

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Lidija B. Todorović

**EKSPRESIJA I VARIJANTE GENA ZA
TUMORSKI SUPRESOR *VHL* U
PAPILARNIM KARCINOMIMA ŠTITASTE
ŽLEZDE**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Lidija B. Todorović

**EXPRESSION AND GENE VARIANTS OF
VHL TUMOUR SUPPRESSOR IN
PAPILLARY THYROID CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori

dr Boban Stanojević, viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča”

dr Goran Brajušković, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

dr Vesna Mandušić, viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča”

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” u okviru projekta „Molekularne determinante za dizajn tumor markera”. Disertacija je rezultat saradnje sa Institutom za onkologiju i radiologiju Srbije, Centrom za endokrinu hirurgiju Kliničkog centra Srbije (KCS) i „Atomic Bomb Disease Institute” Univerziteta u Nagasakiju.

Mentoru, dr Bobanu Stanojeviću, zahvaljujem se na ukazanom poverenju, velikoj podršci, entuzijazmu i pomoći u realizaciji doktorske disertacije.

Mentoru, prof. dr Goranu Brajuškoviću, zahvaljujem se na izdvojenom vremenu i korisnim savetima i sugestijama prilikom pisanja teze.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Vesni Mandušić, članu komisije, na podršci, strpljenju i stručnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i pisanja.

Prof. dr Bogomiru Dimitrijeviću zahvaljujem se na pruženoj šansi i podršci da se bavim istraživanjima u oblasti molekularne genetike malignih tumora.

Saradnicima iz Centra za endokrinu hirurgiju, posebno doc. dr Vladanu Živaljeviću i prof. dr Ivanu Paunoviću, prim. dr Vesni Božić iz Službe za patohistologiju KCS, kao i prof. dr Radanu Džodiću i njegovim saradnicima iz Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, zahvaljujem se na saradnji u prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka koji su analizirani u ovom radu.

Prof. dr Shunichiju Yamashiti i dr Vladimiru Saenku iz „Atomic Bomb Disease Institute” zahvaljujem se na pomoći koju su mi pružili u ključnim trenucima eksperimentalne izrade teze.

Prof. dr Veri Todorović dugujem zahvalnost za imunohistohemijsku analizu uzoraka.

Kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku hvala na drugarstvu i pozitivnoj atmosferi, koja mi je puno značila svih ovih godina.

Svojoj porodici se zahvaljujem za sve što su mi pružili i još uvek pružaju, za bezmernu ljubav, strpljenje i podršku.

Svojoj majci, Nadi, volela bih da mogu za mnogo toga da zahvalim, još jedan, poslednji put. U to ime, ovu doktorsku disertaciju posvećujem njoj. Znam koliko bi bila ponosna.

Ekspresija i varijante gena za tumorski supresor *VHL* u papilarnim karcinomima štitaste žlezde

Rezime

Papilarni karcinomi štitaste žlezde (PTC) predstavljaju najučestalije karcinome endokrinog porekla. Poslednjih decenija, incidenca ovih karcinoma je u stalnom porastu zbog čega je identifikacija molekularnih markera koji bi doprineli preciznijoj klasifikaciji bolesnika sa rizikom za progresiju bolesti, a u cilju izbora terapijskog pristupa, od izuzetnog kliničkog značaja. Gen *VHL* uključen je u tumorigenezu različitih tipova karcinoma i u mnogima od njih je povezan sa agresivnijim biološkim ponašanjem. Uloga i značaj *VHL* u patogenezi i progresiji PTC do sada nisu ispitivani. Predmet ove studije bio je ispitivanje nivoa ekspresije *VHL* u PTC. Ekspresioni profili *VHL* iRNK i proteina određeni su metodama PCR u realnom vremenu i imunohistohemijom. Istovremeno, ispitano je da li su mutacioni događaji u kodirajućoj sekvenci gena i regulacija koja se odvija na post-transkripcionom nivou a posredovana je miR-92a, odgovorni za detektovane različite nivoe ekspresije *VHL*. Sekvenciranjem sva tri egzona gena *VHL* nisu detektovane mutacione promene. Nivo ekspresije miR-92a, iako izmenjen, nije značajno korelisao sa nivoima ekspresije *VHL* iRNK i proteina. Ovi rezultati ukazuju na to da su za promene u ekspresiji *VHL* verovatno odgovorni neki drugi regulatorni mehanizmi. U odnosu na nivo ekspresije *VHL* iRNK u PTC i odgovarajućem neizmenjenom tireoidnom tkivu, utvrđeno je da postoje dve grupe bolesnika – oni sa sniženom i oni sa povišenom ekspresijom *VHL* u tumorskom tkivu. Detektovane promene ekspresionog profila *VHL* u korelaciji su sa kliničkim i patohistološkim parametrima PTC. Takođe, utvrđeno je da je niska ekspresija *VHL* iRNK povezana sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama koje ukazuju na agresivnije ponašanje tumora, kao i da je povezana sa kraćim trajanjem vremenskog perioda bez znakova bolesti. Rezultati ove studije sugerišu da bi evaluacija ekspresije *VHL* tumorskog supresora mogla imati klinički značaj u prognozi agresivnijeg toka bolesti kod bolesnika sa PTC.

Ključne reči: VHL gen, tumor supresor, mutacije, ekspresija, mikroRNK-92a, papilarni karcinom štitaste žlezde

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Expression and gene variants of *VHL* tumour suppressor in papillary thyroid carcinoma

Abstract

Papillary thyroid carcinomas (PTC) represent the most prevalent type of endocrine malignancy. Over the last decades their incidence has been increasing, underlining the significance of the identification of molecular markers which would improve the risk stratification and help optimize the therapeutic approach to PTC patients. While the *VHL* gene is implicated in tumorigenesis of different types of carcinoma and has been reported to be associated with more aggressive biological behavior, its importance in the pathogenesis and progression of PTC has not been explored so far. The subject of this study was to investigate the expression level of VHL in this type of carcinoma. The expression profiles of VHL mRNA and protein were determined using real time PCR and immunohistochemistry. In addition, it was investigated whether mutations in the coding sequence and post-transcriptional expression regulation mediated with miR-92a were responsible for VHL expression alterations detected in this study. No mutations were detected by sequencing of all three exons of the *VHL* gene. The expression level of miR-92a, although altered, did not show significant correlation with VHL mRNA and protein levels. These results suggest that probably some other regulatory mechanisms are responsible for VHL expression alterations. The analysis of *VHL* mRNA expression levels in PTC tissues compared to matched non-tumour tissues revealed that there were two groups of patients – patients with a decreased *VHL* expression level and patients with an increased expression level in tumour tissue. The detected VHL expression profile alterations were in correlation with PTC clinicopathological parameters. Moreover, low VHL expression was associated with more aggressive tumour features and with a shorter disease free interval. The results of this study suggest that evaluation of VHL tumor suppressor expression level might have significance in the prognosis of more aggressive course of the disease in PTC patients.

Key words: VHL gene, tumour suppressor, mutation, expression, microRNA-92a, papillary thyroid carcinoma

Scientific field: Biology

Special topic: Molecular biology

SKRAĆENICE

3'-UTR (engl. *3'-untranslated region*) – 3' netranslirajući region

Akt/PKB (engl. *Protein Kinase B*) – protein kinaza B

ATC (engl. *Anaplastic Thyroid Carcinoma*) – anaplastični tireoidni karcinom

bp – bazni par

BRAF – B-Raf proto-onkogen

ccRCC (engl. *Clear Cell Renal Cell Carcinoma*) – svetloćelijski karcinom bubrega

cDNK (engl. *complementary DNA*) – komplementarna DNK

DEPC (engl. *diethylpyrocarbonate*) – dietilpirokarbonat

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksiribonukleotid trifosfat

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina

FTC (engl. *Follicular Thyroid Carcinoma*) – folikularni tireoidni karcinom

GAPDH (engl. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*) – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GDP (engl. *Guanosine Diphosphate*) – guanozin-difosfat

GTP (engl. *Guanosine Triphosphate*) – guanozin-trifosfat

HIF- α (engl. *Hypoxia inducible factor α*) – hipoksijom indukovan faktor α

iRNK – informaciona RNK

MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) – mitogenom aktivirana protein kinaza

MTC (engl. *Medulary Thyroid Carcinoma*) – medularni tireoidni karcinom

miR-92a (engl. *microRNA-92a, miR-92a*) – mikroRNK-92a

PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) – lančana reakcija polimeraze

PI3K (engl. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) – fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaza

PPIA (engl. *peptidylprolyl isomerase A/cyclophilin A*) – peptidilprolil izomeraza A /ciklofilin A

PTC (engl. *Papillary Thyroid Carcinoma*) – papilarni karcinom tireoidee

pVHL – protein VHL

RAF (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma kinase*) – proto-onkogen za serin/treonin proteinske kinaze

RAS (engl. *Rat sarcoma*) – pacovski sarkoma onkogen

RET (engl. *Rearanged During Transfection*) – proto-onkogen za receptor tirozin kinaze

RNaza – ribonukleaza

RNK – ribonukleinska kiselina

RT – reverzna transkripcija

RT-qPCR (engl. *Reverse Transcription-Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu kojoj prethodi reverzna transkripcija

T3 – 3, 5, 3'-trijodtironin

T4 – 3, 5, 3', 5'-tetrajodtironin (tiroksin)

TNM (engl. *Tumour, Node, Metastasis*) – klasifikacija malignih tumora prema velični tumora (T), prisustvu metastaza u okolnim limfnim čvorovima (N) i udaljenim metastazama (M)

TRIS (engl. *tris hydroxymethyl aminomethane*) – tris hidroksimetil aminometan

VHL – von Hippel Lindau

WHO (engl. *World Health Organization*) – Svetska zdravstvena organizacija

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Štitasta žlezda: kratak pregled građe i funkcije	1
1.2.	Tumori štitaste žlezde	4
1.2.1.	Histološka klasifikacija malignih tumora štitaste žlezde.....	4
1.2.2.	Incidenca i mortalitet karcinoma štitaste žlezde.....	5
1.2.3.	Faktori rizika za razvoj karcinoma štitaste žlezde.....	7
1.3.	Papilarni karcinomi štitaste žlezde.....	8
1.3.1.	Citohistološke karakteristike i histopatološke varijante PTC.....	8
1.3.2.	Prognostički faktori za PTC	9
1.3.3.	Molekularno genetičke promene u osnovi PTC	13
1.4.	von Hippel–Lindau (<i>VHL</i>) tumorski supresor	16
1.4.1.	Otkriće gena <i>VHL</i>	16
1.4.2.	Struktura i ekspresija <i>VHL</i>	17
1.4.3.	Funkcija proteina <i>VHL</i>	18
1.4.4.	Uloga <i>VHL</i> u supresiji tumora	20
1.4.5.	Mutacione promene u genu <i>VHL</i>	21
1.4.6.	RNK interferencija	22
2.	CILJEVI RADA	25
3.	MATERIJAL I METODE	26
3.1.	Materijal.....	26
3.1.1.	Bolesnici i uzorci tkiva	26
3.2.	Metode	27
3.2.1.	Izolacija molekula DNK	27
3.2.2.	Izolacija molekula RNK	28
3.2.3.	Detekcija mutacija metodom sekvenciranja	30
3.2.4.	Određivanje nivoa ekspresije <i>VHL</i> iRNK i miR-92a	32
3.2.5.	Određivanje nivoa ekspresije proteina <i>VHL</i> korišćenjem imunohistohemijske metode	38
3.2.6.	Statistička obrada dobijenih rezultata	41
4.	REZULTATI	42

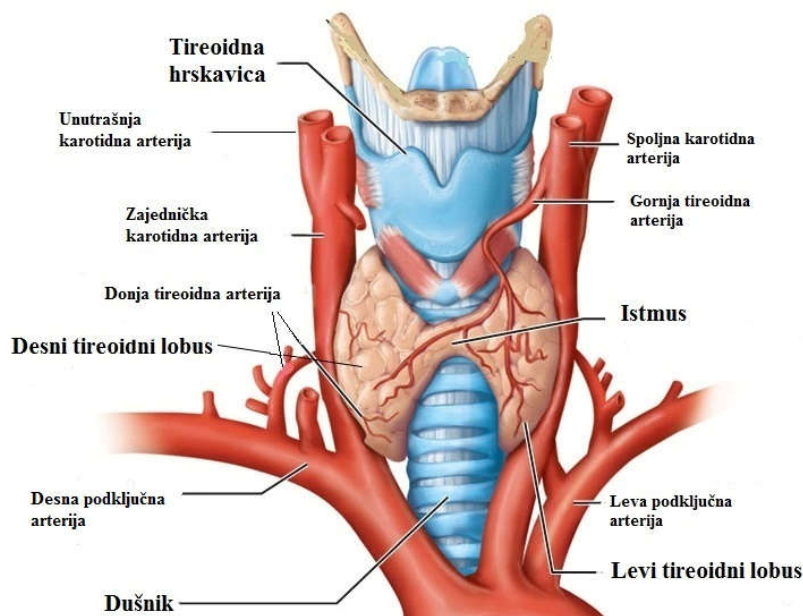
4.1. Analiza <i>VHL</i> u arhivskim uzorcima PTC	42
4.1.1. Karakteristike grupe bolesnika sa PTC u kojoj su analizirani arhivski uzorci tumora	42
4.1.2. Ekspresija <i>VHL</i> iRNK u tumorskom tkivu bolesnika sa PTC i njena asocijacija sa kliničko-patološkim parametrima.....	44
4.1.3. Asocijacija nivoa ekspresije <i>VHL</i> iRNK sa varijantama gena <i>BRAF</i> , <i>RAS</i> i <i>RET</i>	51
4.1.4. Rezultati logističke regresije.....	53
4.1.5. Asocijacija nivoa ekspresije <i>VHL</i> sa preživljavanjem bolesnika sa PTC.....	54
4.1.6. Analiza mutacionog statusa gena <i>VHL</i> u uzorcima PTC.....	55
4.2. Analiza nivoa ekspresije <i>VHL</i> u sveže zamrznutim uzorcima tkiva.....	57
4.2.1. Karakteristike grupe bolesnika sa PTC u kojoj su analizirani sveže zamrznuti uzorci tkiva	57
4.2.2. Nivo ekspresije <i>VHL</i> iRNK u tireoidnom tkivu bolesnika sa PTC i njena asocijacija sa kliničko-patološkim parametrima.....	59
4.3. Analiza ekspresije miR-92a u uzorcima PTC.....	63
4.3.1. Karakteristike grupe bolesnika sa PTC kod kojih je analizirana ekspresija miR-92a	63
4.3.2. Nivo ekspresije miR-92a kod bolesnika sa PTC i njena asocijacija sa kliničko-patološkim parametrima.....	65
4.4. Korelacija nivoa ekspresije <i>VHL</i> iRNK i nivoa ekspresije miR-92a u uzorcima PTC.....	70
4.5. Rezultati imunohistohemijskog određivanja nivoa ekspresije proteina <i>VHL</i>	72
5. DISKUSIJA	74
6. ZAKLJUČCI	88
7. LITERATURA	90

1. UVOD

1.1. Štitasta žlezda: kratak pregled građe i funkcije

Štitasta (tireoidna) žlezda ili tireoidea predstavlja jedan od najvažnijih endokrinih organa u organizmu. Njena osnovna funkcija je produkcija metaboličkih hormona tiroksina (T₄) i trijodtironina (T₃), koji kontrolišu brzinu metaboličkih procesa u skoro svim tkivima u organizmu (Stathatos 2016).

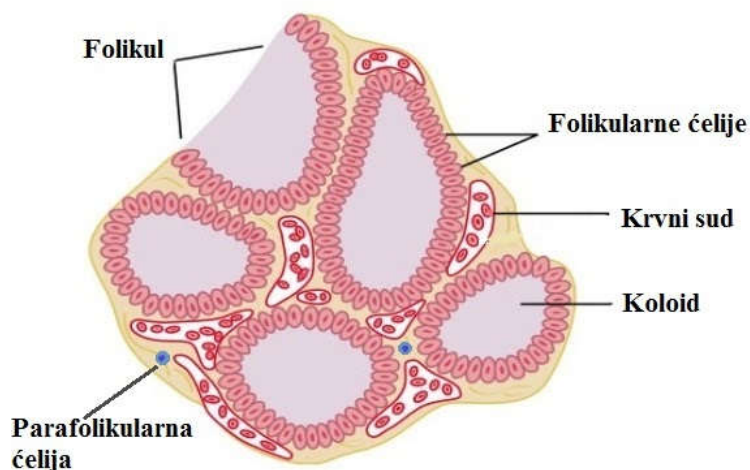
Tireoidea se nalazi na prednjem delu vrata uz dušnik (traheju) u nivou drugog i trećeg trahealnog prstena. Ime vodi poreklo od grčke reči "thyreos", što znači štit, a odnosi se na tireoidnu hrskavicu koja je deo skeleta grkljana i ima oblik štita. Sama tireoidea ima oblik leptira. Sastoji se iz dva režnja (lobusa), levog i desnog, koji su povezani tkivnim mostom (istmusom) (**Slika1.1**). Cela žlezda obavijena je fibroznom kapsulom a oko ove kapsule nalazi se još jedna, takozvana lažna kapsula, koja zapravo predstavlja pretrahealnu fasciju. Kod normalne tireoidee, levi i desni lobus su dugački 3–5 cm a široki oko 2–3cm (Stathatos 2016).



Slika 1.1. Anatomija štitaste žlezde. Preuzeto i modifikovano sa URL: <http://baldaivirtuves.info/human-anatomy-thyroid/human-anatomy-thyroid-thyroid-gland-anatomy-human-anatomy-free/>

Štitasta žlezda je dobro prokrvljena. Krv do žlezde dolazi preko gornjih i donjih tireoidnih arterija. Gornja tireoidna arterija predstavlja granu spoljašnje karotidne arterije. Donja tireoidna arterija predstavlja granu tireocervikalog stabla, koje se nastavlja na podključnu arteriju. Venski sistem čine gornja, srednja i donja vena (Stathatos 2016).

Osnovna funkcionalna jedinica tireoidee je tireoidni folikul (**Slika 1.2**). Tireoidni folikul se sastoji od jednog sloja epitelnih ćelija – tireocita, koje su odgovorne za sintezu hormona T_3 i T_4 . Sa spoljne strane, folikularni epitel je obavijen bazalnom membranom a sa unutrašnje strane (ka lumenu) nalazi se apikalna membrana. Lumen folikula ispunjen je koloidnim materijalom koji sadrži tireoglobulin – prekursorski i skladišni protein tireoidnih hormona. Između folikula je stroma sačinjena od krvnih sudova i vezivnog tkiva. Grupe od po 20–40 folikula obavijene su vezivnom septom. U tkivu štitaste žlezde nalaze se i parafolikularne ćelije – C ćelije. Ove ćelije su odgovorne za sintezu peptidnog hormona kalcitonina, koji ima ulogu u regulaciji nivoa kalcijuma u krvi (Stathatos 2016).



Slika 1.2. Histološki prikaz normalne tireoidee. Preuzeto i modifikovano sa URL: <http://learnanatomyphysiology.blogspot.com/2016/04/physiology-of-thyroid-gland-by-somya.html>

Hormoni štitaste žlezde, tiroksin i trijodtironin, su po svojoj strukturi jodirane aminokiseline. Da bi sintetisale ove hormone, folikularne ćelije aktivno koncentruju jodid iz cirkulacije uz pomoć natrijum-jodid simporter pumpe. U tireocitima, u

prisustvu vodonik peroksida, dolazi do oksidacije jodida pomoću enzima tireoidna peroksidaza. Jod se zatim uz pomoć jodinaze ugrađuje u tirozin, koji je inkorporiran u visokomolekularni glikoproteinski molekul – tireoglobulin (Tg), koji takođe biva sintetisan u tireocitima. Proces jodinacije tirozina i maturacije tireoglobulina odvija se na spoljašnjoj strani apikalne membrane. Tireoglobulin, koji u svojoj strukturi nosi nastale hormone, izlučuje se u lumen folikula i tu ostaje deponovan. U skladu sa potrebama organizma, pod uticajem tireostimulišućeg hormona (TSH) iz hipofize, tireoglobulin se pinocitozom vraća u tireocit i hidrolitički se razlaže pod dejstvom proteaza u lizozomima, a oslobođeni hormoni prelaze u cirkulaciju (Stathatos 2016). Tireoidni hormoni se vezuju za tireoidne receptore, koji su eksprimirani u većini ćelija u organizmu, utičući tako na sintezu velikog broja proteina koji su uključeni u osnovne energetske procese u njima. Tireoidni receptori spadaju u grupu jedarnih receptora, koji se vezuju direktno za molekul DNK ili se vezuju za druge regulatorne proteine transkripcije regulišući transkripciju ciljnih gena (Guyton i Hall 2006).

