tumour therapy. *Results Probl Cell Diff* 2009;49:115-143.
640. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001; 276(23):20633–20640
641. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001; 104(5):791–800.
642. Ashkenazi A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest* 2008;118(6):1979-1990.
643. Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, et al. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ* 2008;15(4):762–772.
644. Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, de Jong S, Kruyt FAE. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ* 2013;20(7):858-868.
645. Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells. *Frontiers in Oncology* 2015;5:69.
631. Song JH, Tse MC, Bellail A, et al. Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 2007;67(14):6946–6955.
646. Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM, Jeremias I. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene* 2003;22(25):3842–3852.
647. Muhlenbeck F, Haas E, Schwenzer R, et al. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem* 1998; 273(49):33091–33098.
648. Hu WH, Johnson H, Shu HB. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* 1999;274(43):30603–30610.
649. Lin Y, Devin A, Cook A, et al. The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 2000;20(18):6638–6645.
650. Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J Biol Chem* 2007;282(39):28960–28970.
651. Park KJ, Lee SH, Lee CH, et al. Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;382(4):726–729.
652. Ventura JJ, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 2006;21(5):701–710.
653. Mahalingam D, Keane M, Pirianov G, Mehmet H, Samali A, Szegezdi E. Differential activation of JNK1 isoforms by TRAIL receptors modulate apoptosis of colon cancer cell lines. *Br J Cancer* 2009;100(9):1415–1424.
654. Lee MW, Park SC, Yang YG, et al. The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2002;512(1-3):313–318.
655. Son JK, Varadarajan S, Bratton SB. TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1. *Cell Death Differ* 2010;17(8):1288–1301.

656. Weldon CB, Parker AP, Patten D, et al. Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Int J Oncol* 2004;24(6):1473–1480.
657. Choo MK, Kawasaki N, Singhirunnusorn P, et al. Blockade of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 activity enhances TRAIL-induced apoptosis through activation of a caspase cascade. *Mol. Cancer Ther* 2006;5(12):2970–2976.
658. Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2005;4(4):668–676.
659. Shankar E, Sivaprasad U, Basu A. Protein kinase C epsilon confers resistance of MCF-7 cells to TRAIL by Akt-dependent activation of Hdm2 and downregulation of p53. *Oncogene* 2008;27(28):3957–3966.
660. Chen W, Wang X, Zhuang J, Zhang L, Lin Y. Induction of death receptor 5 and suppression of survivin contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis* 2007;28(10):2114–2121.
661. Zhang XD, Borrow JM, Zhang XY, Nguyen T, Hersey P. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene* 2003;22(19):2869–2881.
662. Vilimanovich U, Bumbasirevic V. TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(5):814–826.
663. Xu J, Zhou JY, Wei WZ, Wu GS. Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells. *PLoS ONE* 2010;5(4):e10226.
664. Azijli K, Yuvaraj S, Peppelenbosch MP, et al. Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3 dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells. *J Cell Sci* 2012;125 (Pt 19):4651–4661.
665. Song JJ, Kim JH, Sun BK, Alcalá MA Jr, Bartlett DL, Lee YJ. c-Cbl acts as a mediator of Src-induced activation of the PI3K-Akt signal transduction pathway during TRAIL treatment. *Cell Signal* 2010;22(3):377–385.
666. Cursi S, Rufini A, Stagni V, et al. Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J* 2006;25(9):1895–1905.
667. Van Schaeuybroeck S, Kelly DM, Kyula J, et al. Src and ADAM-17-mediated shedding of transforming growth factor-alpha is a mechanism of acute resistance to TRAIL. *Cancer Res* 2008;68(20):8312–8321.
668. Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, et al. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2006;25(56):7434–7439.
669. Zhou DH, Trauzold A, Roder C, Pan G, Zheng C, Kalthoff H. The potential molecular mechanism of overexpression of uPA, IL-8, MMP-7 and MMP-9 induced by TRAIL in pancreatic cancer cell. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7(2):201–209.
670. Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, et al. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 2005; 280(49): 40599–40608.