Osnovna funkcija tireoidnih hormona je pojačavanje bazalnog metabolizma ćelije. Osim povećanja nivoa sinteze proteina, pod njihovim dejstvom dolazi i do ubrzavanja katabolizma proteina. Takođe, pod uticajem tireoidnih hormona dolazi do stimulacije metabolizma ugljenih hidrata (glikolize, glukoneogeneze, usvajanje glukoze u gastrointestinalnom traktu, povećavanje sinteze insulina) i metabolizma masti (mobilizacija masti, oksidacija masnih kiselina, snižavanje koncentracije holesterola u plazmi). Pored toga što aktiviraju enzimske sisteme koji katalizuju oksidativne procese u mitohondrijama, u velikim dozama dovode i do bujanja mitohondrija (povećanje njihovog broja i aktivnosti). Povećanje metabolizma praćeno je povećanjem proizvodnje toplote u telu. U pogledu delovanja na organe, tireoidni hormoni između ostalog utiču na: cirkulaciju i rad srca; brzinu varenja hrane; kontrakciju mišića; nervni sistem tako što povećavaju razdražljivost i smanjuju reakciono vreme; sekreciju hormona drugih endokrinih žlezda (otpuštanje insulina iz pankreasa, parathormona iz paratireoidnih žlezda, adrenokortikotropnog hormona iz adenohipofize i glukokortikoida iz nadbubrežnih žlezda). Tireoidni hormoni su neophodni za rast, diferencijaciju i razviće, kao i za maturaciju, odn. za pravilan razvoj fetusa i dece (Guyton i Hall 2006).

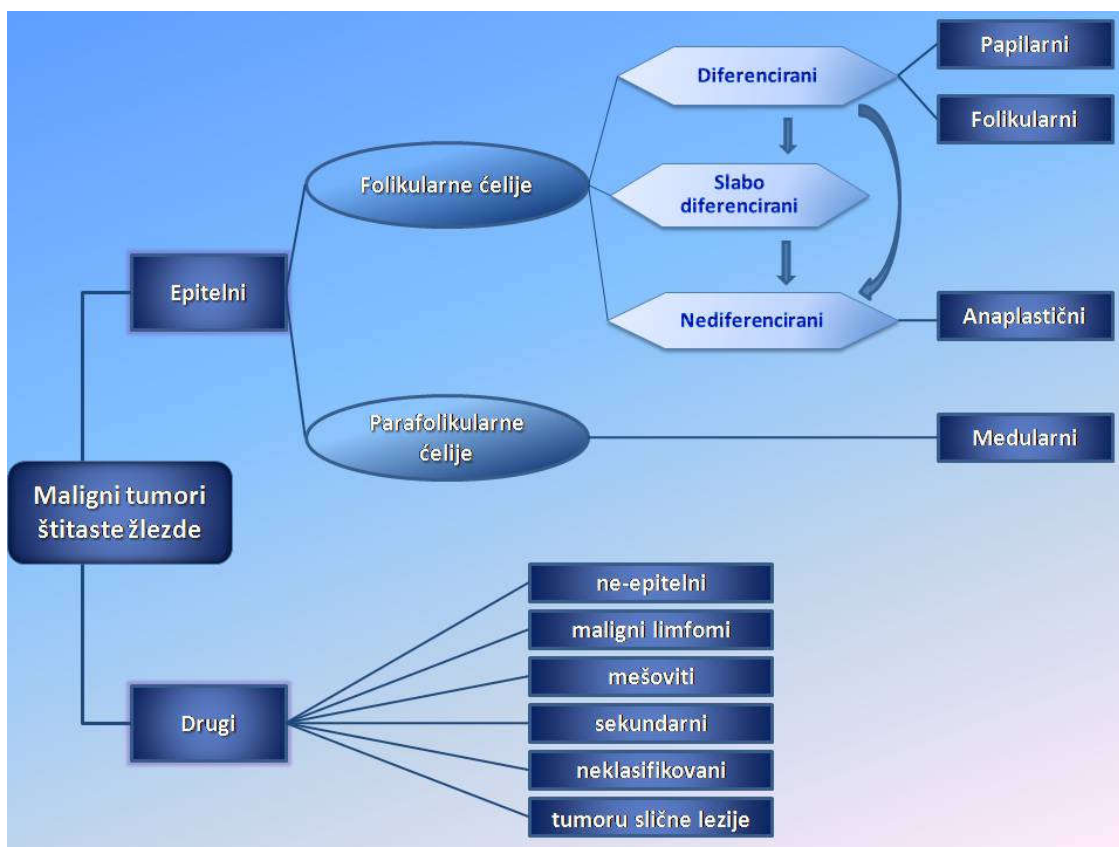
1.2. Tumori štitaste žlezde

Tumori štitaste žlezde se najčešće manifestuju u vidu čvorova (nodusa) ili otoka u predelu vrata. Tireoidni čvorovi detektuju se palpacijom u 4–7% adultne populacije, dok učestalost nodusa koji su slučajno otkriveni ultrazvučnim pregledom ukazuje na prevalencu od 19–67% ili čak do 76%. Tireoidni čvorovi predstavljaju kliničke manifestacije čitavog spektra oboljenja tireoidee, počev od neneoplastičnih kao što su gušavost i tireoiditis pa do neoplastičnih – benignih i malignih tumora. Nešto više od 5% svih tireoidnih nodusa ima maligni karakter (Welker i Orlov 2003; Popoveniuc i Jonklaas 2012).

Tireoidni tumori se odlikuju velikom morfološkom varijabilnošću, različitim biološkim ponašanjem i kliničkim manifestacijama. Osnovna podela je na benigne i maligne tumore. Najčešći benigni tumori zovu se folikularni adenomi, koji se javljaju u vidu kapsuliranih, solitarnih nodusa, bez znakova kapsularne i vaskularne invazije. Maligni tumori mogu biti epitelnog i neepitelnog porekla (Kato i sar. 2015).

1.2.1. Histološka klasifikacija malignih tumora štitaste žlezde

Epitelni maligni tumori – karcinomi štitaste žlezde čine većinu malignih tumora koji se javljaju u ovom organu. Oni se, prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation* – WHO), predstavljenoj na **slici 1.3**, dele na tumore koji vode poreklo od folikularnih ćelija i tumore koji vode poreklo od parafolikularnih ćelija. Najčešći histološki tipovi karcinoma koji nastaju od folikularnih ćelija su: papilarni tireoidni karcinom (engl. *Papillary Thyroid Carcinoma* – PTC), folikularni tireoidni karcinom (engl. *Follicular Thyroid Carcinoma* – FTC) i anaplastični tireoidni karcinom (engl. *Anaplastic Thyroid Carcinoma* – ATC). Od parafolikularnih ćelija nastaje medularni tireoidni karcinom (engl. *Medullary Thyroid Carcinoma* – MTC). Prema stepenu diferencijacije ćelija, PTC i FTC se klasifikuju kao dobro diferencirani tumori, dok je glavna karakteristika ATC odsustvo diferencijacije (DeLellis 2004). U pogledu diferencijacije, postoje još i slabo diferencirani tireoidni karcinomi (engl. *Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma* – PDTC) koji mogu nastati *de novo* ili iz dobro diferenciranih karcinoma, procesom dediferencijacije (Volante i sar. 2007; Nikiforov i Nikiforova 2011).



Slika 1.3. Klasifikacija malignih tumora tiroidee prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (DeLellis 2004).

1.2.2. Incidenca i mortalitet karcinoma štitaste žlezde

Karcinomi tiroidee spadaju u retke karcinome. Prema podacima za 2012. godinu, ovi karcinomi su činili 1,7% svih maligniteta globalno i zauzimali su 16. mesto po učestalosti među malignim bolestima sa oko 298.000 novih dijagnostikovanih slučajeva, i to 8. mesto kod žena a 18. mesto kod muškaraca (Stewart i Wild 2014; “Thyroid Cancer Statistics, Cancer Research UK” 2018). Međutim, njihova incidenca je poslednjih decenija u stalnom i značajnom porastu skoro svuda u svetu (Pellegriti i sar. 2013; Vigneri, Malandrino i Vigneri 2015; La Vecchia i sar. 2015). U SAD, incidenca karcinoma štitaste žlezde je porasla sa 4,85 slučajeva na 100.000 stanovnika, koliko je iznosila 1975. godine, na 15,03 slučajeva 2015. godine (Noone i sar. 2018). U Velikoj Britaniji, u intervalu 1993–2015. godine, incidenca je porasla sa 2 na 6 slučajeva na 100.000 stanovnika. Porast je zabeležen kod oba pola i u svim starosnim grupama (“Thyroid Cancer Statistics, Cancer Research UK” 2018). Značajno povećanje incidence karcinoma štitaste žlezde zabeleženo je i u Srbiji (“ECIS - European Cancer

Information System” 2018; Stanojevic i sar. 2011; Slijepcevic i sar. 2016). U periodu 1999–2008. godine incidenca ovih karcinoma imala je stabilan porast i kretala se od 1,4 do 3,2 slučaja na 100.000 stanovnika. Prosečna godišnja promena udela obolelih u ovom periodu za oba pola iznosila je +13,5%, pri čemu je najveća promena (+25,2%) zabeležena kod žena starosne dobi 20–29 godina (Slijepcevic i sar. 2016).

Porast incidence karcinoma tireoidee se delimično može objasniti senzitivnijim dijagnostičkim procedurama koje su omogućile detekciju malih, subkliničkih čvorova, koji imaju minimalan klinički značaj i koji bi inače ostali neprimećeni odnosno ne bi imali uticaj na zdravlje i preživljavanje obolele osobe, s obzirom na njihovu neagresivnu prirodu. Ovo je poznato kao fenomen “prekomerna dijagnostika” (engl. *overdiagnosis*). Neki stručnjaci smatraju da je zbog ovog porast incidence tireoidnih karcinoma samo prividan. Zabeleženo je, međutim, i povećanje incidence velikih čvorova, što se ne može u potpunosti objasniti samo napretkom u dijagnostici. Isto važi i za činjenicu da se porast incidence odnosi gotovo isključivo na papilarni histotip (A. Y. Chen, Jemal, i Ward 2009; Enewold i sar. 2009; Vigneri, Malandrino i Vigneri 2015). Sličan trend je utvrđen i u Srbiji. U periodu 1993–2008, registrovan je veći skok u incidenci tumora veličine 1–2 cm nego tumora koji su <1 cm (Stanojevic i sar. 2011). Po svoj prilici, povećana incidenca tireoidnih karcinoma posledica je kombinacije prividnog porasta usled senzitivnijih dijagnostičkih procedura i stvarnog porasta, koji bi mogao biti posledica povećane izloženosti zračenju i nekim drugim sredinskim faktorima sa kancerogenim efektom (Vigneri, Malandrino i Vigneri 2015).

Stopa mortaliteta od karcinoma štitaste žlezde je dosta niska, iznosi 0,5 slučajeva na 100.000 stanovnika godišnje i poslednjih decenija je ostala poprilično stabilna (“ECIS - European Cancer Information System” 2018; Noone i sar. 2018). Neki autori smatraju da i stopa mortaliteta raste, ali je to manje evidentno zbog indolentnog ponašanja većine tireoidnih karcinoma, koje će uticati na stopu mortaliteta tek mnogo godina kasnije. Takođe, postoji mogućnost da je eventualno povećanje mortaliteta kompenzovano napretkom u terapijskom pristupu (Pellegriti i sar. 2013; Vigneri, Malandrino i Vigneri 2015).

1.2.3. Faktori rizika za razvoj karcinoma štitaste žlezde

Faktori rizika koji se najčešće dovode u vezu sa pojavom karcinoma štitaste žlezde su izloženost jonizujućem zračenju, pol, starost, lična i porodična istorija bolesti.

Najbolje dokumentovan faktor rizika za karcinome tireoidee je izloženost jonizacionom zračenju. Rizik, naročito za PTC, veći je kod osoba koje su u ranoj mladosti izložene zračenju. Nakon nuklearne katastrofe u Černobilju došlo je do drastičnog povećanja incidence karcinoma tireoidee u populaciji ljudi koji su kao deca ili adolescenti bili izloženi tom prilikom visokim dozama radiaktivnog izotopa joda ^{131}I (Nikiforov 2006; Ron 2007; Williams 2008; Yamashita i sar. 2016). Kod ovih bolesnika posebno su dijagnostikovane difuzne sklerozirajuće forme papilarnog karcinoma.

Pol i godine života takođe predstavljaju značajne faktore rizika za pojavu karcinoma štitaste žlezde. Žene oboljevaju od PTC tri puta češće nego muškarci, pri čemu incidenca počinje da raste sa ulaskom u reproduktivni period a opada sa izlaskom iz njega, dok se kod muškaraca incidenca povećava sa godinama (Rahbari, Zhang i Kebebew 2010). Veća učestalost kod žena u reproduktivnom periodu se objašnjava uticajem reproduktivnih, menstrualnih i hormonskih faktora, kao što su produženo delovanje estrogena kod rane menarhe ili kasnijeg ulaska u menopauzu, prva trudnoća u poznijem reproduktivnom dobu itd. Sprovedene su brojne studije čija su istraživanja bila usmerena na ispitivanje reproduktivnih i hormonskih faktora ali su dobijeni rezultati nekonzistentni i često kontradiktorni (Caini i sar. 2015; Cao i sar. 2015; Zamora-Ros i sar. 2015; P. Wang i sar. 2015; Rahbari, Zhang i Kebebew 2010; Navarro Silvera, Miller i Rohan 2005). Iako je PTC češći kod žena, većina studija je pokazala da je muški pol asociran sa kraćim preživljavanjem i višom stopom mortaliteta. Što se tiče agresivnijih oblika karcinoma štitaste žlezde, MTC i ATC, oni imaju istu incidencu u oba pola (Rahbari, Zhang, i Kebebew 2010). Godine života su veoma važan faktor kada je u pitanju PTC. Kompletna klasifikacija stadijuma bolesti i prognoza bolesnika sa PTC zavisi od starosti (životne dobi). Karcinomi štitaste žlezde su retki kod dece dok se sa godinama povećava rizik od oboljevanja i od razvoja agresivnijih oblika tumora (Haymart 2009).

Prisustvo benignih tumora i/ili struma u štitastoj žlezdi takođe figurira kao faktor rizika za razvoj karcinoma u ovom organu (Franceschi i sar. 1999; Balasubramaniam i sar. 2012). Neke studije povezuju i autoimunski tireoiditis – Grejvsovu bolest ili Hašimoto tireoiditis – sa povišenim rizikom za razvoj diferenciranih karcinoma tireoidee (Pazaitou-Panayiotou, Michalakis, i Paschke 2012; Noureldine i Tufano 2015).

Neki karcinomi tireoidee mogu imati naslednu osnovu. Medularni karcinomi se u oko 25% slučajeva javljaju u naslednim formama. Familijarni medularni tireoidni karcinom se često javlja u okviru kompleksnog autozomno naslednog sindroma vezanog za maligne bolesti MEN2 (engl. *Multiple Endocrine Neoplasia syndrome*), koji je posledica germinativnih mutacija u proto-onkogenu *RET* (Vasen i Vermeij 1995; Elisei i sar. 2007; Metzger i Milas 2014). Veoma retko, i nemedularni tireoidni karcinomi mogu se javiti u okviru naslednih malignih tumora a u oko 3–10% slučajeva samostalno kao familijarni oblici. Genetička osnova familijarnih nemedularnih karcinoma je još uvek u znatnoj meri nepoznata (Mazeh i Sippel 2013; Nagy i Ringel 2015).

1.3. Papilarni karcinomi štitaste žlezde

Papilarni karcinomi štitaste žlezde predstavljaju dobro diferencirane karcinome koji vode poreklo od epitelnih ćelija tireoidnih folikula. PTC predstavljaju najučestalije karcinome štitaste žlezde čineći 80–85% svih tireoidnih maligniteta (Sipos i Mazzaferri 2010; Lim i sar. 2017; Noone i sar. 2018). Zabeleženi porast incidence karcinoma štitaste žlezde je u najvećoj meri upravo rezultat porasta incidence PTC (Davies i Welch 2006; Pellegriti i sar. 2013; Enewold i sar. 2009).

1.3.1. Citohistološke karakteristike i histopatološke varijante PTC

Na histološkom nivou, tipičan PTC se odlikuje izduženim i razgrananim papilarnim strukturama koje imaju fibrovaskularno (ili samo fibrozno) jezgro koje je obloženo jednim ili više slojeva epitelnih ćelija kubiodnog ili pravougaonog oblika, sa jedrima specifičnog izgleda. U odnosu na normalne folikularne ćelije, jedra malignih folikularnih ćelija su krupnija i ovalnijeg oblika. Hromatin je skoncentrisan uz jedarnu membranu, što daje jedru svetao, mlečno staklast (engl. *ground glass*) izgled. Na jedru se u većini slučajeva javljaju jedarni žljebovi, mada oni nisu isključivo karakterisitka

PTC jer se mogu sresti i kod benignih lezija. Još jedna karakteristika PTC jesu Psamoma telašca, koja predstavljaju kalcifikovane strukture sa koncentričnim lamelama i obično se nalaze u jezgru papila u tumorskoj stromi. Neki tumori sadrže multijedarne, gigantske ćelije (LiVolsi 2011).

Sve ove karakteristike su tipične za klasični PTC. Pored klasičnog histološkog podtipa – varijante (histovarijante), često se javlja i folikularna histološka varijanta PTC (20–30% svih PTC). Ova varijanta se odlikuje isključivo ili skoro isključivo folikularnom strukturom, bez jasno uočljivih papila. Folikuli su sačinjeni od ćelija čija jedra imaju karakteristike papilarnih karcinoma, mada značajno manje izražene, što sve zajedno čini ovu varijantu dosta teškom za diferencijalno dijagnostikovanje jer slične karakteristike pokazuju još i folikularni adenomi i folikularni tireoidni karcinomi. Pored klasične i folikularne varijante PTC, koje su najzastupljenije, postoje i druge histovarijante PTC, koje su dosta ređe. Neke od njih su: papilarni mikrokarcinom, inkapsulirana, visokoćelijska, kolumnarno ćelijska, dufuzno sklerotična, onkocitna, solidno ćelijska i trabekularna varijanta (Sak 2015).

1.3.2. Prognostički faktori za PTC

PTC generalno spada u neagresivne tumore i ima dosta dobru prognozu u pogledu preživljavanja. Neki bolesnici međutim imaju povećan rizik od recidiva i smrti kao posledice ove bolesti (Ortiz i Rodríguez 2001; Mazzaferri i Kloos 2001; Tuttle i sar. 2010). Brojne studije sprovedene su sa ciljem identifikacije kliničko-patoloških prediktora toka i ishoda bolesti među bolesnicima sa PTC. Rezultati ovih studija ukazali su na starost bolesnika, veličinu tumora, stepen ekstratireoidnog širenja, prisustvo limfnih nodalnih metastaza, prisustvo udaljenih metastaza i histološki podtip kao najznačajnije prognostičke faktore (Tuttle i sar. 2010).

Starost bolesnika je jedan od najvažnijih faktora u predikciji ishoda PTC. Starost veća od 45 godina (ili 40, prema nekim studijama) prilikom postavljanja dijagnoze, povezana je sa većom stopom smrtnosti koja dramatično raste kod bolesnika starijih od 60 godina. Stopa recidiva je povećana kod bolesnika starijih od 60 godina ali i kod bolesnika mlađe starosne dobi – mlađih od 20 godina odnosno 30 po drugim studijama (Tuttle i sar.

2010; Sipos i Mazzaferri 2010; Passler 2004; Ito, Miyauchi, Kihara, Higashiyama, i sar. 2014; Ito, Miyauchi, Kobayashi, i sar. 2014).

Iako je incidenca PTC nekoliko puta veća kod žena, muškarci – naročito starije životne dobi, imaju često lošiju prognozu. Rezultati različitih studija koji se tiču prognostičkog značaja pola su kontradiktorni i ukazuju da bi pol bolesnika mogao imati umeren prognostički značaj (Ito, Miyauchi, Kobayashi, i sar. 2014; Sipos i Mazzaferri 2010; Mazzaferri i Jhiang 1994). Veličina tumora je dobro dokumentovana kao značajan faktor rizika u mnogim studijama. Neke studije su utvrdile postojanje linearne korelacije između veličine tumora i rizika od pojave recidiva odnosno smrti kao posledice PTC (Hay 1990; Mazzaferri i Jhiang 1994). Tumori manji od 1 cm se zovu papilarni mikrokarcinomi i odlikuju se veoma niskim stopama recidiva i smrtnosti (Baudin i sar. 1998; Dideban i sar. 2016). Studija Ita i saradnika utvrdila je da PTC tumori veći od 2 cm pokazuju agresivnije biološke karakteristike od onih koji su manji, čak i u slučaju kada ni jedna druga visoko-rizična karakteristika nije prisutna (Ito i sar. 2012). Druge studije su utvrdile da je veličina tumora veća od 4 cm asocirana sa lošijom prognozom (Matsuzu i sar. 2014; Siironen i sar. 2005).

Ekstratireoidno širenje je lokoregionalno širenje tumora van kapsule tireoidne žlezde i može biti različitog stepena, od minimalne do masivne peritireoidne invazije. Dijagnostikuje se se u 10–30% bolesnika sa PTC (Sipos i Mazzaferri 2010). Ekstratireoidna lokalna invazija, čak i mikroskopska po nekim studijama, asocirana je sa povećanim stopama recidiva i smrtnosti od PTC (Mazzaferri i Jhiang 1994; Jukkola i sar. 2004; Siironen i sar. 2005; Ortiz i Rodríguez 2001). Druga istraživanja ukazuju da minimalno širenje nema veliki prognostički značaj, za razliku od većeg ekstratireoidnog širenja, koje može značajno uticati na prognozu (Ito, Miyauchi, Kihara, Kobayashi, i sar. 2014; Lin, Hsueh, i Chao 2016).

Prisustvo nodalnih metastaza se detektuje u više od 50% slučajeva PTC prilikom postavljanja dijagnoze. Klinički značaj limfnih nodalnih metastaza u PTC je već dugo predmet kontroverze (Sipos i Mazzaferri 2010). Brojne studije su utvrdile značajnu vezu između prisustva nodalnih metastaza i povećanog rizika za recidiv i/ili smanjene stope preživljavanja, dok druge nisu (Mazzaferri i Jhiang 1994; Podnos i sar. 2005; Jukkola i sar. 2004; Ortiz i Rodríguez, 2001; Siironen i sar. 2005; Hay i sar. 1993; Shaha, Loree i

Shah 1995). Neki autori predlažu da prognostički značaj nodalnih metastaza zavisi od godina života; da kod starijih bolesnika prisustvo nodalnih metastaza – naročito njihova veličina – ima veći značaj nego kod mlađih bolesnika, kod kojih je broj nodalnih metastaza – pre nego njihova veličina – asociran sa lošijom prognozom (Zaydfudim i sar. 2008; Ito, Miyauchi, Kihara, Kobayashi, i sar. 2014).

Udaljene metastaze su glavni uzrok smrti kod bolesnika sa PTC i predstavljaju najjači prediktor lošeg ishoda. Detektuju se u oko 5–10% slučajeva prilikom postavljanja dijagnoze. Oko polovine bolesnika sa udaljenim metastazama umire u narednih 5 godina. Glavni prediktori ishoda kod ovih bolesnika su starost, mesto pojave metastaza (najčešće pluća, kosti, ređe mozak) i sposobnost tumorskih ćelija da koncentruju ^{131}I , koji se primenjuje u terapiji (Sipos i Mazzaferri 2010; Tuttle i sar. 2010).

Navedeni faktori predstavljaju osnovu različitih gradirajućih sistema kao što su AMES (engl. *Age, Metastases, Extent and Size*) (Cady i Rossi 1988), MACIS (engl. *Metastasis, Age, Completeness, Invasion, and Size*) (Hay i sar. 1993) i TNM (engl. *Tumor, Node, Metastasis*) (Sobin, Gospodarowicz i Wittekind 2010), koji imaju za cilj klasifikaciju bolesnika u rizične grupe, što je od izuzetnog značaja za optimizaciju terapijskog pristupa. Među ovim sistemima, u najširoj upotrebi je TNM sistem, koji je podržan od strane organizacija *Union for International Cancer Control* (UICC) i *American Joint Commission on Cancer* (AJCC). Ovaj sistem gradira maligne lezije prema veličini i anatomskoj rasprostranjenosti primarnog tumora (parametar T), prisustvu/odsustvu limfnih nodalnih metastaza (parametar N) i prisustvu/odsustvu udaljenih metastaza (parametar M).

T klasifikacija primarnog tumora:

- Tx: veličina i rasprostranjenost primarnog tumora se ne mogu proceniti
- T0: nema dokaza o postojanju primarnog tumora
- T1: tumor manji od 2cm u najvećem promeru, ograničen na tireoideu
- T2: tumor veći od 2cm, a manji od 4cm u najvećem promeru, ograničen na tireoideu

- T3: svi tumori veći od 4cm, ali ograničeni na tireoideu ili svi tumori bez obzira na veličinu, ako postoji minimalno širenje van kapsule tireoidee (na peritireoidna meka tkiva i mišiće)
- T4: svi tumori, bez obzira na njihovu dimenziju, ukoliko se masivnije šire van kapsule tireoidee (zahvataju grkljan, dušnik, jednjak, povratni grkljanski nerv ili karotidnu arteriju)

N – regionalni limfni čvorovi

- Nx: regionalni limfni čvorovi ne mogu biti procenjeni
- N0: nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
- N1: prisutne metastaze u regionalnim limfnim čvorovima

M – udaljene metastaze

- Mx: postojanje udaljenih metastaza se ne može proceniti
- M0: nema udaljenih metastaza
- M1: postoje udaljene metastaze

Dodatni parametar koji su uzima u obzir prilikom klasifikacije bolesnika sa papilarnim tireoidnim karcinomima je starost odn. godine života. TNM klasifikacija PTC tumora je data u **tabeli 1.1.** (Sobin, Gospodarowicz i Wittekind 2010).

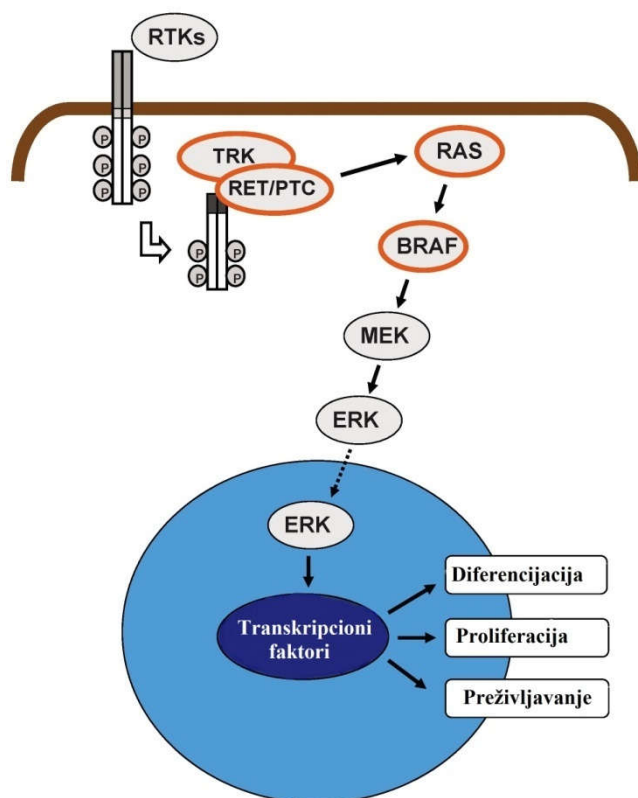
Tabela 1.1. Klinički stadijumi PTC tumora prema TNM klasifikaciji. Parametri T, N i M su opisani u tekstu.

Stadijum	Mlađi od 45 godina			Stariji od 45 godina		
	Bilo koji T	Bilo koji N	M0	T1	N0	M0
I	Bilo koji T	Bilo koji N	M0	T1	N0	M0
II	Bilo koji T	Bilo koji N	M1	T2 ili T3	N0	M0
III		-		T4	N0	M0
				Bilo koji T	N1	M0
IV		-		Bilo koji T	Bilo koji N	M1

Parametri T, N i M su opisani u tekstu.

1.3.3. Molekularno genetičke promene u osnovi PTC

Poslednjih godina, postignut je značajan napredak na polju saznanja o molekularno-genetičkim promenama koje leže u osnovi molekularne patogeneze PTC. Utvrđeno je da se u osnovi nastanka i razvoja PTC najčešće nalaze genetičke promene koje dovode do konstitutivne aktivacije signalnog puta MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinases*). Ovaj signalni put (**Slika 1.4**), sastavljen od niza adapterskih proteina i kinaza u citoplazmi, prenosi potentne mitogene signale i signale za preživljavanje ćelije sa membranskih receptora: receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću ili receptora koji su vezani sa G proteinima, do jedra. U jedru dolazi do regulacije transkripcije gena koji su uključeni u regulaciju ćelijske diferencijacije, proliferacije i preživljavanja (Xing 2013; Omur i Baran 2014).



Slika 1.4. RET-RAS-RAF-MAPK signalni put (modifikovano iz Nikiforov 2011).

U najčešće genetičke promene koje utiču na ovaj signalni put spadaju mutacije u genima *BRAF* i *RAS*, kao i genski rearanžmani *RET/PTC*. Ove promene se obično ne

javljaju zajedno u istom tumoru i zbirno gledano, u do 70% PTC je nađena jedna od njih (Kimura i sar. 2003; Soares i sar. 2003; Nikiforov 2008; Omur i Baran 2014).

Mutacije u genu *BRAF* su najčešće genetičke promene koje dovodi do aktivacije signalnog puta MAP kinaza. Nađene su u 29–69% PTC analiziranih u različitim studijama uključujući i jednu studiju u Srbiji, prvu tog tipa na prostoru Balkana, prema kojoj su mutacije u genu *BRAF* prisutne u 31,6% analiziranih PTC (Namba i sar. 2003; Kimura i sar. 2003; Soares i sar. 2003; Fukushima i sar. 2003; Y. Cohen i sar. 2003; Stanojevic i sar. 2011). Ove mutacije su karakteristične za PTC i imaju visoku prevalencu u tumorima koji pripadaju klasičnoj i visokoćelijskoj histološkoj varijanti dok su u folikularnoj histološkoj varijanti retke. Identifikovane su i u nekim slučajevima slabo diferenciranih i anaplastičnih karcinoma koji su kombinovani sa dobro diferenciranom PTC komponentom što govori u prilog tome da pojava ove mutacije predstavlja rani događaj u procesu neoplastične transformacije. Više od 95% mutacija u genu *BRAF* detektovanih u tireoidnim karcinomima su mutacija tipa transverzije timina u adenin na poziciji 1799 u egzonu 15 (T1799A), što rezultuje substitucijom aminokiseline valin glutaminskom kiselinom na poziciji 600 u aminokiselinskom lancu (V600E). Protein BRAF je član familije proteina RAF i predstavlja intraćelijsku serin-treonin kinazu koja biva aktivirana od strane proteina RAS, koji prenose signale sa receptora za faktore rasta koji se nalaze na ćelijskoj membrani. BRAF zatim fosforiliše i aktivira MEK (engl. *MAP-ERK kinase*), a to vodi aktivaciji nizvodnih efektorskih kinaza ovog signalnog puta nazvanih ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) i njihovoj translokaciji u jedro, gde ERK direktno fosforiliše veliki broj proteina koji regulišu transkripciju gena koji su uključeni u regulaciju ćelijske diferencijacije, proliferacije i preživljavanja. $BRAF^{V600E}$ dovodi do konformacione promene u proteinu koja omogućava kontinuiranu fosforilaciju MEK a sa tim i kontinuiranu signalizaciju ka jedru (Nikiforov 2008; Caronia, Phay i Shah 2011).

U oko 10% PTC tumora, mahom folikularne histovarijante, detektuju se mutacije u genima familije *RAS* (engl. *Rat sarcoma*) (Nikiforov 2008). U Srbiji, mutacije u genima *RAS* identifikovane su kod 4,1% analiziranih PTC (Stanojevic i sar. 2011). Gensku familiju *RAS* čine geni *H-*, *K-* i *N-RAS*. Ovi geni kodiraju za visoko srodne G proteine koji se nalaze na unutrašnjoj strani ćelijske membrane i primaju signale sa membranskih

– tirozin kinaznih i receptora združenih sa G proteinima. Ove signale dalje prenose duž MAPK i PI3K/AKT signalnih puteva do jedra. Aktivirajuće tačkaste mutacije u konzerviranim domenima gena *RAS* (kodon 12, 13 i 61) često se detektuju u različitim tipovima tumora. U većini ovih tumora, najčešće su mutacije u kodonima 12 i 13 gena *KRAS*. Nasuprot tome, u tireoidnim tumorima (predominantno u folikularnim karcinomima i adenomima) najčešće se detektuju mutacije u kodonu 61 gena *N-RAS* i *H-RAS*. U svom inaktivnom stanju, proteini RAS vezani su za GDP (guanozin difosfat). Nakon aktivacije dolazi do povećanja afiniteta za GTP (guanozin trifosfat) i njegovog vezivanja, što dalje vodi aktivaciji gore pomenutih signalnih puteva. RAS-GTP kompleks brzo prelazi u inaktivni, RAS-GDP kompleks, zahvaljujući autokatalitičkoj GTP-aznoj aktivnosti. Mutacije u kodonima 12 i 13 dovode do povećanja afiniteta za GTP dok mutacije u kodonu 61 dovode do gubitka autokatalitičke GTP-azne funkcije. U oba slučaja rezultat je permanentno aktivno stanje proteina RAS i konstitutivna aktivacija nishodnih ciljnih molekula (Nikiforov 2008; Howell, Hodak i Yip 2013).

Rearanžmani *RET/PTC* identifikovani su u oko 20% sporadičnih PTC kod odraslih osoba, dok su kod dece i adolescenata sa PTC češći (40–70%) (Nikiforov 2008). U Srbiji, ovi rearanžmani su identifikovani u 20,7% analiziranih PTC slučajeva (Stanojevic i sar. 2011). Ovi rearanžmani se često povezuju sa izloženošću jonizacionom zračenju – detektovani su kod 50–80% bolesnika sa PTC koji su imali istoriju izloženosti zračenju. Rearanžmani *RET/PTC* detektovani su takođe i u benignim lezijama tireoidee. Proto-onkogen *RET* (engl. *rearranged during transfection*) kodira za membranski receptor sa tirozin kinaznom aktivnošću. U tireoidei, *RET* je visoko ekspimiran u parafolikularnim ćelijama dok se u folikularnim ćelijama u neizmenjenim uslovima ne ekspimirira. U rearanžmanima *RET/PTC* dolazi do fuzije 3' kraja gena *RET* sa 5' krajem različitih, nesrodnih gena. 5' kraj tih gena nosi, pored aktivnog promotora, i sekvencu koja kodira za dimerizacioni domen, što rezultuje dimerizacijom nezavisnom od liganda i konstitutivnom tirozin kinaznom aktivnošću kinaze RET. Kinaza RET/PTC vezuje se za adapterske proteina GRB2 ili SOS a zatim aktivira RAS. Prijavljeno je preko 10 rearanžmana koji uključuju gen *RET*. U PTC, najučestaliji među njima su *RET/PTC1* i *RET/PTC3*, paracentrične inverzije u dugom kraku hromozoma 10, koje dovode do fuzije gena RET za gen *CCDC6* (engl. *coiled-coil domain-containing gene*

6) odnosno gen *NCOA4* (engl. *nuclear receptor coactivator 4*) (Knauf i sar. 2003; Nikiforov 2008; Nikiforov i Nikiforova 2011).

Tumorigeneza posredovana MAPK signalnim putem a indukovana *BRAF*^{V600E} mutacijom praćena je epigenetičkim izmenama kao što su hipo- i hipermetilacione promene širom genoma. One dovode do promena u ekspresiji velikog broja gena uključenih u važne metaboličke i ćelijske funkcije, što pojačava onkogenu aktivnost ovog signalnog puta (S. Hu i sar. 2006; Hou, Liu i Xing 2011).

Pored pomenutih mutacija i rearanžmana, koje su najčešće genetičke promene u papilarnim tireoidnim karcinomima, u mnogo manjem procentu detektovane su i mutacije i rearanžmani u drugima genima kao što su *TERT* (engl. *telomerase reverse transcriptase*) (Landa i sar. 2013; Qasem i sar. 2015) i *NTRK1* (engl. *neurotrophic receptor tyrosine kinase 1*) (Wajjwalku i sar. 1992).

Uprkos velikom napretku u identifikaciji genetičkih promena u karcinomima štitaste žlezde i fundamentalne uloge određenih signalnih puteva, oko 30–35% diferenciranih tireoidnih karcinoma nema ni jednu od opisanih genetičkih promena. Neophodna su dalja istraživanja koja bi identifikovala genetičku osnovu ovih karcinoma i doprinela boljem razumevanju njihove molekularne patogeneze (Xing 2013).

1.4. von Hippel–Lindau (*VHL*) tumorski supresor

1.4.1. Otkriće gena *VHL*

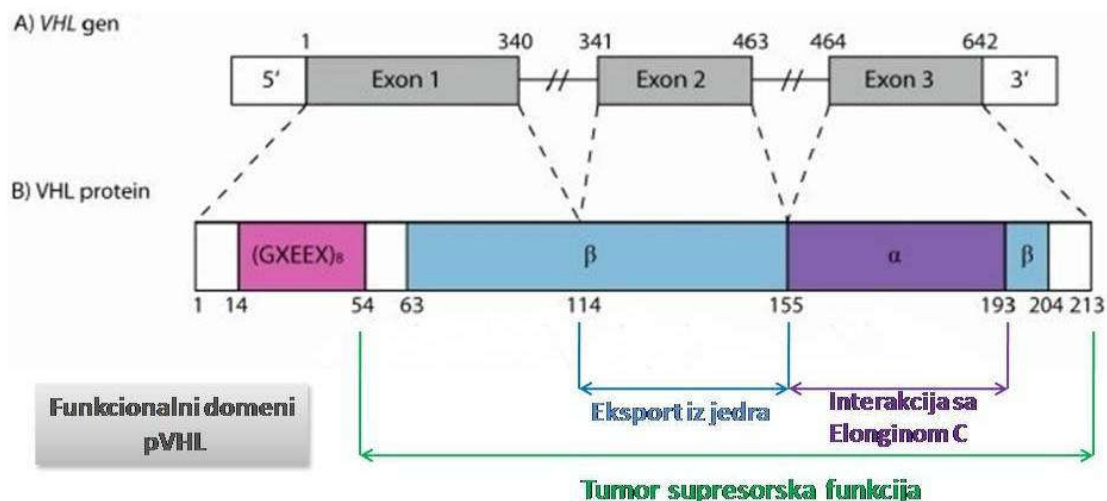
Gen *VHL* identifikovan je kao gen koji je odgovoran za nastanak jednog oblika naslednog sindroma vezanog za maligne bolesti, nazvanog von Hippel–Lindau (*VHL*) sindrom ili *VHL* bolest – po autorima koji su ga prvi put opisali početkom 20. veka (von Hippel 1904; Lindau 1927). Ovaj sindrom se odlikuje varijabilnim i kompleksnim fenotipom koji karakteriše razvoj multifokalnih, visoko-vaskularizovanih benignih i malignih tumora u različitim organima. Među njima, klinički najznačajniji su oni koji nastaju u centralnom nervnom sistemu (hemangioblastomi), oku (retinalni hemangioblastomi), bubrezima (svetloćelijski karcinom bubrega, engl. *clear cell renal cell carcinoma* – ccRCC), meduli nadbubrežne žlezde (feohromocitomi) i u pankreasu (nesekretorni tumori pankreasnih ostrvaca) (Maher i Kaelin 1997).

VHL lokus mapiran je 1988. godine na kratkom kraku hromozoma 3, a pet godina kasnije gen *VHL* je identifikovan pozicionim kloniranjem. U pitanju je gen za protein čiji produkt ima ulogu tumorskog supresora i čija je inaktivacija povezana sa razvojem naslednih karcinoma koji su karakteristični za VHL bolest, kao i njihovih sporadičnih – nenaslednih pandana (Seizinger i sar. 1988; Latif i sar. 1993). Uzrok inaktivacije gena *VHL* najčešće su mutacije u kodirajućem regionu, koje pogađaju oba alela. Kod VHL bolesti, jedna mutacija je germinativna odn. nasleđena od jednog od roditelja a druga je somatska tj. nastaje kasnije u određenom tkivu. Kod sporadičnih slučajeva, obe mutacije nastaju *de novo* (Lonser i sar. 2003).

Ekspresija VHL nije ograničena samo na tkiva i organe u kojima se javljaju promene karakteristične za VHL bolest. Utvrđeno je da se on eksprimira i u brojnim drugim tkivima uključujući i epitelne ćelije tireoidnih folikula (Los i sar. 1996; Maher i Kaelin 1997).

1.4.2. Struktura i ekspresija VHL

Gen *VHL* nalazi se u hromozomskom regionu 3p25, zauzima veličinu od 10 kb i sadrži 3 egzona. (Slika 1.5.A) (Maher i Kaelin 1997)



Slika 1.5. Struktura A) gena i B) proteina VHL (modifikovano iz Dandanell i sar. 2012; Yuen 2009).