671. Sood SK, Balasubramanian S, Higham S, Fernando M, Harrison B. Osteoprotegerin (OPG) and related proteins (RANK, RANKL and TRAIL) in thyroid disease. *World J Surg* 2011;35(9):1984-92.
672. Heymann MF, Riet A, Le Goff B, Battaglia S, Paineau J, Heymann D. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Reg Pept* 2008;148(1-3):46-53.
673. Vuong HG, Altibi AMA, Abdelhamid AH, et al. The changing characteristics and molecular profiles of papillary thyroid carcinoma over time: a systematic review. *Oncotarget* 2017;8(6):10637-10649.

674. Zafon C, Díez JJ, Galofré JC, Cooper DS. Nodular Thyroid Disease and Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine. *European Thyroid Journal* 2017;6(2):65-74.
675. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol* 2008;36(6):425-437.
676. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med* 2012;367(8):705–715.
677. Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, et al. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(7):2743-2750.
678. Lithwick-Yanai G, Dromi N, Shtabsky A, et al. Multicentre validation of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. *Journal of Clinical Pathology* 2017;70(6):500-507.
679. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(11):3390–3397.
680. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(11):E1852-1860.
681. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, et al. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer* 2014;120(23):3627-3634.
682. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, et al. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid* 2015; 25(11): 1217-1223.
683. Alonso-Gordoa T, Díez JJ, Durán M, Grande E. Advances in thyroid cancer treatment: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 2015;7(1):22-38.
684. Liebner DA, Shah MH. Thyroid Cancer: Pathogenesis and Targeted Therapy. *Ther Adv Endocrinol Metabol* 2011;2(5):173-195.
685. Zhu X, Cheng S. Epigenetic Modifications: Novel Therapeutic Approach for Thyroid Cancer. *Endocrinology and Metabolism* 2017;32(3):326-331.
686. Brose MS, Nutting CM, Jarzab B, et al. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* 2014;384(9940):319–328.
687. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, et al. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med* 2015;372(7):621–630.
688. Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, et al. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med* 2013;368(7):623-632.
689. Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, et al. High Rate of BRAF and RET/PTC Dual Mutations Associated with Recurrent Papillary Thyroid Carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15(2):485-491.
690. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. Mutational Profile Of Advanced Primary and Metastatic Radioactive Iodine-Refractory Thyroid Cancers Reveals Distinct Pathogenetic Roles for BRAF, PIK3CA and AKT1. *Cancer research* 2009;69(11):4885-4893.

691. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association Between *BRAF* V600E Mutation and Recurrence of Papillary Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2015;33(1):42-50.
692. American Thyroid Association Surgery Working Group, American Association of Endocrine Surgeons, American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery; American Head and Neck Society, Carty SE, Cooper DS, Doherty GM, Duh QY, Kloos RT, Mandel SJ, Randolph GW, Stack BC Jr, Steward DL, Terris DJ, Thompson GB, Tufano RP, Tuttle RM and Udelsman R. Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1153–1158.
693. Νακοπούλου Λ. Κεφάλαιο 1: Γενικές Αρχές Ανοσοϊστοχημείας. Στο βιβλίο: Ανοσοϊστοχημεία. Μοριακοί Δείκτες στη Διαγνωστική Παθολογική Ανατομική και στην Πρόγνωση των Κακοηθών Νεοπλασμάτων. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1999.
694. Russmueller G, Moser D, Würger T, et al. Upregulation of osteoprotegerin expression correlates with bone invasion and predicts poor clinical outcome in oral cancer. *Oral Oncol* 2015;51:247-253.
695. Fountzilas G, Giannoulidou E, Alexopoulou Z, et al. TP53 mutations and protein immunopositivity may predict for poor outcome but also for trastuzumab benefit in patients with early breast cancer treated in the adjuvant setting. *Oncotarget* 2016;7(22):32731–32753 .
696. Jang BG, Kim WH: Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology*. 2011;78(6): 302–310.
697. Iakova P, Timchenko L, Timchenko NA: Intracellular signaling and hepatocellular carcinoma. *Seminars in Cancer Biology* 2011;21(1):28–34.