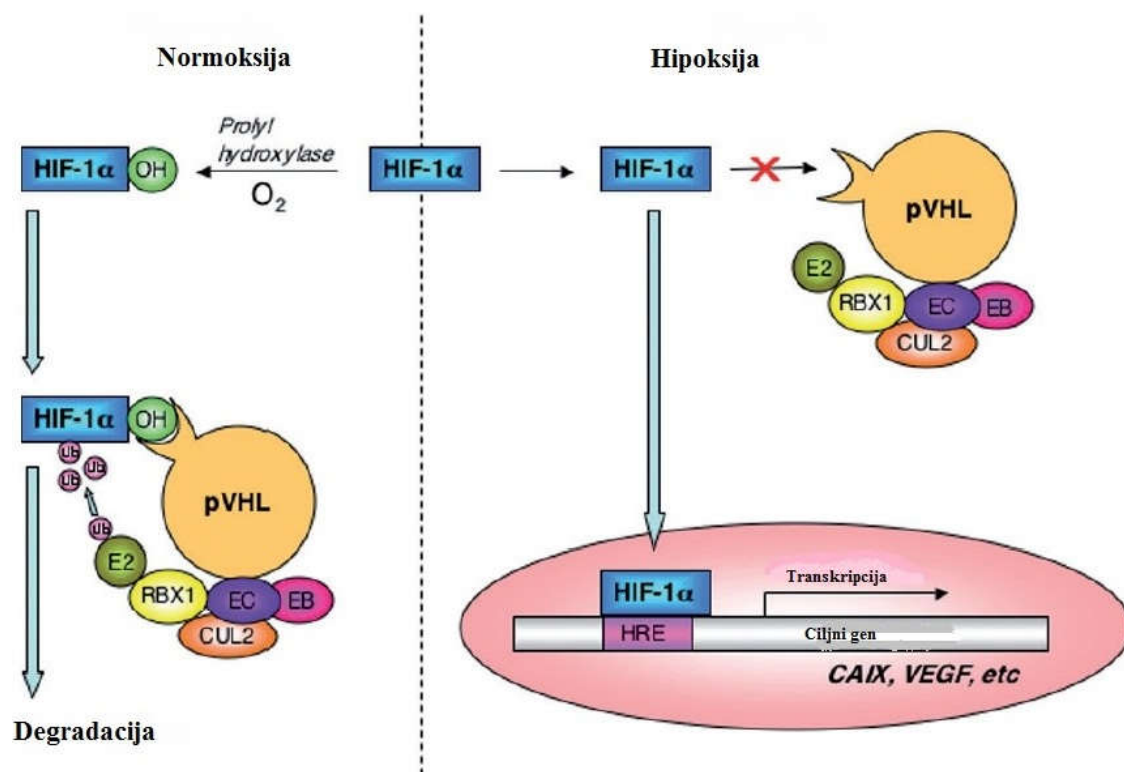
Transkripcijom gena *VHL* nastaju dve transkriptne varijante informacione RNK (iRNK) koje se međusobno razlikuju po prisustvu (transkriptna varijanta 1) ili odsustvu

(transkriptna varijanta 2) egzona 2 (Richards i sar. 1993). Transkriptna varijanta 1 kodira dve izoforme proteina VHL (pVHL) (**Slika 1.5.B**): jedna izoforma (pVHL₂₁₃) je protein od 213 aminokiselina i molekulske težine od 28–30 kDa a druga izoforma (pVHL₁₆₀) se sastoji od 160 aminokiselina i ima molekulsku težinu 18–19 kDa. pVHL₁₆₀ se razlikuje od pVHL₂₁₃ po tome što mu nedostaje prvih 53 aminokiselina, koje su manje evolutivno konzervirane od ostatka proteina, koji inače pokazuje visok stepen homologije među vrstama. Obe izoforme proteina su biološki aktivne, imaju ekvivalentne efekte u funkcionalnim esejima i obe ostvaruju tumor supresorsku aktivnost u uslovima *in vivo* (Schoenfeld, Davidowitz i Burk 1998; Iliopoulos, Ohh i Kaelin 1998; Woodward i sar. 2000; Chou i sar. 2013).

1.4.3. Funkcija proteina VHL

Protein VHL predstavlja sastavnu subjedinicu multiproteinskog E3 ubikvitin ligaznog kompleksa. Ovaj kompleks ima ulogu u poliubikvitinaciji ciljnih proteina u citoplazmi, procesu koji služi za obeležavanje proteina koji zatim bivaju degradirani u proteazomima. Pored VHL, u sastav ovog kompleksa ulaze još i proteini elongin B, elongin C, Cullin2 (Cul2) i Rbx1. Funkcija VHL u ovom kompleksu je prepoznavanje ciljnih proteina koji treba da budu obeleženi za degradaciju (Iwai i sar. 1999; Lisztwan i sar. 1999). Najbolje dokumentovan ciljni protein koji biva prepoznat od strane pVHL (obe izoforme koje nastaju translacijom transkriptne varijante 1 iRNK) je α subjedinica hipoksija inducibilnog faktora (engl. *hypoxia-inducible factor- α* – HIF- α) (Maxwell i sar. 1999; Ohh i sar. 2000; Cockman i sar. 2000; Krek 2000; Kamura i sar. 2000; Tanimoto i sar. 2000) (**Slika 1.6**).

U normoksičnim uslovima, HIF- α biva hidroksilovan (-OH) na dve prolinske rezidue od strane enzima prolil hidroksilaza. Ova hidroksilacija stvara mesto prepoznavanja za pVHL iz E3 ubikvitin ligaznog kompleksa što dalje vodi poliubikvitinaciji HIF- α i njegovoj degradaciji od strane proteazoma. U hipoksičnim uslovima ne dolazi do hidroksilacije, pa samim tim ni do prepoznavanja HIF- α od strane VHL, što rezultuje akumulacijom i stabilizacijom HIF- α subjedinica. Ova subjedinica dimerizujesa HIF- β i gradi heterodimerni regulatorni protein HIF, koji prelazi u jedro i aktivira transkripciju velikog broja ciljnih gena. Isto se dešava i u slučaju poremećaja ekspresije ili inaktivacije pVHL (Kitamura i Tsukamoto 2008; Kaelin 2007).



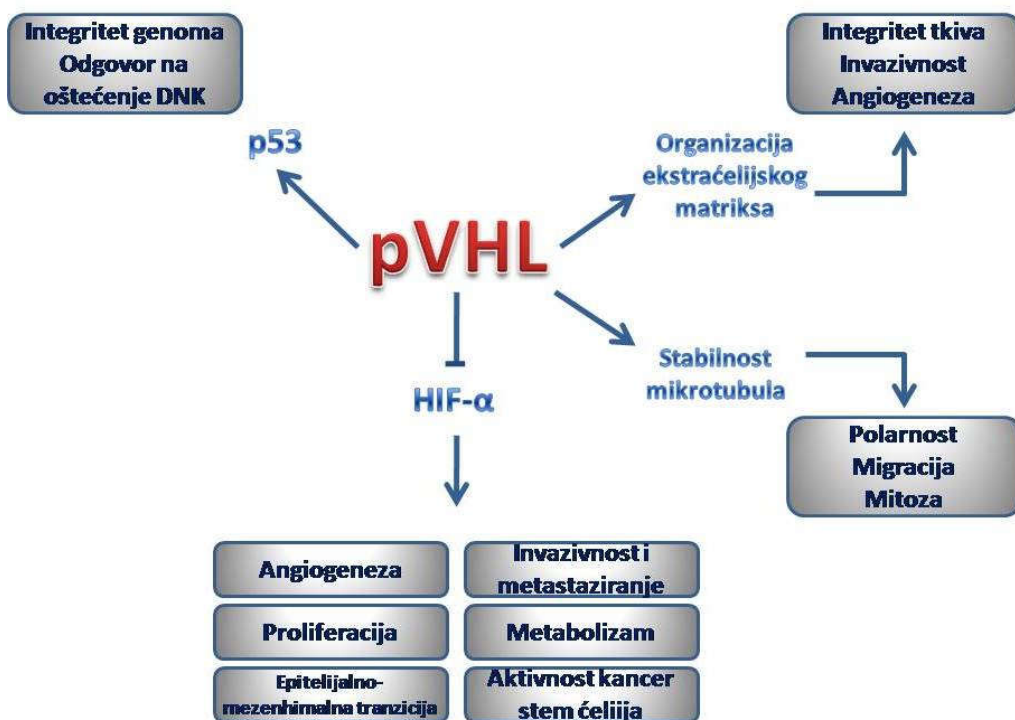
Slika 1.6. Regulacija HIF- α od strane E3 ubikvitin ligaznog lomepleksa u normoksičnim i hipoksičnim uslovima (modifikovano iz Kitamura i Tsukamoto 2008).

Istraživanja ukazuju na to da pVHL interaguje i sa drugim proteinima u ćeliji. Neki od njih takođe bivaju obeleženi za degradaciju dok drugi bivaju modulisani na drugi način. Tako, pVHL inhibira kinaznu aktivnost članova familije protein kinaza C (Okuda i sar. 1999; Pal i sar. 1997; K. Datta i sar. 2000; Kaustubh Datta i sar. 2001); inhibira transkripcionu aktivnost Sp1 (Mukhopadhyay i sar. 1997; H. T. Cohen i sar. 1999); obeležava za degradaciju enzime VDU1/2 koji katalizuju deubikvitinaciju HIF (Li i sar. 2002, 2005); obeležava za degradaciju subjedinicu RNK polimeraze II – Rpb1 (Kuznetsova i sar. 2003); stabilizuje Jade-1 – potencijalni tumor supresor (Zhou i sar. 2002); interaguje sa Hur1 (engl. *Hu family RNA binding protein*) – RNK vezujućim proteinom koji ima ulogu u stabilizaciji molekula iRNK (Kaustubh Datta i sar. 2005); interaguje sa fibronektinom i utiče na njegovo deponovanje u ekstraćelijski matriks (ECM) (Ohh i sar. 1998; Kurban i sar. 2006); reguliše stabilnost mikrotubula sprečavajući njihovu depolimerizaciju (Hergovich i sar. 2003); stabilizuje funkciju

proteina p53 tako što inhibira njegovu ubikvitinaciju od strane Mdm2 i regrutuje enzime koji aktiviraju i stabilizuju protein p53 (Roe i Youn 2006; Semenza 2006).

1.4.4. Uloga VHL u supresiji tumora

Sve je više podataka koji ukazuju na to da pVHL ostvaruje širok spektar HIF- α zavisnih i HIF- α nezavisnih funkcija koje utiču na različite ćelijske procese, od kojih mnogi imaju značajnu ulogu u tumorigenezi (Frew i Krek 2007; Gossage, Eisen i Maher 2015). Još uvek, međutim, nije poznato u kojoj meri HIF-zavisne i HIF-nezavisne funkcije pVHL kooperišu u procesu tumorigeneze. Neke od ovih funkcija i sa njima povezani procesi predstavljeni su na **slici 1.7**. (Frew i Krek 2007).



Slika 1.7. Funkcije VHL koje doprinose supresiji tumora (modifikovano iz Frew i Krek 2007).

Procesi koji su regulisani posredstvom inaktivacije HIF- α su: angiogeneza (HIF- α reguliše transkripciju VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) i nekih drugih gena koji su ključni za ovaj proces); ćelijska proliferacija i preživljavanje (posredstvom regulacije faktora rasta TGF α i EGFR); apoptoza (HIF- α zavisnom modulacijom p53 i NF- κ B); propagacija ćelija kroz

faze ćelijskog ciklusa (posredstvom HIF- α regulacije ciklina D1); gubitak integriteta i arhitekture epitelnog tkiva, epitelijalno-mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial mesenchymal transition* – EMT) (HIF- α indukovano smanjenje ekspresije E-kadherina, koje dovodi do gubitka ćelijske adhezivnosti) i druge (Frew i Krek 2007).

Utvrđeno je da pVHL i direktno, nezavisno od HIF- α , utiče na funkciju proteina p53. U odsustvu pVHL dolazi do smanjenja transkripcione aktivnosti i nivoa proteina p53, što negativno utiče na ćelijski odgovor na oštećenja DNK i dovodi do akumulacije genetičkih aberacija. Veći broj istraživanja je pokazao da pVHL direktno interaguje sa mikrotubulama, utičući tim putem na održavanje oblika i polariteta ćelija kao i na formiranje mitotskog vretena. U VHL deficijntnim ćelijama RCC takođe je zapažena povećana aktivnost enzima koji remodeluju ekstraćelijski matriks (engl. *extracellular matrix* – ECM) – MMP-2 i -9 (engl. *matrix metalloproteinases* – MMP). Ulozi pVHL u regulaciji organizacije ekstraćelijskog matriksa verovatno doprinosi i njegova sposobnost da interaguje sa fibronektinom, kolagenom IV i integrinima (Frew i Krek 2007).

1.4.5. Mutacione promene u genu *VHL*

U familijama u kojima postoji VHL sindrom do danas je identifikovano više od hiljadu germinativnih i somatskih mutacija gena *VHL*. Od toga, 52% čine mutacije sa pogrešnim kodirajućim značenjem – “*missense*”, 13% čine one koje remete okvir čitanja – “*frameshift*”, 11% besmislene – “*nonsense*”, 6% “*in-frame*” delecije/insercije, 11% delecije većih regiona koji obuhvataju i gen *VHL*. Ove mutacije su izuzetno heterogene i javljaju se duž cele kodirajuće sekvence gena (Nordstrom-O’Brien i sar. 2010; Tabaro i sar. 2016).

I u sporadičnim ccRCC i hemangioblastomima takođe su registrovane somatske mutacije gena *VHL*, dok su u sporadičnim feohromocitomima one veoma retke. Oko 55% mutacija u sporadičnim ccRCC su mutacije tipa “*frameshift*” ili “*nonsense*”, a 32% čine “*missense*” mutacije. Prva dva tipa mutacija najčešće dovode do gubitka pVHL funkcije, dok “*missense*” mutacije mogu imati različite efekte na integritet i funkciju pVHL (Gossage, Eisen i Maher 2015).

U drugim sporadičnim karcinomima, kao što su karcinom dojke, debelog creva, pluća i prostate, somatske mutacije u genu *VHL* su retke (W. Y. Kim i Kaelin 2004; Gnarr i sar. 1996). Isto važi i za karcinome tireoidee (Koperek i sar. 2011; Costa i sar. 2015; Grebe i sar. 1997).

1.4.6. RNK interferencija

RNK interferencija je način post-transkripcione regulacije (represije) ekspresije gena aktivnošću malih nekodirajućih molekula RNK nazvanih mikroRNK (skraćeno miRNK ili miR). Ovaj mehanizam ima veliki značaj u regulaciji gotovo svih bioloških procesa, uključujući i one ključne za patogenezu malignih tumora. Brojne studije su pokazale da izmenjena ekspresija molekula mikroRNK rezultuje promenama u ekspresiji iRNK, a time i proteinskih produkata velikog broja gena ključnih za kontrolu proliferacije, diferencijacije, apoptoze, angiogeneze i invazivnosti. U zavisnosti od ciljnih gena čiju ekspresiju regulišu, i funkcije mikroRNK se mogu podeliti na onkogene i tumor-supresorske (Hayes, Peruzzi i Lawler 2014; Acunzo i sar. 2015).

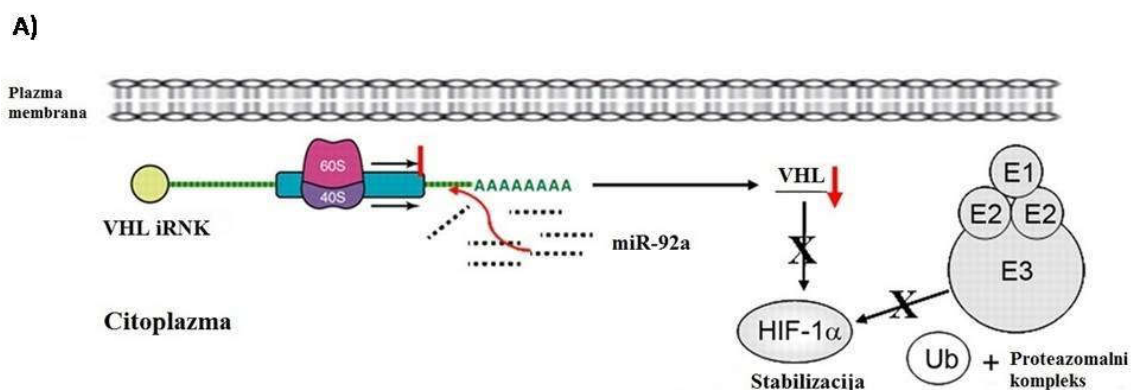
MikroRNK imaju dužinu od oko 22 nukleotida. Svoju funkciju represora genske ekspresije ostvaruju vezivanjem za 3' netranslirajući region ciljnih iRNK, koje je posredovano nukleotidima 2–8 (engl. *seed sequence*) sa 5' kraja mikroRNK. Ovo vodi degradaciji tih iRNK ili inhibiciji njihove translacije. Prepoznavanje ciljne iRNK je bazirano na komplementarnosti sekvenci ova dva molekula, koja ne mora da bude apsolutna. Zahvaljujući tome što je za ostvarenje funkcije mikroRNK dovoljna i parcijalna komplementarnost sa ciljnom iRNK, jedna mikroRNK može da reguliše ekspresiju većeg broja različitih iRNK. Tako, biološki efekat jedne mikroRNK predstavlja sinergiju inhibitornih efekata koje ona ostvarujena na različite iRNK u ćeliji (Tétreault i De Guire 2013).

1.4.6.1. MikroRNK-92a (miR-92a)

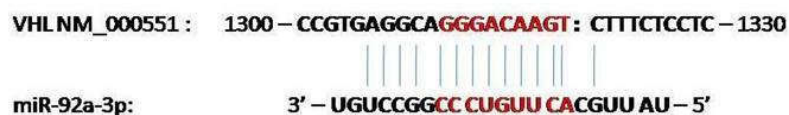
MiR-92a, deo klastera miR-17~92, je jedna od najranije otkrivenih mikroRNK sa onkogenom aktivnošću (He i sar. 2005). Istraživanja su pokazala da je nivo ove mikroRNK često povišen u različitim tipovima malignih bolesti (Volinia i sar. 2006). Utvrđeno je da povišena ekspresija pospešuje proliferaciju tumorskih ćelija

hepatocelularnog karcinoma dok je primena antagonista miR-92a inhibira (Shigoka i sar. 2010). U tumorima debelog creva i glioblastomima, miR-92a može da se veže za proapoptotski faktor *Bim* (Bcl-2 interacting mediator of cell death) i inhibira apoptozu (Niu i sar. 2012; Tsuchida i sar. 2011). U drugim malignim bolestima pokazano je da miR-92a redukuje ekspresiju integrina $\alpha 5$ i E-kadherina promovišući na taj način invazivnost tumora (Ohyagi-Hara i sar. 2013; Chen Z. i sar. 2011).

Studija Valere i saradnika je ukazala na to da bi jedan od gena čija je ekspresija regulisana od strane miR-92a mogao biti i *VHL*. Jaka negativna korelacija, koja se ogleda u povišenoj ekspresiji miR-92a i sniženoj ekspresiji *VHL* iRNK, detektovana je u grupi uzoraka RCC. Pretraga baza podataka za predikciju interakcija između miR i iRNK dala je nekoliko potencijalnih mesta u *VHL* iRNK za prepoznavanje od strane miR-92a (Valera i sar. 2011). Negativna korelacija između povišeno eksprimirane miR-92a i pVHL nađena je i u CLL (hronična limfocitna leukemija) B ćelijama a takođe je i pokazano da miR-92a može da interaguje direktno sa 3' krajem *VHL* iRNK i da suprimira njegovu ekspresiju (**Slika 1.8.**) (Ghosh i sar. 2009).



B)



Slika 1.8. Šematski prikaz interakcije *VHL* iRNK i miR-92a. A) miR-92a se vezuje za *VHL* iRNK i dovodi do sniženja njegove ekspresije što rezultuje stabilizacijom HIF-1 α transkripcionog faktora i aktivacijom transkripcije ciljnih gena. B) Komplementarnost sekveci između *VHL* 3' UTR i miR-92a (modifikovano iz Ghosh i sar. 2009).

2. CILJEVI RADA

Osnovni cilj ove studije bio je utvrditi da li su promene u ekspresiji VHL tumorskog supresora uključene u etiopatogenezu i/ili progresiju PTC i da li bi, shodno tome, VHL mogao biti potencijalni kandidat kao parametar klasifikacije i prognoze kod bolesnika sa ovim tipom karcinoma. Kako bi se više saznalo o mehanizmima koji su uključeni u regulaciju VHL, još jedan cilj bio je da se ispita da li su mutacioni događaji u sekvenci gena i regulacija koja se odvija na post-transkripcionom nivou a posredovana je miR-92a, odgovorni za promene u ekspresiji VHL. U skladu sa ovim ciljevima, definisani su sledeći specifični podciljevi:

1. Ispitati nivo ekspresije *VHL* iRNK i mutacioni status gena *VHL* u tkivima PTC.
2. Utvrditi da li postoji povezanost nivoa *VHL* iRNK i mutacionog statusa gena *VHL* sa kliničkim i patohistološkim parametrima kao što su godine života i pol bolesnika, histološka varijanta tumora, veličina tumora, pT status, fokalni status tumora, nodalni status, prisustvo ekstatireoidnog širenja, prisustvo vaskularne invazije i klinički stadijum.
3. Utvrditi moguću asocijaciju nivoa *VHL* iRNK i mutacionog statusa gena *VHL* sa podacima o mutacionom statusu gena *BRAF* i *RAS*, i rearanžmanima *RET/PTC* u PTC tkivima, koji su dobijeni u našim ranijim istraživanjima.
4. Ispitati nivoe ekspresije VHL iRNK i proteina u tkivu papilarnih karcinoma tireoidee i odgovarajućem neizmenjenom tireoidnom tkivu.
5. Utvrditi da li postoji povezanost promene ekspresije VHL sa kliničkim i patohistološkim parametrima.
6. Ispitati nivo ekspresije miR-92a u tkivu papilarnih karcinoma tireoidee i odgovarajućem neizmenjenom tireoidnom tkivu i utvrditi da li postoji povezanost sa kliničkim i patohistološkim parametrima PTC.
7. Utvrditi moguću korelaciju nivoa ekspresije VHL iRNK/proteina sa miR-92a.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Bolesnici i uzorci tkiva

U studiju je bilo uključeno ukupno 306 bolesnika obolelih od papilarnog karcinoma štitaste žlezde. Od toga, 264 bolesnika je bilo lečeno u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od juna 1992. do decembra 2008. godine a 42 bolesnika bilo je lečeno u Centru za endokrinu hirurgiju Kliničkog centra Srbije u periodu od juna 2012. godine do jula 2015. godine. Studija je izvedena uz saglasnosti Etičkog odbora Instituta za radiologiju i onkologiju Srbije br. 738-01 od 03.03.2008. godine i Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije br. 1730/18 od 17.09.2015. godine.

Uzorci 264 bolesnika lečenih u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije dobijeni su u obliku parafinskih isečaka tkiva. Uzorci dobijeni od 42 bolesnika operisanih u Centru za endokrinu hirurgiju Kliničkog centra Srbije dobijeni su u vidu delova tumorskog i neizmenjenog tireoidnog tkiva, koji su odmah nakon operacije zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -70°C . U isto vreme, ostatak tkiva je fiksiran u formalinu i ukalupljen u parafinske blokove nakon čega je podvrgnut rutinskom histopatološkom pregledu kako bi se postavila definitivna dijagnoza.

Dijagnostika i histopatološka klasifikacija tumora izvršena je u skladu sa standardima za klasifikaciju tumora Svetske zdravstvene organizacije (Sobin, Gospodarowicz, and Wittekind 2010). Klinički podaci o bolesnicima i patohistološki podaci o tumorima prikupljeni su iz pisane medicinske dokumentacije navedenih ustanova. U analizi su korišćeni sledeći kliničkopatološki parametri: 1) pol bolesnika, 2) starost bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze (u određenim analizama je uveden *cut-off* na 45 godina, 3) veličina primarnog tumora, 4) prisustvo jednog ili više tumorskih fokusa, 5) prisustvo invazije tumorske kapsule, 6) prisustvo ekstratireoidnog širenja, 7) prisustvo vaskularne invazije, 8) klinički stadijum bolesti određen prema TNM (Tumor, Nodusi, Metastaze) sistemu klasifikacije tumora, 9) pT status, 10) prisustvo limfnih nodalnih metastaza, 11) prisustvo udaljenih metastaza, 12) histopatološka varijanta.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija molekula DNK

Molekuli DNK iz arhivskih uzoraka parafinskih kalupa izolovani su korišćenjem komercijalnog kita *Puregene Genomic DNA purification kit* (Gentra systems, Qiagen, Minneapolis, SAD). Od kalupa su na mikrotomu sečeni listići debljine oko 10 µm i količina tkiva ekvivalentna rezu od oko 40 µm je korišćena za izolaciju. Deparafinizacija i izolacija molekula DNK izvedene su prema uputstvu proizvođača.

U cilju deparafinizacije, uzorcima je dodavan po 1 ml 100% ksilola (Zorka Pharma, Šabac) i dobijena smeša je inkubirana 10 minuta na 50°C, nakon čega je usledilo centrifugiranje u trajanju od 2 minuta na 16.000 x g kako bi tkivo oformilo talog. Supernatant je u svakom koraku pažljivo uklanjan nastavkom. Ovaj postupak je po potrebi ponovljen još dva puta. Kako bi se uklonili ostaci ksilola i ubrzalo sušenje, uzorci su dva puta isprani sa po 1 ml 100% etanola.

Nakon deparafinizacije uzorci su homogenizovani u 600 µl rastvora za digestiju (*Cell Lysis Solution*), dodavano je 3 µl proteinaze K (*Puregene Proteinase K*) i inkubirani su preko noći na 55°C.

Po završenoj digestiji uzorcima je dodavano po 3 µl rastvora za degradaciju molekula RNK (*RNase A Solution*) i inkubirani su 15 minuta na 37°C. Uzorci su zatim ohlađeni na ledu i dodavano im je po 200 µl rastvora za precipitaciju proteina (*Protein Precipitation Solution*), snažno vorteksovani a zatim centrifugirani 3 minuta na 16.000 x g kako bi proteini formirali talog.

Supernatant sa molekulima DNK izdvojen je u nove tube i dodavano mu je 600 µl izopropanola radi precipitacije molekula DNK, tube su blago invertovane i uzorci su centrifugirani 5 minuta na 16.000 x g. Talog molekula DNK je zatim ispran sa 600 µl 70% etanola i sušen na sobnoj temperaturi 5 minuta. Na kraju, uzorcima molekula DNK dodavano je po 100 µl pufera za rastvaranje (*DNA Hydration Solution*), inkubirani su sat vremena na 65°C a zatim ostavljani na sobnoj temperaturi preko noći kako bi se DNK potpuno rastvorila. Koncentracije uzoraka merene su spektrofotometrijski na

aparatu *NanoDropTM 1000* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Uzorci rastvorene DNK čuvani su na 4°C.

3.2.2. Izolacija molekula RNK

3.2.2.1. Izolacija molekula RNK iz tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafinske blokove

Molekuli RNK iz arhivskih uzoraka parafinskih kalupa izolovani su korišćenjem komercijalnog kita *Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion, Foster City, CA, SAD). Za izolaciju molekula RNK korišćeno je po tri parafinska listića debljine 10 µm. Deparafinizacija i izolacija molekula RNK vršene su prema uputstvu proizvođača.

Uzorcima tkiva u parafinu dodat je po 1 ml 100% ksilola. Dobijena smeša je inkubirana 10 minuta na 50°C kako bi se parafin istopio. Kako bi se oslobođeno tkivo staložilo, uzorci su centrifugirani 2 minuta na 16.000 x g, na sobnoj temperaturi. Ksilol sa rastvorenim parafinom je pažljivo uklanjao nastavkom. Ovaj postupak je po potrebi ponovljen još dva puta. Zatim je sledilo ispiranje deparafinisanog tkiva kako bi se uklonili ostaci ksilola. Ispiranje je vršeno dodavanjem po 1 ml 100% etanola i snažnim mućkanjem, nakon čega su uzorci centrifugirani 2 minuta na sobnoj temperaturi na 18.000 x g. Etanol je pažljivo uklanjao nastavkom. Ispiranje etanolom ponovljeno je još jednom, nakon čega su uzorci sušeni 35–45 minuta na sobnoj temperaturi.

Nakon deparafinizacije usledila je proteazna digestija tkiva. Uzorcima je dodavano po 200 µl pufera za digestiju (*Digestion Buffer*) i po 4 µl enzima proteaze. Uzorci su zatim inkubirani 90 minuta na 50°C i još 15 minuta na 80°C.

U koraku izolacije molekula RNK, u uzorke je dodavano po 240 µl izolacionog aditiva (*Isolation Additive*) rastvorenog u 550 µl 100% etanola. Ova smeša je prebacivana u kolektorske tube koje sadrže filtere sa silikatnim membranama i centrifugirana 30 sekundi na 10.000 x g. Filtrat je odbacivan a sadržaj filtera je ispran dodavanjem 700 µl rastvora za ispiranje (*Wash 1*) i centrifugiran 30 sekundi na 10.000 x g. Ovaj postupak je ponavljan sa rastvorom za ispiranje (*Wash 2/3*) koji je dodat u zapremini od 500 µl, uz još jedan – dodatni korak centrifugiranja na kraju.

Poslednji korak izolacije molekula RNK predstavlja nukleazna digestija molekula DNK i finalno prečišćavanje dobijene RNK. Za korak nukleazne digestije pripreman je DNazni miks sledećeg sastava : 6 μ l 10x DNaznog pufera (*10x DNase Buffer*), 4 μ l DNaze i 50 μ l DEPC-H₂O. Po 60 μ l ovog miksa nalivano je na svaki filter i uzorci su zatim inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Finalno prečišćavanje je obuhvatalo ponovljeno ispiranje rastvorima *Wash 1* i dva puta *Wash 2/3*, te završnim centrifugiranjem u trajanju od 1 minuta na 10.000 x g. Isprana RNK je zatim odvojena sa kolone dodavanjem 60 μ l rastvora za odvajanje (*Elution Solution*) i centrifugiranjem na 18.000 x g u trajanju od 1 minuta. Koncentracije uzoraka merene su spektrofotometrijski na aparatu *NanoDropTM 1000* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Uzorci izolovane RNK čuvani su na -70°C.

3.2.2.2. Izolacija molekula RNK iz sveže zamrznutog tkiva

Izolacija molekula RNK iz tkiva koja su zamrznuta u tečnom azotu naposredno posle operacije rađena je pomoću komercijalnog reagensa *TRI Reagent Solution* (Ambion, Foster City, CA, SAD). Ova metoda izolacije zasnovana je na klasičnoj ekstrakciji ukupne RNK kiselim fenolom (u puferu koji sadrži guanidin tiocijanat), taloženju alkoholom i rastvaranju u vodi.

Ova metoda predstavlja modifikaciju klasične metode izolacije molekula RNK po autorima Chomczynski i Sacchi (Chomzynski i Sacchi 1987), odvija se u jednom koraku, te je pogodna za brzu izolaciju ukupne ćelijske RNK uz dobijanje zadovoljavajućeg kvantiteta i kvaliteta izolovane RNK.

Zamrznuti uzorci tkiva težine 50–100 mg mehanički su homogenizovani u sterilnim avanima uz dodavanje tečnog azota, što je olakšavalo homogenizaciju i ujedno inhibiralo aktivnost ribonukeaza. Sprašeno tkivo inkubirano je u 1 ml *TRI Reagent*-a 15 minuta na sobnoj temperaturi, uz povremeno mešanje. Uzorcima je zatim dodavano po 200 μ l hloroforma analitičke čistoće (Centrohem, Stara Pazova), smeša je intenzivno mešana 15 sekundi i inkubirana još 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Uzorci su zatim centrifugirani 15 minuta na 4°C i 12.000 x g, pri čemu se smeša razdvajala na tri faze: donju – fenol-hloroformsku fazu, međufazu (ove dve faze sadrže proteine i molekule DNK) i gornju – bezbojnu, vodenu fazu koja se dalje

koristila za izolovanje molekula RNK. Vodena faza je pažljivo prebacivana u novu tubu, i u nju je dodavano 500 µl hladnog izopropanola analitičke čistoće (Lach-Ner, Neratovice, Češka) kako bi se molekuli RNK staložili. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 10 minuta uz povremeno mešanje, a zatim centrifugirani 10 minuta na 4°C i 12.000 x g. Supernatant je odlivan a talog RNK je dva puta ispiran dodavanjem 1 ml ledenog 75% etanola (u pravljenju ovog rastvora korišćena je voda tretirana DEPC-om) i kratkim vorteksovanjem, te centrifugiranjem na 7.500 x g u trajanju od 5 min na 4°C. Na kraju je sledilo još jedno ispiranje, ovaj put sa 500 µl 100% etanola kako bi se RNK uzorci brže osušili. Sušenje, u trajanju 15–20 minuta, se odvijalo kraj plamena. Uzorcima je zatim dodavano po 50–100 µl vode bez nukleaza (Qiagen, Nemačka), nakon čega je sledila inkubacija od 10 minuta na 65°C da bi se rastvaranje ubrzalo. Koncentracije uzoraka merene su spektrofotometrijski na aparatu *NanoDropTM 1000* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Uzorci rastvorene RNK čuvani su na -70°C.

3.2.3. Detekcija mutacija metodom sekvenciranja

3.2.3.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR) egzona 1–3 gena *VHL*

U cilju pripreme izolovane DNK za sekvenciranje, urađena je reakcija lančanog umnožavanja egzona 1, 2 i 3 gena *VHL* prema postojećem protokolu (Gnarra i sar. 1994; Hoebeeck i sar. 2005). Sekvence prajmera koji su korišćeni za svaki od egzona prikazane su u **tabeli 3.1**. Prajmeri su dizajnirani tako da obuhvataju i intronske delove gena, tako da se sekvence egzona mogu cele analizirati u oba smera. Provera specifičnosti vezivanja prajmera u okviru genoma urađena je uz pomoć programa Bisearch, opcija elektronska lančana reakcija umnožavanja (ePCR), dostupnom na linku: <http://bisearch.enzim.hu/>.

PCR reakcija je izvođena u zapremini od 25 µl a finalne koncentracije komponenti reakcione smeše bile su: *1x DreamTaq* pufer (sa 2 mM MgCl₂ u finalnoj koncentraciji) (Thermo Scientific, Litvanija), dinukleotid-tri-fosfati (dNTPs) 0,2 mM, prajmeri 1 µM svaki, 0,5 jedinica *DreamTaq* polimeraze (#EP0703, Thermo Scientific, Litvanija) i 50–100 ng DNK. U reakciji amplifikacije egzona 1 korišćen je i dimetil sulfoksid (DMSO) u finalnoj koncentraciji 5%.

Reakcija je izvođena na aparatu *Applied Biosystems 2720* u trajanju od 30 ciklusa. Svaki ciklus se sastojao od 3 koraka: denaturacije DNK na 95°C u trajanju od 60 sekundi (za egzone 2 i 3) odn. 5 min. za egzon 1, hibridizacije prajmera (30 sekundi na temperaturi prikazanoj u tabeli 3.1.) i elongacije prajmera 30 sekundi (za egzone 2 i 3), odn. 45 sekundi (za egzon 1) na 72°C. Reakcija je započeta iniicijalnom denaturacijom na 95°C u trajanju od 3 minuta a završena je finalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 10 minuta.

Tabela 3.1. Sekvence prajmera za umnožavanje egzona 1, 2 i 3 gena *VHL* (NCBI pristupni broj sekvence NG_008212)

Egzon	Prajmerske sekvence (5'-3')	Th(°C)	Dužina amplikona (bp)
1	F: AGTGGAATAACAGTAACGAGTTGGCCT	60	611
	R: TGGGTCGGGCCTAAGCGCCGGGCCCGT		
2	F: CTTTAACAACCTTTGCTTGCCCGATA	56	208
	R: GTCTATCCTGTACTIONACCACAACAACCT		
3	F: CTGAGACCCTAGTCTGCCACTGAGGAT	60	266
	R: CAAAAGCTGAGATGAAACAGTGTAAGT		

F – engl. *forward*, nizvodni prajmer; R – engl. *reverse*, uzvodni prajmer; Th, temperatura hibridizacije; bp, bazni par

3.2.3.2. Provera specifičnosti PCR reakcije elektroforezom i prečišćavanje amplikona

Provera specifičnosti PCR reakcije urađena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu, bojenom etidijum-bromidom. Komponente agaroznog gela prikazane su u **tabeli 3.2.**

Tabela 3.2. Receptura za pripremu agaroznog gela zapremine 100 ml

Komponenta	10xTBE* pufer	Agarozna	Etidijum bromid	Destilovana voda(dH ₂ O)
Količina	10 ml	2 g	5 µl	90 ml

*10xTBE pufer pH 8.3 (108 g Tris, 55 g H₃BO₃, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, dH₂O do 1000 ml)

Alikvoti PCR produkata su u okviru pripreme za sekvenciranje prečišćeni primenom komercijalnog kita *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka) prema protokolu proizvođača. Kit je dizajniran za brzo prečišćavanje i koncentrovanje dvolančanih PCR produkata veličine 70bp – 4kb. Postupak se sastojao od selektivne adsorpcije dvolančanih DNK dužih od 70 bp za silikatne membrane u kolonicama

zahvaljujući puferima sa optimalnom koncentracijom soli i $\text{pH} \leq 7,5$, dok su ostale komponente PCR reakcije (soli, prajmeri, neinkorporirani nukleotidi) prolaze kroz kolonu. Protokol je bio sledeći:

PCR reakcionoj smeši (25 μ l) dodavano je 5 zapremina pufera *PB* koji u sebi sadrži pH indikator. Ova smeša se nalivala na kolonicu smeštenu u kolektorskoj tubi i centrifugirana je 1 minut na brzini 17.900 x g, na sobnoj temperaturi. Filtrat je odlivan a na kolonicu se nalivalo 750 μ l pufera *PE* koji sadrži etanol i koji služi za ispiranje ostataka soli. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1 minuta na brzini 17.900 x g, kolonica se prebacivala u novu tubu i ponovo centrifugirana 1 minut na brzini 17.900 x g kako bi se uklonili ostaci etanola. Sledeći korak bilo je odvajanje (elucija) DNK sa kolone, koji se sastojao od nalivanja 10 μ l pufera za odvajanje – *EB* (10mM Tris Cl, pH 8,5), inkubacije 1 minut i finalnog centrifugiranja u trajanju od 1 minut na brzini 17.900 x g.

3.2.3.3. Sekvenciranje fragmenata molekula DNK

Sekvenciranje umnoženih i prečišćenih fragmenata molekula DNK koji sadrže egzone 1–3 gena *VHL* urađeno je u institutu Atomic Bomb Disease Institute, Univerziteta u Nagasakiju, Japan. Sekvenciranje je urađeno u oba smera primenom komercijalnog kita *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, na aparatu *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

3.2.4. Određivanje nivoa ekspresije *VHL* iRNK i miR-92a

Kvantifikacija iRNK i mikroRNK urađena je u dva koraka. Prvi korak predstavljao je reverznu transkripciju molekula RNK u molekule komplementarne DNK (cDNK), čija se količina zatim određivala u reakciji lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR).

3.2.4.1. Reverzna transkripcija

3.2.4.1.1. Reverzna transkripcija za kvantitativnu analizu ekspresije *VHL* iRNK

Reverzna transkripcija (RT) rađena je uz pomoć komercijalnih kitova *iScriptcDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) ili *High Capacity cDNA Reverse*

Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) u skladu sa preporukama proizvođača. Za reakcije je korišćeno oko 1 µg ukupne RNK rastvorene u vodi. Reakcije su izvođene u zapremini od 20 µl. Komponente reakcione smeše bile su:

– za *iScript cDNA Synthesis Kit*: 4 µl iScript reakcioni miks (5x), 1 µl iScript reverzne transkriptaze, 5 µl vode bez nukleaza i 10 µl RNK rastvorene u vodi.

– za *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*: 2 µl RT pufera (10x), 0,8 µl 25x dNTP miks (100mM), 2 µl 10x nasumičnih heksamernih prajmera, 1µl MultiScribe reverzne transkriptaze (50U/µl), 1 µl RNaznog inhibitora (20U/µl), 3,2 µl vode bez nukleaza i 10 µl RNK rastvorene u vodi.

Priprema reakcione smeše i pravljenje razblaženja RNK uzoraka vršeno je na ledu. U svakoj seriji uzoraka bila je prisutna negativna kontrola koja sadrži sve komponente reakcione smeše osim molekula RNK, umesto koje je dodata odgovarajuća zapremina vode bez nukleaza. Temperaturni profil reakcije bio je:

– za *iScript cDNA Synthesis Kit*: 25°C (5 min), 46°C (20 min), 95°C (1 min) i 4°C (5 min);

– za *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*: 25°C (10 min), 37°C (120 min), 85°C (5 min) i 4°C (5 min).

Dobijeni produkti cDNK odmah su korišćeni za real-time PCR ili čuvani na -20°C do analize.

3.2.4.1.2. Reverzna transkripcija za kvantitativnu analizu ekspresije miR-92a

Za reverznu transkripciju molekula miR-92a korišćen je komercijalni, *TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i specifični prajmer (RT prajmer) sa petljom (*stem-loop*) iz komercijalnog eseja *TaqMan®MiR-92a Assay* (ID 000431) (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Esej je dizajniran i validiran tako da prepisuje željenu mikroRNK sa izuzetno visokom specifičnošću.