698. Marcello MA, Morari EC, Cunha LL, et al. P53 and Expression of Immunological Markers May Identify Early Stage Thyroid Tumors. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:846584.
699. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology* 2012;77(6):918–925.
700. Crescenzi A1, Fulciniti F2, Bongiovanni M3, Giovanella L4, Trimboli P5. Detecting N-RAS Q61R Mutated Thyroid Neoplasias by Immunohistochemistry. *Endocr Pathol* 2017;28(1):71-74.
701. Ning L, Rao W, Yu Y, et al. Association between the KRAS Gene Polymorphisms and Papillary Thyroid Carcinoma in a Chinese Han Population. *J Cancer* 2016;7(15):2420-2426.
702. Xing M. Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer. *BMC Med* 2016;14:12.
703. Kakarmath S, Heller HT, Alexander CA, et al. Clinical, Sonographic, and Pathologic Characteristics of RAS-positive versus BRAF-positive Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101(12):4938-4944.
704. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, et al. ras Mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3226–3235.
705. Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: Correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 2000;10(1): 19–23.
706. Hara H, Fulton N, Yashiro T, et al. N-ras mutation: An independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 1994;116(6):1010–1016.
707. Karga H, Lee JK, Vickery AL, et al. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:832–836.
708. Park JY, Kim WY, Hwang TS, et al. BRAF and RAS mutations in follicular variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocrine Pathology* 2013;24(2):69–76.
709. Medici M, Kwong N, Angell TE, et al. The variable phenotype and low-risk nature of RAS-positive thyroid nodules. *BMC Med* 2015;13:184.

710. Park JY, Yi JW, Park CH, et al. Role of BRAF and RAS Mutations in Extrathyroidal Extension in Papillary Thyroid Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2016;13(2):171-181.
711. Miller KA, Yeager N, Baker K, Liao XH, Refetoff S, Di Cristofano A. Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer Res* 2009; 69(8):3689–3694.
712. Jefferies MT, Cox AC, Shorning BY, et al. PTEN loss and activation of K-RAS and β -catenin cooperate to accelerate prostate tumourigenesis. *J Pathol* 2017;243(4):442-456.
713. Costa V, Esposito R, Pallante P, Ciccodicola A, Fusco A. The “next-generation” knowledge of papillary thyroid carcinoma. *Cell Cycle* 2015;14(13):2018-2021.
714. Lee JU, Huang S, Lee MH, et al. Dual specificity phosphatase 6 as a predictor of invasiveness in papillary thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 2012;167(1):93-101.
715. Qiu WH, Chen GY, Cui L, Zhang TM, Wei F, Yang Y. Identification of differential pathways in papillary thyroid carcinoma utilizing pathway co-expression analysis. *J BUON* 2016;21(6):1501-1509.
716. Casimiro S, Mohammad KS, Pires R, et al. RANKL/RANK/MMP-1 molecular triad contributes to the metastatic phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro. *PLoS ONE* 2013;8(5):e63153.
717. Sasaki A, Ishikawa K, Haraguchi N, et al. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis. *Ann Surg Oncol* 2007;14(3):1191–1199.
718. Lee JA, Jung JS, Kim DH, et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56(5):738–743.
719. Tan W, Zhang W, Strasner A, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 2011;470(7335):548-553.
720. Song FN, Duan M, Liu LZ, et al. RANKL Promotes Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells via NF- κ B-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. Guan X-Y, ed. *PLoS ONE* 2014;9(9):e108507.
721. Yamada T, Tsuda M., Takahashi T, Totsuka, Y., Shindoh M, Ohba Y. RANKL Expression Specifically Observed *in Vivo* Promotes Epithelial Mesenchymal Transition and Tumor Progression. *Am J Pathol* 2011; 178(6):2845-2856.
722. Tsiambas E, Ragos V, Georgakopoulos G, et al. E-cadherin/ α -catenin deregulated co-expression in thyroid carcinoma based on tissue microarray digital image analysis. *J BUON* 2016;21(2):450-455.
723. Owen S, Ye L, Sanders AJ, Mason MD, Jiang WG. Expression profile of receptor activator of nuclear- κ B (RANK), RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in breast cancer. *Anticancer Res* 2013;33(1):199-206.