Pravljenje razblaženja RNK uzoraka i priprema reakcione smeše obavljano je na ledu, prema protokolu proizvođača. U reakciji reverzne transkripcije korišćeno je 10 ng ukupne RNK. Reakcije su izvođene u zapremini od 15 µl. Komponente reakcione smeše su: 1,5 µl 10x RT pufer, 0,15 µl dNTP miksa, 1 µl MultiScribe reverzna transkriptaza (50U/µl), 1 µl RNaznog inhibitora (20 U/µl), 4,16 µl vode bez nukleaza, 3 µl 5x RT prajmera i 5 µl RNK rastvorene u vodi. Pripremljena reakciona smeša inkubirana je 5 minuta na ledu pre početka RT reakcije, a temperaturni profil bio je: 16°C (30 min), 42°C (30 min), 85°C (5 min) i 4°C (5 min). Dobijeni produkti cDNK odmah su korišćeni za Real-time PCR ili su čuvani na -20°C do analize. Identičan postupak sproveden je i za reverznu transkripciju male nukleolarne RNK RNU6B (ID 001093), koja je korišćena kao endogena kontrola u realtivnoj kvantifikaciji miR-92a.

3.2.4.2. Kvantitativni PCR

Kvantitativni PCR ili PCR u realnom vremenu (engl. *Q-PCR*, *real-time PCR*) je kvantitativna PCR metoda koja omogućava najpreciznije određivanje količine prisutnih molekula cDNK dobijenih reverznom transkripcijom odgovarajućih molekula iRNK. Precizna kvantifikacija je rezultat praćenja toka PCR reakcije, pri čemu se količina ciljne cDNK određuje na osnovu vremenskog trenutka detektovanja njene amplifikacije, a ne na osnovu količine produkta na kraju PCR reakcije. Vremenski trenutak detektovanja amplifikacije ciljne sekvence odgovara ulasku u eksponencijalnu fazu reakcije PCR, tj. onom broju ciklusa na kome se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag (engl. *threshold*) i koji se označava kao Ct vrednost (engl. *threshold Cycle*) (Fraga i sar. 2008). Relativna kvantifikacija genske ekspresije definiše razliku nivoa ekspresije ciljne iRNK u ispitivanom uzorku u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak. S obzirom da unos ukupne RNK u reakciju reverzne transkripcije, njen kvalitet kao i efikasnost reverzne transkripcije mogu da variraju od uzorka do uzorka, istovremeno se amplifikuje i neki stabilno eksprimirani – referentni gen (endogena kontrola). Nivoi ekspresije ciljnog gena u ispitivanom uzorku u odnosu na kontrolni se zato normalizuju na izmerene nivoe odgovarajućeg referentnog gena u njima (Fraga i sar. 2008).

3.2.4.2.1. Određivanje nivoa ekspresije *VHL* iRNK

Detekcija *VHL* iRNK obavljena je primenom tehnologije koja se bazira na vezivanju nespecifične fluorescentne boje SYBR Green ili EvaGreen za dvolančanu DNK, što dovodi do značajnog povećanja (20–100 puta) njene fluorescence. Kako se količina dvolančanih DNK u reakcionoj smeši povećava, tako raste i intenzitet fluorescentnog signala. Merenjem povećanja fluorescence nakon dostizanja ciklusa na kome se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag (Ct), procenjuje se količina sintetisanog amplikona.

Za kvantifikaciju *VHL* iRNK u uzorcima tkiva ukalupljenog u parafinu, reakcija amplifikacije ciljne sekvence sadržala je 1x *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD), 250 nm prajmere i produkt reverzne transkripcije razblažen u odnosu 1:5. Sve reakcije su urađene u duplikatu, u zapremini od 15 µl, na aparatu *ABI Prism 5700 Sequence Detector* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Uslovi reakcije bili su: 95°C (10 min) za aktivaciju enzima, zatim 40 ciklusa na temperaturama 95°C (15s) (denaturacija) i 60°C (1 min) (aniling/ekstenzija). Kao endogena kontrola korišćen je gen za *GAPDH* (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza). Prajmeri za *VHL* preuzeti su iz baze RTPrimerDB (dostupno na URL: <http://medgen.ugent.be/rtpimerdb/>), ID gena – *VHL*. Prajmeri za *GAPDH* su dizajnirani u programu Primer3Plus Software (dostupno na URL: <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Sekvence prajmera i dužine amplikona dati su u **tabeli 3.3**. Specifičnost prajmera je potvrđena analizom krive topljenja nakon PCR amplifikacije za svaki PCR produkt.

Za izračunavanje relativne ekspresije *VHL* korišćena je metoda relativne standardne krive. Standardne krive za ciljnu sekvencu i za endogenu kontrolu, konstruisane su na osnovu serije razblaženja smeše uzoraka cDNK poznate koncentracije. Količina ciljne i referentne sekvence su određivane sa odgovarajuće standardne krive a zatim je vrednost za ciljnu sekvencu podeljena sa vrednošću za referentnu. Tako dobijena normalizovana vrednost za dati uzorak je zatim podeljena sa normalizovanom vrednošću kalibratorskog uzorka (1x uzorak), što je dalo relativnu ekspresiju datog uzorka u odnosu na kalibratorski.

Tabela 3.3. Sekvence prajmera korišćenih u kvantitativnom PCR-u za određivanje nivoa *VHL* iRNK ekspresije

Naziv	Prajmerske sekvence (5'-3')	Dužina amplikona	NCBI pristupni broj sekvence transkripta
<i>VHL_F</i>	F: ACGGACAGCCTATTTTGCCAA	110 bp	NM_000551
<i>VHL_R</i>	R:GTCCAGTCTCCTGTAATTCTCAGGCTT		
<i>PPIA_F</i>	F:TTCATCTGCACTGCCAAGAC	158 bp	NM_021130
<i>PPIA_R</i>	R:TCGAGTTGTCCACAGTCAGC		
<i>GAPDH_F</i>	F:CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	308 bp	NM_002046
<i>GAPDH_R</i>	R:AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC		

F – engl. *forward*, nizvodni; R – engl. *reverse*, uzvodni

Za razliku od srodnih boja, u koje spada i SYBR Green, EvaGreen je nemutagena i necitotoksična, izuzetno je termo-, foto- i hemijski stabilna, odlikuje se nižim inhibitorynim efektom, visokom senzitivnošću i boljom rezolucijom signala (Mao, Leung i Xin 2007). Zato je za kvantifikaciju *VHL* iRNK u svežem tkivu korišćena ova boja. Reakcija amplifikacije ciljne sekvence sadržala je *1x ABM EvaGreen qPCR MasterMix–Low ROX* (Applied Biological Materials, Richmond, Kanada), 600 nm prajmere i produkt reverzne transkripcije u odnosu 1:50. Sve reakcije su urađene u duplikatu, u zapremini od 20 µl, na aparatu *ABI Prism 7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Uslovi reakcije bili su: 95°C (10 min), zatim 40 ciklusa na temperaturama 95°C (15s) i 60°C (1 min). Kao endogena kontrola korišćen je gen za *PPIA* (peptidilprolil izomerazu A / ciklofilin A). Prajmeri za *VHL* preuzeti su iz baze RTPrimerDB (dostupno na URL: <http://medgen.ugent.be/rtpimerdb/>), ID gena – *VHL*. Prajmeri za *PPIA* su dizajnirani u programu Primer3Plus Software (dostupno na URL: <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Sekvence prajmera i dužine amplikona dati su u **tabeli 3.3**. Specifičnost prajmera je potvrđena analizom krive topljenja nakon PCR amplifikacije za svaki PCR produkt. Efikasnost umnožavanja ciljne i referentne sekvence je prvobitno proveravana korišćenjem serijskih razblaženja smeše cDNK i konstruisanjem relativne standardne krive. Iz stepena zakrivljenosti standardne krive određena je efikasnost umnožavanja za dati par prajmera koja je ulazila u preporučeni okvir od 90–110%. Za izračunavanje relativne ekspresije *VHL* u ovom slučaju korišćena je metoda $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl 2001). Analitički softver aparata daje C_t vrednosti koje odgovaraju broju ciklusa u kom je porast signala iznad nivoa šuma, što je udruženo sa ulaskom u eksponencijalnu

fazu PCR-a. Ct vrednosti su eksportovane u Excel fajl i konačan rezultat relativne ekspresije RQ izražen je:

– u relativnim jedinicama kao n-puta razlika u odnosu na kalibrator (1x uzorak, uzorak koji je najmanje eksprimiran) a normalizovan prema endogenoj kontroli po jednakosti:

$$RQ_{\text{uzorak}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ gde je}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{uzorak})} - \Delta Ct_{(\text{kalibrator})}$$

$$\Delta Ct_{\text{uzorak}} = Ct_{\text{ciljni transkript uzorka}} - Ct_{\text{endogena kontrola uzorka}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kalibrator}} = Ct_{\text{ciljni transkript kalibrator uzorka}} - Ct_{\text{endogena kontrola kalibrator uzorka}}$$

ili

– u relativnim jedinicama kao n-puta razlika ekspresije ciljnog transkripta u tumorskom tkivu (T) u odnosu na ekspresiju ciljnog transkripta u odgovarajućem neizmenjenom tkivu (N), a normalizovan prema endogenoj kontroli po sledećoj jednakosti:

$$T/N = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ gde je}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(T) - \Delta Ct(N)$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{ciljni transkript}} - Ct_{\text{endogena kontrola}}$$

3.2.4.2.2. Određivanje nivoa ekspresije miR-92a

Za određivanje nivoa ekspresije miR-92a korišćena je TaqMan tehnologija. Ova tehnologija je bazirana na 5' nukleaznoj aktivnosti AmpliTaq Gold DNK polimeraze i korišćenju *TaqMan*® MGB probe obeležene fluorescentnom bojom na 5' kraju i "quencher"-om na 3' kraju. Proba je dizajnirana tako da se vezuje za ciljnu sekvencu koja se nalazi između mesta vezivanja dva specifična prajmera. DNK polimeraza seče fluorescentnu boju, što dovodi do njenog udaljavanja od quencher-a i porasta fluorescence. Merenjem povećanja fluorescence nakon dostizanja ciklusa na kome se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag (Ct), procenjuje se količina sintetisanog amplikona. Na ovaj način se postiže maksimalna specifičnost detektovanja amplifikacije

sekvence od interesa (Fraga i sar. 2008). Dizajn i validacija eseja urađeni su od strane proizvođača (Applied Biosystems).

U ovom eksperimentu korišćeni su *TaqMan Universal Master Mix, no AmpErase UNG* (Applied Biosystems, Warrington, UK) i odgovarajući *TaqMan*® komercijalni eseji za miR-92a-3p (ID 000431) i malu nukleolarnu RNK RNU6B (ID 001093) (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), koja je poslužila kao endogena kontrola. Sastav reakcione smeše bio je: 10 µl *TaqMan Universal PCR MasterMix, no AmpErase UNG* (2x), 1 µl *TaqMan Small RNA Assay* (20x), 1,33 µl RT produkta i 7,67 µl vode bez nukleaza. Umnožavanje je urađeno pod sledećim uslovima: aktivacija enzima na 95°C (10 min), zatim 40 ciklusa na temperaturama 95°C (15 s) i 60°C (1 min). Za izračunavanje relativne ekspresije miR-92a korišćena je $\Delta\Delta C_t$ metoda, kao što je opisano u prethodnom poglavlju.

3.2.5. Određivanje nivoa ekspresije proteina VHL korišćenjem imunohistohemijske metode

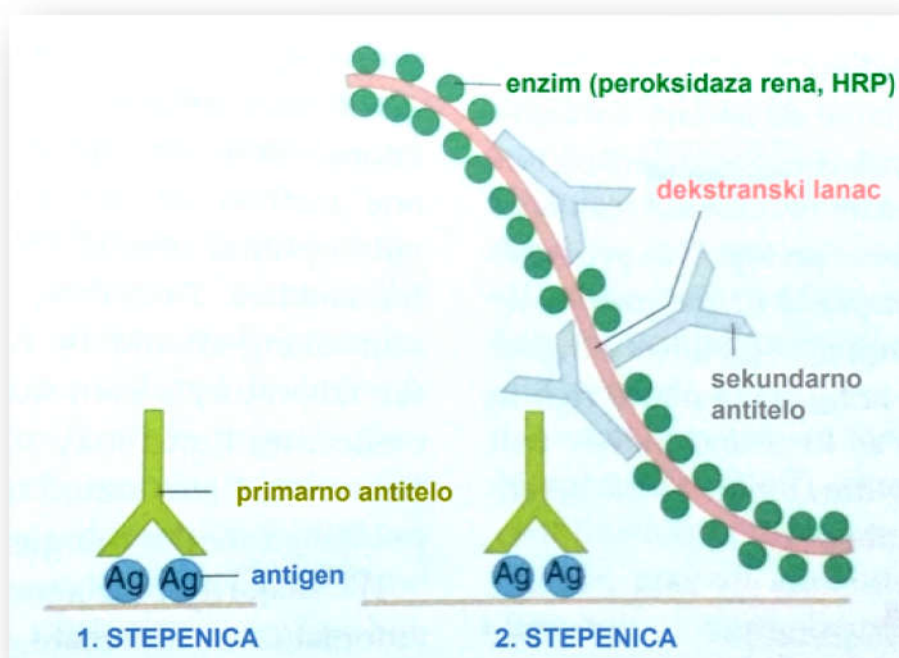
Imunohistohemijskom (engl. *immunohistochemistry*, IHC) metodom određivan je nivo ekspresije proteina VHL u tumorskom i peritumorskom tkivu, upotrebom primarnog mišjeg monoklonskog antitela i primenom visokosenzitivne i specifične dvostepene indirektno imunohistohemijske tehnike.

Za imunohistohemijsku detekciju ekspresije proteina VHL korišćeno je mišje monoklonsko antitelo (VHL, klon G7, sc-17780, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Ovo antitelo je IgG1 klase (κ -laki lanac) i proizvedeno je upotrebom VHL tumorskog supresora, E3 ubikvitin-protein-ligaze i VHL kao antigena, mišjeg porekla. Antitelo prepoznaje aminokiselinsku sekvencu 1–181 mišjeg VHL i detektuje prisustvo ovog proteina u tkivima miša, pacova i čoveka. Antitelo je bilo dostupno u koncentraciji od 200 µg/ml, a u toku IHC analize korišćeno je u razblaženju 1:200.

3.2.5.1. Princip i protokol dvostepene indirektno imunohistohemijske tehnike sa dekstranskim polimernim lancem obeleženim peroksidazom rena

Vizuelizacija ekspresije VHL vršena je primenom visokosenzitivne i specifične dvostepene indirektno imunohistohemijske tehnike u kojoj se koristi dekstranski

polimer za koji su direktno vezana sekundarna antitela u velikom broju i koji je obeležen peroksidazom rena, *Thermo Scientific UltraVision LP Detection System/HRP Polymer & DAB Plus Chromogen* (TL-060-HD, Lab Vision, CA, SAD). Primena ovog polimera eliminiše potrebu za odvojenom aplikacijom vezujućeg antitela i reagenasa obeleženog peroksidazom (**Slika 3.1.**) (Miller 2002; Sanderson i sar. 2019). Polimer ne sadrži avidin ili biotin, tako da je nespecifično bojenje koje je rezultat endogene aktivnosti biotina značajno smanjeno ili eliminisano.



Slika 3.1. Šematski prikaz dvostepene indirektna IHC tehnike sa polimernim lancem obeleženim peroksidazom rena (modifikovano iz Sanderson i sar. 2019).

Demaskiranje antigena vršeno je nakon uobičajenog procesa deparafinizacije i rehidratacije tkivnih preseka. U toku procesa demaskiranja, tkivni preseki su izlagani visokoj temperaturi (97°C) u trajanju od 20 min, u 0,01M rastvoru citratnog pufera, pH 6 *Epitope Retrieval Solution* (Novocastra, Leica), u mikrotalasnoj pećnici (700W). Osnovni cilj koji se postiže demaskiranjem antigena jeste obnavljanje primarne sterične konfiguracije antigena uklanjanjem neželjenih intramolekulskih veza koje nastaju usled formalinske fiksacije i kalupljenja u parafinu, tj. njihovim kidanjem i uklanjanjem kalcijumovih jona (Miller 2002; Sanderson i sar. 2019).

Nakon demaskiranja antigena, blokirana je endogena peroksidaza sa 3% vodenim rastvorom vodonik-peroksida tokom 20 minuta, na sobnoj temperaturi, a zatim su tkivni preseći isprani u fosfatnom puferu i tretirani sa blokirajućim proteinom tokom deset minuta, na sobnoj temperaturi.

Inkubacija tkivnih preseka sa primarnim antitelom sprovedena je u vlažnoj komori tokom noći na 4°C. Kao negativna kontrola služili su preseći koji nisu tretirani primarnim antitelom. Kao pozitivna kontrola služili su uzorci neizmenjenog tkiva bubrega koji su dobijeni prilikom nefrektomije sprovedene u cilju lečenja karcinoma bubrega. Ovo tkivo izabrano je kao pozitivna kontrola na osnovu činjenice da se u njemu izrazito eksprimira VHL u odnosu na druga neizmenjena tkiva čoveka ("The Human Protein Atlas" 2018). Nakon sprovedene inkubacije sa primarnim antitelom tkivni preseći su ispirani u fosfatnom puferu i inkubirani u rastvoru koji sadrži pojačavač ekspresije primarnog antigena (*Primary Antibody Enhancer*), u toku 10 min, na sobnoj temperaturi, a potom ponovo isprani. Zatim su preseći inkubirani u rastvoru dekstranskog polimera na kome su bila vezana sekundarna antitela i koji je bio obeležen peroksidazom rena (*HRP Polymer*), 30 min na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju reakcije antigen-antitelo korišćen je kao hromogen 3,3'-diaminobenzidin – *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*, (Dako, California, USA). Tkivni preseći su bojeni Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom (Merck, Nemačka), u cilju kontrastiranja ćelijskih jedara, a zatim su montirani u medijumu za uklapanje (DPX).

Za rastvaranje svih primarnih antiseruma korišćen je komercijalni rastvarač – *Dako Antibody Diluent* (S0809, Dako, Danska), a za ispiranje preparata između različitih koraka u toku IHC procedure bojenja korišćen je 0,1M fosfatni pufer pH 7,4.

3.2.5.3. Semikvantitativna procena ekspresije VHL

Histološki preparati analizirani su na svetlosnom mikroskopu marke *Carl Zeiss Axio Imager 1.0* sa digitalnom kamerom marke *Canon A640*.

Ekspresija VHL proteina određena je semikvantitativno po sledećem sistemu: 0 – nema imunoreaktivnosti, 1 – <10% pozitivnih ćelija, 2 – 10–50% pozitivnih ćelija, 3 – >50% pozitivnih ćelija (Harasawa i sar. 2011). Procena ekspresije VHL proteina vršena je na

10–15 vidnih polja svakog uzorka, na mikroskopskom uvećanju 40x. Na osnovu odnosa broja ćelija koje pokazuju ekspresiju i ćelija u kojima se protein VHL ne eksprimira, uzorak je svrstavan u određenu kategoriju na osnovu datog semikvantitativnog skora. U jednom vidnom polju uzoraka tumorskih tkiva, broj izbrojanih ćelija bio je između 275 i 291, a u peritumorskom tkivu između 109 i 232.

3.2.6. Statistička obrada dobijenih rezultata

Statistička obrada dobijenih rezultata urađena je u programima SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp.Armonk, NY, SAD) i GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD), koji je korišćen i za vizuelizaciju rezultata. U svim statističkim testovima, vrednost $P \leq 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Distribucija vrednosti kontinualnih varijabli ispitivana je *Kolmogorov–Smirnov* testom. Ekspresioni nivoi ispitivanih molekula nisu bili distribuirani prema normalnoj raspodeli pa su za analizu njihove asocijacije sa kliničkim i patohistološkim parametrima korišćeni neparametrijski statistički testovi: *Mann Whitney U* test, *Kruskal–Wallis* test, *Fisher's exact* test, *Spearman's correlation* test. Za Fišerov test, definisane su podgrupe sa visokom i niskom ekspresijom u odnosu na medijanu. Značaj razlike u ekspresiji među parovima tumorskog i neizmenjenog tireoidnog tkiva ispitivan je pomoću *Wilcoxon matched pairs* testa. Promena u ekspresiji (*fold change*) u tumorskom tkivu u odnosu na neizmenjeno tkivo od istog bolesnika je klasifikovana po sledećem kriterijumu: *fold change* >1 kao „povećana”, *fold change* <1 kao „smanjena”.

Značajnost asocijacije između pojedinih kliničko-patoloških karakteristika i nivoa *VHL* iRNK i miR-92a ekspresije je zatim ispitana metodom univarijantne ili multivarijantne logističke regresije, koja je dala meru asocijacije u obliku količnika verovatnoće (engl. *odds ratio*, OR) sa 95% intervalom pouzdanosti (engl. *95% confidence interval*, 95% CI).

Za analizu preživljavanja obolelih korišćena je *Kaplan–Meier* metoda, kao i *Log–Rank* test za poređenje preživljavanja među ispitivanim grupama.

4. REZULTATI

4.1. Analiza *VHL* u arhivskim uzorcima PTC

U prvom delu studije analiziran je status tumorskog supresora *VHL* – njegova ekspresija na nivou iRNK i potencijalno prisustvo mutacionih promena u kodirajućim regionima ovog gena. Status *VHL* je dalje ispitivan za povezanost sa standardnim kliničkim i histopatološkim parametrima kako bi se ispitaio njegov potencijalni značaj u patogenezi i prognozi PTC. Takođe, analizirana je i korelacija sa prisustvom mutacija u genima *BRAF*, *RAS* i *RET*, koje su često prisutne u ovom tipu karcinoma. Ova grupa bolesnika praćena je nakon inicijalnog tretmana – operacije u periodu od 7–187 meseci i dobijeni podaci su poslužili za procenu prediktivnog potencijala *VHL* za rizik za pojavu recidiva.

4.1.1. Karakteristike grupe bolesnika sa PTC u kojoj su analizirani arhivski uzorci tumora

Grupa obolelih od PTC koji su analizirani u ovom delu studije obuhvatila je 264 bolesnika. U **tabeli 4.1.** dat je prikaz grupe u odnosu na standardne kliničke i patohistološke parametre.

Tabela 4.1. Klinički i patohistološki parametri bolesnika obolelih od PTC uključenih u prvu fazu studije

Klinički parametri	Broj bolesnika
Starost prilikom postavljanja dijagnoze, srednja vrednost ± SD (opseg), godine	47,6 ± 16,1 (8–82)
Pol	
Muški	66 (25,0%)
Ženski	198 (75,0%)
Histopatološke karakteristike tumora	
pT kategorija ¹	
pT1	112 (42,4%)
pT2	41 (15,5%)
pT3	77 (29,2%)
pT4	19 (7,2%)
Nodalne metastaze ²	175 (66,3%)
Udaljene metastaze ³	9 (3,4%)
Veličina tumora, srednja vrednost ± SD (opseg),mm ⁴	23,4 ± 18,7 (1,5–190)
≤ 10 mm	60 (22,7%)
>10 and ≤ 20 mm	86 (32,6%)
> 20 mm	107 (40,5%)
Ekstratireoidno širenje	80 (30,3%)
Vaskularna invazija	54 (20,5%)
Multipli fokusi	88 (33,3%)
Invazija kapsule	107 (40,5%)
Klinički stadijum	
I	142 (53,8%)
II	10 (3,8%)
III	32 (12,1%)
IV	80 (30,3%)
Histopatološka varijanta ⁵	
Klasična	214 (81,1%)
Folikularna	30 (11,4%)
Ostale	19 (7,2%)

¹T kategorija nepoznata u 15 slučajeva. ²Nodalni status nepoznat u 20 slučajeva. ³ Podatak o udaljenim metastazama nepoznat u 5 slučajeva. ⁴Veličina tumora nepoznata u 11 slučajeva. ⁵Histopatološka varijanta nepoznata u jednom slučaju.

4.1.2. Ekspresija *VHL* iRNK u tumorskom tkivu bolesnika sa PTC i njena asocijacija sa kliničko-patološkim parametrima

Vrednosti relativne ekspresije *VHL* iRNK u uzorcima PTC kretale su se u opsegu 0 – 5,611 sa medijanom od 1,171. Uzorci su podeljeni na one sa niskom ekspresijom (vrednosti manje od vrednosti medijane) i one sa visokom ekspresijom (vrednosti jednake ili veće od vrednosti medijane). Vrednosti *VHL* ekspresije su zatim analizirane u odnosu na različite kliničke i patohistološke parametre bolesnika odnosno tumora.

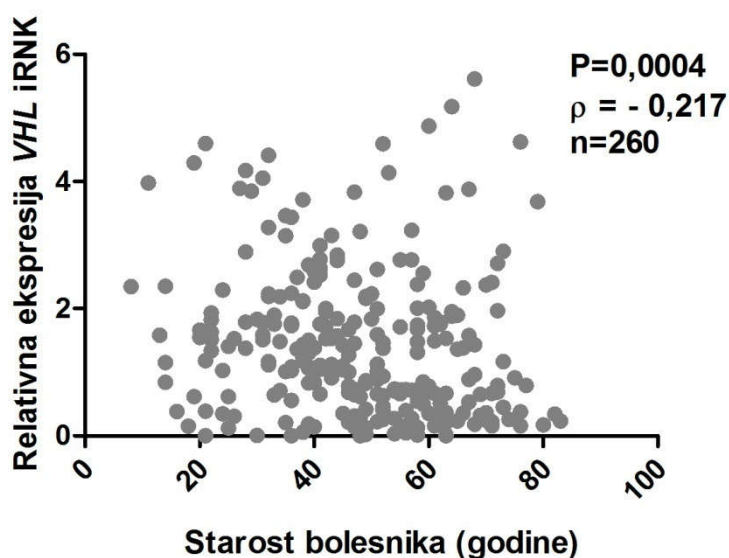
Kada je u pitanju pol bolesnika, nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji *VHL* između muškaraca i žena. U odnosu na starost u trenutku dijagnostikovanja, nađeno je da se niža *VHL* ekspresija značajno češće javlja kod bolesnika kod kojih je bolest dijagnostikovana posle 45. godine života ($P < 0,0001$) nego kod onih kod kojih je dijagnostikovana pre 45-e (61,9% naspram 38,1%). U slučaju visoke ekspresije je obrnuto (33,6% naspram 66,4%) (**Tabela 4.2**).

Tabela 4.2. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa polom i starošću bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze.

Klinički parametar	Broj slučajeva	Niska <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	Visoka <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	P vrednost
Pol				
Muškarci	66	36 (54,5%)	30 (45,5%)	0,477
Žene	198	96 (48,5%)	102 (51,5%)	
Starost prilikom dijagnostikovanja				
< 45 godina	113	38 (33,6%)	75 (66,4%)	<0,0001
≥ 45 godina	147	91 (61,9%)	56 (38,1%)	
N/A	4	3 (75%)	1 (25%)	

P vrednosti su dobijene primenom Fišerovog ili χ^2 testa. Statistički značajni rezultati prikazani su podebljano. N/A- podaci nisu dostupni.

Povezanost niske *VHL* iRNK ekspresije sa starijom životnom dobi potvrđena je Spirmanovim testom koji pokazuje negativnu korelaciju ($P=0,0004$, $\rho=-0,217$) između nivoa *VHL* iRNK i godina života bolesnika (**Grafik 4.1**).



Grafik 4.1. Spirmanov test korelacije nivoa ekspresije *VHL* iRNK i starosti bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze. ρ – koeficijent korelacije.

U **tabeli 4.3.** predstavljeni su rezultati analize potencijalne veze između nivoa ekspresije *VHL* iRNK i veličine primarnog tumora. Poređenjem učestalosti pojave niske i visoke *VHL* ekspresije u tumorima veličine do 10 mm, između 10 i 20 mm i većim od 20 mm nije utvrđena statistički značajna razlika među ovim grupama mada je detektovan statistički trend ka asocijaciji niskog nivoa ekspresije *VHL* sa tumorima većeg dijametra. 54,2% tumora većih od 20 mm imalo je nisku ekspresiju dok je 45,8% imalo visoku ekspresiju. Kod tumora manjih od 20 mm, veća je učestalost onih sa visokim nivoom ekspresije *VHL*.

Tabela 4.3. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa veličinom tumora.

Patološki parametar	Broj slučajeva	Niska <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	Visoka <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	P vrednost
Veličina tumora				
≤ 10 mm	60	29 (48,3%)	31 (51,7%)	0,056*
10 < r ≤ 20 mm	86	36 (41,9%)	50 (58,1%)	
>20 mm	107	58 (54,2%)	49 (45,8%)	
N/A	11	9 (81,8%)	2 (18,2%)	

P vrednost dobijena primenom χ^2 testa. *statistički trend

Spirmanov test korelacije takođe nije dao statistički značajnu povezanost nivoa ekspresije *VHL* sa veličinom tumora (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4. Spirmanov test korelacije nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa veličinom tumora.

Relativna ekspresija <i>VHL</i> iRNK			
	ρ	P vrednost	N
Veličina tumora (mm)	-0,089	0,157	253

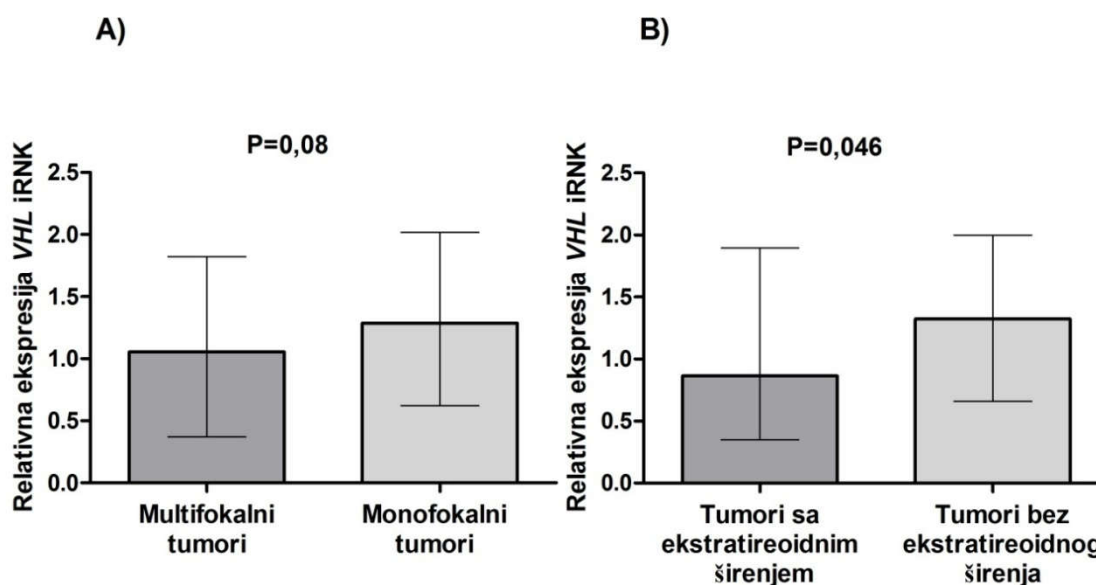
Nivo ekspresije *VHL* nije bio statistički značajno asociran sa fokalnim statusom tumora i statusom invazije kapsule tumora dok je u slučaju ekstratiroidnog širenja tumora i prisustva vaskularne invazije postojao statistički trend ka asocijaciji sa niskim nivoom ekspresije *VHL* (**Tabela 4.5**).

Tabela 4.5. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa fokalnim statusom tumora, prisustvom invazije kapsule, ekstratiroidnog širenja i vaskularne invazije.

Patološki parametar	Broj slučajeva	Niska <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	Visoka <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	P vrednost
Fokalni status tumora				
Multifokalni	88	49 (55,7%)	39 (44,3%)	0,240
Monofokalni	176	83 (47,2%)	93 (52,8%)	
Prisustvo invazije kapsule				
prisutna	107	56 (52,3%)	51 (47,7%)	0,616
odsutna	157	76 (48,4%)	81 (51,6%)	
Prisustvo ekstratiroidnog širenja				
prisutno	80	47 (58,8%)	33 (41,2%)	0,081*
odsutno	184	85 (46,2%)	99 (53,8%)	
Prisustvo vaskularne invazije				
prisutna	54	33 (61,1%)	21 (38,9%)	0,093*
odsutna	210	99 (47,1%)	111 (52,9%)	

P vrednosti dobijene primenom Fišerovog testa. *statistički trend.

Poređenje nivoa relativne ekspresije *VHL* među multifokalnim i monofokalnim tumorima (Man–Vitnijevim testom) dalo je statistički trend ka nižoj ekspresiji u tumorima sa više fokusa (**Grafik 4.2.A**) dok je među tumorima sa ekstratiroidnim širenjem i tumorima bez ekstratiroidnog širenja dobijena statistički značajna razlika (**Grafik 4.2.B**).



Grafik 4.2. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa: A) fokalnim statusom tumora i B) prisustvom ekstratireoidnog širenja. Vrednosti ekspresije predstavljene kao medijana sa interkvartilnim opsegom. P vrednosti dobijene Man–Vitnijevim testom.

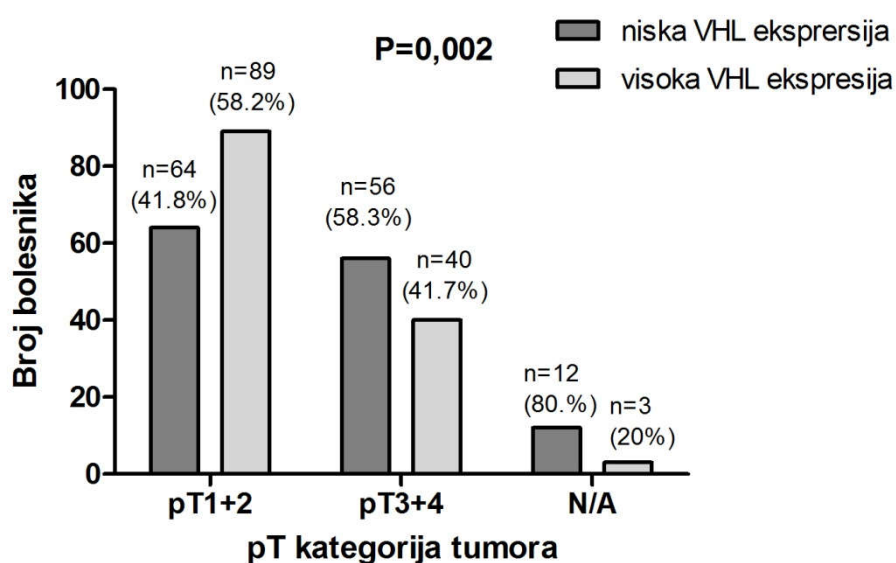
U **tabeli 4.6.** predstavljeni su rezultati analize asocijacije relativne ekspresije *VHL* i metastatskog širenja tumora u vidu metastaza u regionalne limfne čvorove ili u udaljene organe. Nizak nivo ekspresije *VHL* bio je statistički značajno asociiran sa pojavom udaljenih metastaza ($P=0,001$) dok je u slučaju limfnih nodalnih metastaza postojao statistički trend.

Tabela 4.6. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa prisustvom nodalnih i udaljenih metastaza.

Patološki parametar	Broj slučajeva	Niska VHL ekspresija (n=132)	Visoka VHL ekspresija (n=132)	P vrednost
Prisustvo limfnih nodalnih metastaza				
prisutne	175	95/175 (54,3%)	80/175 (45,7%)	0,099*
odsutne	69	27/69 (39,1%)	42/69 (60,9%)	
N/A	20	10/20 (50%)	10/20 (50%)	
Prisustvo udaljenih metastaza				
prisutne	9	8/9 (89%)	1/9 (11%)	0,001
odsutne	250	119/250 (47,6%)	131/250 (52,4%)	
N/A	5	5/5 (100%)	0	

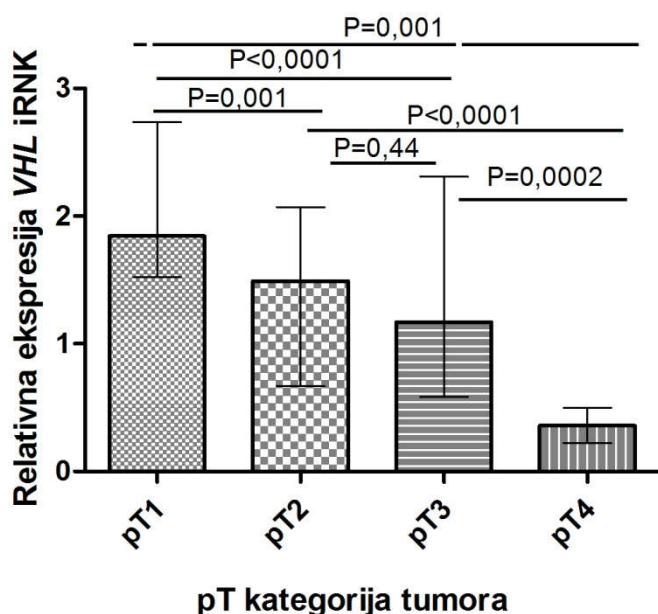
P vrednosti dobijene χ^2 testom. Statistički značajna P vrednost je prikazana podebljano. *statistički trend.

Na **grafiku 4.3.** predstavljeni su rezultati asocijacije nivoa ekspresije *VHL* sa pT statusom tumora koji ukazuju na značajnu vezu niskog nivoa ekspresije *VHL* sa višim pT statusima tumora ($P=0,002$). Podaci o pT statusu bili su dostupni za 249 bolesnika sa PTC. Od toga, 153 bolesnika imalo je pT1 ili pT2 status tumora dok je 96 bolesnika imalo pT3 ili pT4. U grupi pT3 i pT4 tumora veću zastupljenost imali su tumori sa niskim nivoom ekspresije *VHL*, 56 (58,3%) naspram 40 (41,7%) sa visokom. U grupi pT1 i pT2 tumora učestaliji su tumori sa visokim nivoom ekspresije *VHL*, 89 (58,2%) naspram 64 (41,8%) koji se odlikuju niskim nivoom ekspresije *VHL*.



Grafik 4.3. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa pT statusom tumora. P vrednost je dobijena primenom χ^2 testa. N/A-podaci nedostupni.

Poređenje relativne ekspresije *VHL* u grupama tumora sa različitim pT statusom dalo je statistički značajnu razliku među njima, sa trendom ka opadanju nivoa ekspresije *VHL* u grupama sa višim pT statusom. Najniži nivo ekspresije *VHL* imali su tumori pT4 kategorije, a značajno niža ekspresija je detektovana i u pT2 i pT3 tumorima u odnosu na pT1 (**Grafik 4.4**).



Grafik 4.4. Relativna ekspresija *VHL* iRNK u grupama tumora sa različitim pT statusom. Vrednosti *VHL* ekspresije predstavljene kao medijana sa interkvartilnim opsegom. P vrednosti dobijene primenom Man–Vitnijevog testa.

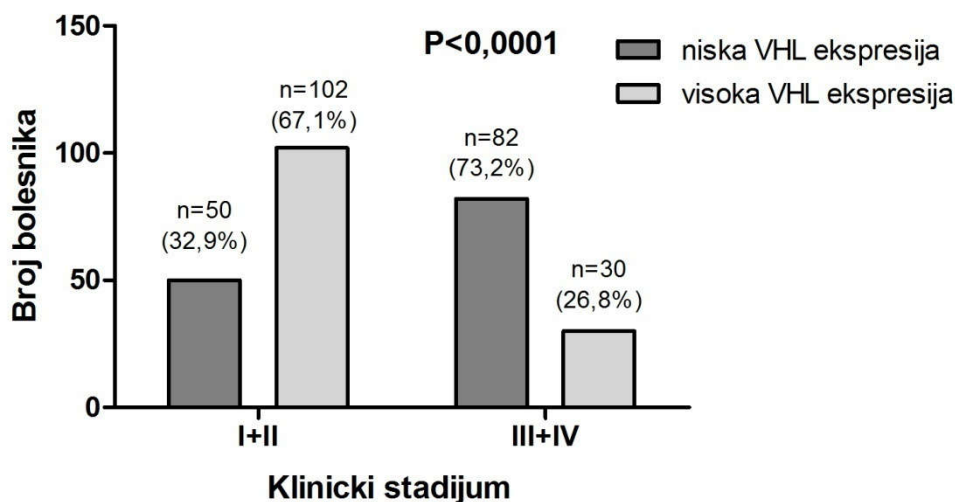
Spirmanov test korelacije dao je značajan koeficijent korelacije, što ukazuje na postojanje negativne korelacije između nivoa ekspresije *VHL* i pT statusa tumora (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7. Spirmanov test korelacije nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa pT kategorijom tumora.

Relativna ekspresija <i>VHL</i> iRNK			
	ρ	P vrednost	N
pT kategorija tumora	0,159	0,012	249

Statistički značajna razlika u učestalosti niskog i visokog nivoa ekspresije *VHL* dobijena je takođe i između grupe bolesnika sa nižim kliničkim stadijumima bolesti (prvi i drugi) i grupe sa višim kliničkim stadijumima bolesti (treći i četvrti) ($P<0,0001$). Od 152 bolesnika koji su bili u jednom od nižih kliničkih stadijuma, njih 50 (32,9%) imalo je nizak nivo ekspresije *VHL*, a 102 (67,1%) je imalo visok nivo ekspresije *VHL*. U grupi od 112 bolesnika koji su bili u nekom od viših stadijuma, čak 82 (73,2%) imalo je nizak

nivo ekspresije *VHL* naspram 30 (26,8%) sa visokim nivoom ekspresije *VHL* (**Grafik 4.5**).