724. Yao Q, Du J, Lin J, et al. Prognostic significance of TRAIL signalling molecules in cervical squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2016;69(2):122-127.
725. Toiyama D, Takaha N, Shinnoh M, et al. Significance of serum tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as a prognostic biomarker for renal cell carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology* 2013; 1(1):69-74.
726. Ahmad M, Shi Y. TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells: potential for herapeutic intervention. *Oncogene* 2000;19(30):3363-3371.
727. Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Stamenkovic I. Thyroid carcinoma cells are resistant to FAS-mediated apoptosis but sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000;60(15):4122-41299.
728. Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res* 2003;63(5):912-916.

729. Neville-Webbe HL, Cross NA, Eaton CL, et al. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2004;86(3):269–279.
730. Nyambo R, Cross N, Lippitt J, et al. Human bone marrow stromal cells protect prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *J Bone Miner Res* 2004;19(10):1712-1721.
731. Baud'huin M, Duplomb L, Téletchéa S, et al. Factor VIII-von Willebrand Factor Complex Inhibits Osteoclastogenesis and Controls Cell Survival. *J Biol Chem* 2009;284(46):31704-31713.
732. Tian Z, Xi H, Wang X, Feng S, Jia G. Study on the effect of integrin $\alpha\beta 6$ on the proliferation and apoptosis of thyroid carcinoma cells. *J BUON* 2017;22(3):704-708.
733. Hoogwater FJ, Nijkamp MW, Smakman N, et al. Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2010; 138(7):2357-2367.
734. Kuroda Y, Maruyama K, Fujii H, et al. Osteoprotegerin Regulates Pancreatic β -Cell Homeostasis upon Microbial Invasion. Heymann D, ed. *PLoS ONE* 2016;.11(1): e0146544
735. 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):141–154
736. Yuan J, Zhao G, Du J, Chen X, Lin X, Chen Z, Wu Z. To Identify Predictors of Central Lymph Node Metastasis in Patients with Clinically Node-Negative Conventional Papillary Thyroid Carcinoma. *Int J Endocrinol* 2016;2016:6109218.
736. Furlan JC, Bedard YC, Rosen IB. Significance of tumor capsular invasion in well-differentiated thyroid carcinomas. *Am Surg* 2007;73(5):484-491.
737. Spinelli C, Tognetti F, Strambi S, Morganti R, Massimino M, Collini P. Cervical Lymph Node Metastases of Papillary Thyroid Carcinoma, in the Central and Lateral Compartments, in Children and Adolescents: Predictive Factors. *World J Surg* 2018 Jan 30. doi: 10.1007/s00268-018-4487-z. [Epub ahead of print].
738. Woo CG, Sung CO, Choi YM, et al. Clinicopathological Significance of Minimal Extrathyroid Extension in Solitary Papillary Thyroid Carcinomas. *Annals of Surgical Oncology* 2015; 22 (Suppl 3): S728-733.
739. Shin JH, Ha TK, Park HK, et al. Implication of minimal extrathyroidal extension as a prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. *Int J Surg* 2013;11(9): 944-947.
740. Arora N, Turbendian HK, Scognamiglio T, et al. Extrathyroidal extension is not all equal: implications of macroscopic versus microscopic extent in papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 2008;144(6):942-947; discussion 947-948.
741. Radowsky JS, Howard RS, Burch HB, Stojadinovic A. Impact of degree of extrathyroidal extension of disease on papillary thyroid cancer outcome. *Thyroid* 2014;24(2):241-244.
742. Sun W, Lan X, Zhang H, et al. Risk Factors for Central Lymph Node Metastasis in CN0 Papillary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. Rosell R, ed. *PLoS ONE* 2015;10(10): e0139021.
743. Yin DT, Yu K, Lu RQ, Li X, Xu J, Lei M. Prognostic impact of minimal extrathyroidal extension in papillary thyroid carcinoma. Malhotra. G, ed. *Medicine* 2016;95(52):e5794.
744. Cady B. Basic principles in surgical oncology. *Arch Surg* 1997;132(4):338-346.