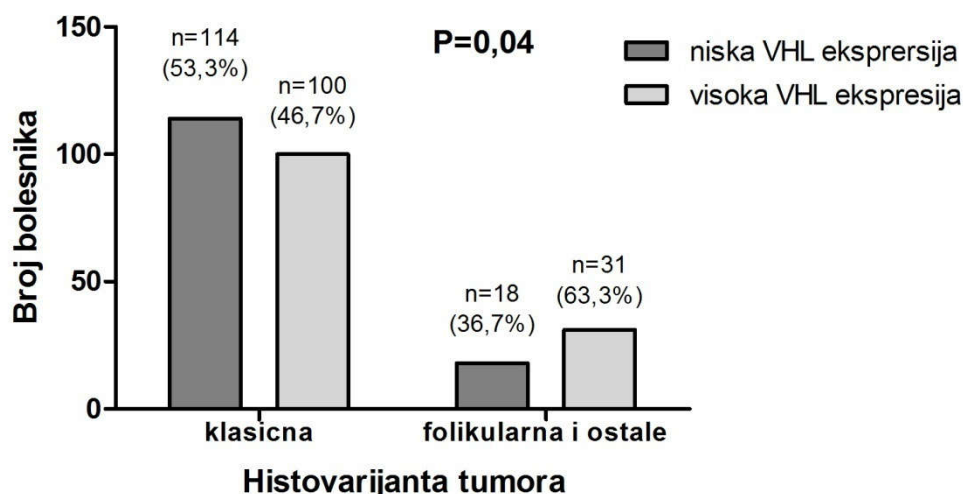
Grafik 4.5. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa kliničkim stadijumom kod bolesnika sa PTC. P vrednost je dobijena primenom Fišerovog testa.

Spirmanov test korelacije dao je značajnu negativnu korelaciju između relativne ekspresije *VHL* i kliničkog stadijuma bolesti (**Tabela 4.8**).

Tabela 4.8. Spirmanov test korelacije nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa kliničkim stadijumom bolesti.

	Relativna ekspresija <i>VHL</i> iRNK		
	ρ	P vrednost	N
Klinički stadijum bolesti	0,3981	<0.0001	264

Analiza nivoa ekspresije *VHL* u tumorima različitih histopatoloških varijanti pokazala je da se nizak nivo ekspresije *VHL* češće detektuje od visokog (53,3% slučajeva naspram 46,7% slučajeva) u tumorima koji imaju karakteristike klasične histovarijante, dok se u tumorima ostalih histovarijanti češće registruje visok nivo ekspresije *VHL* (63,3% slučajeva naspram 36,7% slučajeva) ($P=0,04$) (**Grafik 4.6**).



Grafik 4.6. Nivo ekspresije *VHL* u različitim histovarijantama PTC tumora. P vrednost dobijena je Fišerovim testom. Za jednog bolesnika nedostupan podatak o histovarijanti, nije prikazano.

4.1.3. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK sa varijantama gena *BRAF*, *RAS* i *RET*

4.1.3.1. Prikaz bolesnika sa PTC u odnosu na mutacioni status gena *BRAF*, *RAS* i *RET*

Podaci o mutacionom statusu gena koji su najčešće asocirani sa tumorigenezom PTC prikazani su u **tabeli 4.9**. Kod 153 bolesnika (58%) detektovane su mutacije u genima *BRAF* i *RAS* ili rearanžmani *RET/PTC*, dok kod 111 bolesnika (42%) nisu detektovane mutacije u ispitivanim regionima gena od interesa. 85 bolesnika (56%) posedovalo je mutaciju u genu *BRAF*, 11 bolesnika (7%) u genima *H*-, *K*- ili *N-RAS*, 44 bolesnika (29%) je posedovalo rearanžman *RET-PTC1* dok je njih 13 (9%) posedovalo rearanžman *RET-PTC3*.

Tabela 4.9. Mutacioni status gena *BRAF*, *RAS* i *RET* u grupi bolesnika sa PTC

Gen	Broj bolesnika sa alternativnom varijantom datog gena
<i>BRAF</i>	85/153 (56%)
<i>RAS</i>	11/153 (7%)
<i>RET/PTC1</i>	44/153 (29%)
<i>RET/PTC3</i>	13/153 (9%)
Ukupno	153 /264 (58%)
Nepoznato	111/264 (42%)

4.1.3.2. Relativni nivo ekspresije *VHL* iRNK u korelaciji sa mutacionim statusom gena *BRAF*, *RAS* i *RET*

Nije nađena statistički značajna veza između nivoa ekspresije *VHL* i mutacionog statusa gena *BRAF*, *RAS* i *RET* (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Učestalost niskog i visokog nivoa ekspresije *VHL* u grupama sa i bez detektovanih genetičkih promena u genima *BRAF*, *RAS* i *RET*.

	Broj slučajeva	Niska <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	Visoka <i>VHL</i> ekspresija (n=132)	P vrednost
<i>BRAF</i>	85	38 (28,8%)	47 (35,6%)	0,298
<i>RAS</i>	11	5 (3,8%)	6 (4,5%)	
<i>RET/PTC1</i>	44	22 (16,7%)	22 (16,7%)	
<i>RET/PTC3</i>	13	10 (7,5%)	3 (2,3%)	
N/A	111	57(43,2%)	54 (40,9%)	

N/A- nije detektovano prisustvo ispitivanih mutacija ili rearanžmana. P vrednost dobijena χ^2 testom.

4.1.4. Rezultati logističke regresije

Značajnost asocijacije između pojedinih kliničko-patoloških karakteristika i nivoa ekspresije *VHL* iRNK je zatim ispitana metodom multivarijantne logističke regresije. Kako je prikazano u **tabeli 4.11.**, samo za tri nezavisna faktora: klasična histovarijanta, multifokalnost i uznapredovali klinički stadijum dobijena je statistička značajnost. Najjači prediktor niskog nivoa ekspresije *VHL* bio je uznapredovali klinički stadijum (III i IV) čiji je količnik verovatnoće bio 5,78. To pokazuje da se kod bolesnika koji su u uznapredovalom stadijumu bolesti preko 5 puta češće registruje nizak nivo ekspresije *VHL* u odnosu na bolesnike koji su u nižim stadijumima bolesti.

Tabela 4.11. Analiza korelacije između kliničko-patoloških karakteristika i nivoa ekspresije *VHL* u PTC tkivu metodom logističke regresije.

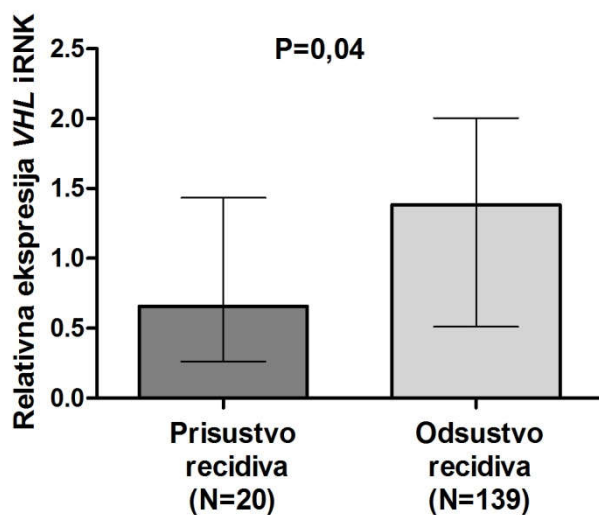
Parametar	Poređenje	OR	95% CI	P vrednost
Histološka varijanta	klasična vs. ostale	2,92	1,330–6,440	0,008
Histološka varijanta	klasična vs. folikularna	2,62	1,010–6,790	0,047
Fokalni status tumora	multifokalni vs.monofokalni	1,96	1,060–3,620	0,031
Ekstratireoidno širenje	prisutno vs.odsutno	1,67	0,398–6,993	0,484
Invazija kapsule	prisutna vs.odsutna	0,67	0,238–1,870	0,441
Limfne nodalne metastaze	prisutne vs.odsutne	0,77	0,356-1,669	0,509
Udaljene metastaze	prisutne vs.odsutne	4,02	0,395-4,896	0,240
Vaskularna invazija	prisutna vs.odsutna	1,24	0,412-3,725	0,703
pT kategorija	3+4 vs. 1+2	0,58	0,167-2,037	0,398
Klinički stadijum	III+IV vs. I+II	5,78	3,170-10,530	<0,0001
Prisustvo mutacija u <i>BRAF</i> , <i>RAS</i> i <i>RET</i> gena	prisutne vs.odsutne	0,74	0,391-1,396	0,352

OR-količnik verovatnoće (engl. *Odds Ratio*); 95% CI- 95% Interval poverenja (engl. *Confidence Interval*). Predikovani probabilitet je za nisku ekspresiju *VHL*.

4.1.5. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* sa preživljavanjem bolesnika sa PTC

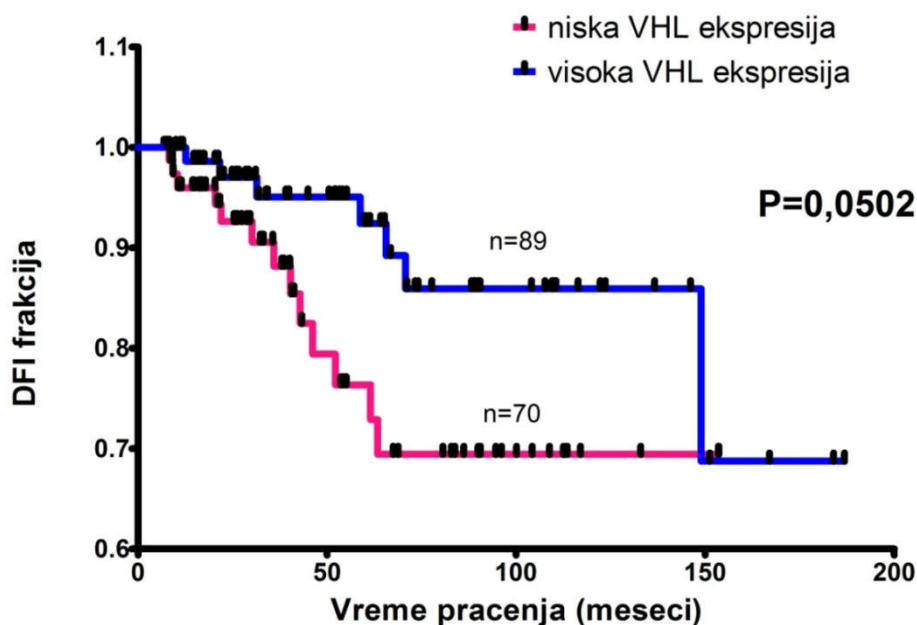
Podaci o praćenju i preživljavanju bolesnika sa PTC bili su dostupni za njih 159 iz ispitivane grupe. Srednja vrednost vremena praćenja \pm SD iznosila je $53,1 \pm 41,6$ meseci (opseg 7–187). Od toga, 56 bolesnika praćeno je ≥ 60 meseci a 103 bolesnika praćeno je < 60 meseci. Određivan je broj recidiva, smrtnih ishoda i DFI (eng. *disease-free interval*), koji označava vremenski period od početka bolesti do znakova progresije bolesti – recidiva (Robinson, Booth, i Eisenhauer 2014). Ukupno je zabeleženo 20 recidiva (12,6%), od kojih je 15 bolesnika (75%) imalo recidiv u regionalnim ili lokalnim limfnim čvorovima a 5 bolesnika (25%) u udaljenim organima kao što su pluća, kosti i mozak. U celoj grupi zabeleženo je 15 smrtnih ishoda (9,4%), od toga 6 bolesnika umrlo je od posledica progresije bolesti, jedan od srčanog udara a za 8 bolesnika nije preciziran uzrok smrti.

Poređenje relativne ekspresije *VHL* u odnosu na pojavu recidiva pokazalo je da su bolesnici kod kojih je došlo do pojave recidiva imali statistički značajno ($P=0,04$) niži nivo ekspresije *VHL* u odnosu na grupu bolesnika kod kojih nije došlo do pojave recidiva u toku perioda praćenja (**Grafik 4.7**).



Grafik 4.7. Nivo ekspresije *VHL* u primarnom tumorskom tkivu u grupama bolesnika sa i bez recidiva. Vrednosti relativne ekspresije *VHL* iRNK predstavljene su kao medijana sa interkvartilnim opsegom. P vrednost je dobijena primenom Man–Vitnijeovog testa.

Kaplan–Majerova analiza je pokazala granično značajnu vezu između niskog nivoa ekspresije *VHL* i kraćeg vremenskog perioda bez ikakvih simptoma bolesti (**Grafik 4.8**).

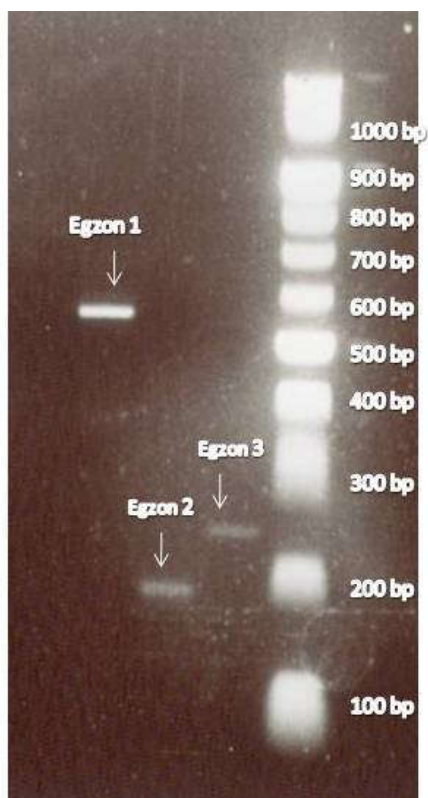


Grafik 4.8. Kaplan–Majerova kriva preživljavanja bolesnika sa PTC u odnosu na nivo *VHL* ekspresije. P vrednost je dobijena primenom Log–Rank testa.

4.1.6. Analiza mutacionog statusa gena *VHL* u uzorcima PTC

4.1.6.1. Rezultati provere specifičnosti PCR amplifikacije elektroforezom na agaroznom gelu

Na **slici 4.1.** prikazani su produkti PCR amplifikacije sva tri egzona *VHL* gena koji se uočavaju u vidu traka dužine 611 bp (egzon 1), 208 bp (egzon 2) i 266 bp (egzon 3).



Slika 4.1. Prikaz produkata PCR amplifikacije egzona gena *VHL* nakon elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Za proveru dužine amplifikovanih fragmenata korišćen je standardni marker *O'GeneRuler™ DNA ladders*, Thermo Fisher Scientific, SAD): bp-bazni par

4.1.6.2. Rezultati sekvenciranja egzona 1, 2 i 3 gena *VHL*

Direktno sekvenciranje kodirajućih regiona gena *VHL* nije pokazalo prisustvo mutacionih promena u njima tj. nije utvrdilo postojanje različitih varijanti ovog gena u grupi od 264 PTC uzoraka.

4.2. Analiza nivoa ekspresije VHL u sveže zamrznutim uzorcima tkiva

Da bi se ispitao značaj veličine promene (engl. *fold change*) nivoa ekspresije *VHL* u tumorskom tkivu u odnosu na odgovarajuće neizmenjeno tireoidno tkivo istog bolesnika, u studiju je uključen i jedan broj bolesnika sa PTC od kojih su neposredno nakon operacije dobijeni parovi tumorskog i neizmenjenog tireoidnog tkiva. Osim analize promene nivoa ekspresije *VHL* iRNK, u ovom delu studije ispitan je i nivo ekspresije proteina VHL u PTC i peritumorskom tkivu gde je to bilo moguće.

4.2.1. Karakteristike grupe bolesnika sa PTC u kojoj su analizirani sveže zamrznuti uzorci tkiva

Grupa obolelih od PTC koji su analizirani u ovom delu studije obuhvatila je 42 bolesnika. U **tabeli 4.12.** dat je prikaz grupe u odnosu na standardne kliničke i patološke parametre.

Tabela 4.12. Klinički i patohistološki parametri bolesnika obolelih od PTC uključenih u drugu fazu studije

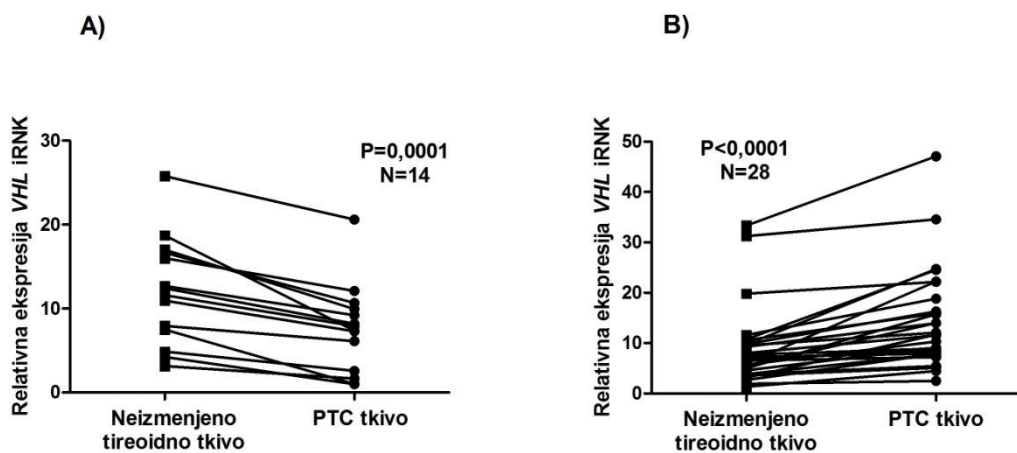
Klinički parametri	Broj bolesnika
Starost prilikom postavljanja dijagnoze, srednja vrednost \pm SD (opseg), godine	42,57 \pm 17,48 (12–77)
Pol	
Muški	12 (28,6%)
Ženski	30 (71,4%)
Histopatološke karakteristike tumora	
pT kategorija	
pT1	1 (2%)
pT2	19 (45%)
pT3	14 (33%)
pT4	8 (19%)
Nodalne metastaze	
prisutne	11 (26%)
odsutne	31 (74%)
Veličina tumora, srednja vrednost \pm SD	33,6 \pm 15,1 (8–90)
\leq 10 mm	1 (2,4%)
>10 and \leq 20 mm	9 (21,4%)
> 20 mm	32 (76,2%)
Ekstratireoidno širenje ¹	
prisutno	9 (22%)
odsutno	32 (76%)
Vaskularna invazija ²	
prisutna	16 (38%)
odsutna	25 (60%)
Fokalni status ³	
multifokalni	13 (31%)
monofokalni	28 (67%)
Invazija kapsule	
prisutna	24 (57%)
odsutna	18 (43%)
Klinički stadijum	
I	28 (67%)
II	6 (14%)
III	8 (19%)
Histopatološka varijanta ⁴	
Klasična	20 (48%)
Folikularna	17 (40%)
Ostale ⁵	4 (10%)

^{1,2,3,4}Podaci nedostupni u jednom slučaju. ⁵Ostale histopatološke varijante uključuju 3 solidne i jednu parcijalno anaplastičnu.

4.2.2. Nivo ekspresije *VHL* iRNK u tireoidnom tkivu bolesnika sa PTC i njena asocijacija sa kliničko-patološkim parametrima

U ovom delu studije, ekspresija *VHL* iRNK je paralelno analizirana u parovima PTC i odgovarajućeg neizmenjenog tireoidnog tkiva. Smer i veličina promene u nivoima ekspresije *VHL* izražena je kao broj puta – engl. *fold change*, za koji je nivo ekspresije u tumorskom tkivu povišen ili snižen u odnosu na odgovarajuće neizmenjeno tireoidno tkivo.

Analiza nivoa ekspresije *VHL* iRNK u tumorskom tkivu i njene promene u odnosu na neizmenjeno tireoidno tkivo istog bolesnika pokazala je da je u 14 (33%) slučajeva nivo ekspresije *VHL* bio niži a u 28 (67%) slučajeva nivo ekspresije *VHL* bio je viši u tumorskom u odnosu na neizmenjeno tkivo. Vrednost *fold change* kretala se u intervalu od 0,14 – 3,72 puta (7,14 puta manja do 3,72 puta veća). Prosečno smanjenje je iznosilo 2,2 puta a prosečno povećanje 1,87 puta. U obe grupe dobijena je statistički značajna razlika u nivou ekspresije *VHL* između tumorskog i odgovarajućeg neizmenjenog tkiva (**Grafik 4.9**).



Grafik 4.9. Promena nivoa ekspresije *VHL* iRNK u PTC tkivu u odnosu na neizmenjeno tireoidno tkivo. A) grupa bolesnika kod kojih je *VHL* ekspresija snižena u tumorskom tkivu, B) grupa bolesnika kod kojih je *VHL* ekspresija povišena. P vrednost dobijena je primenom Vilkoksonovog testa ranga.

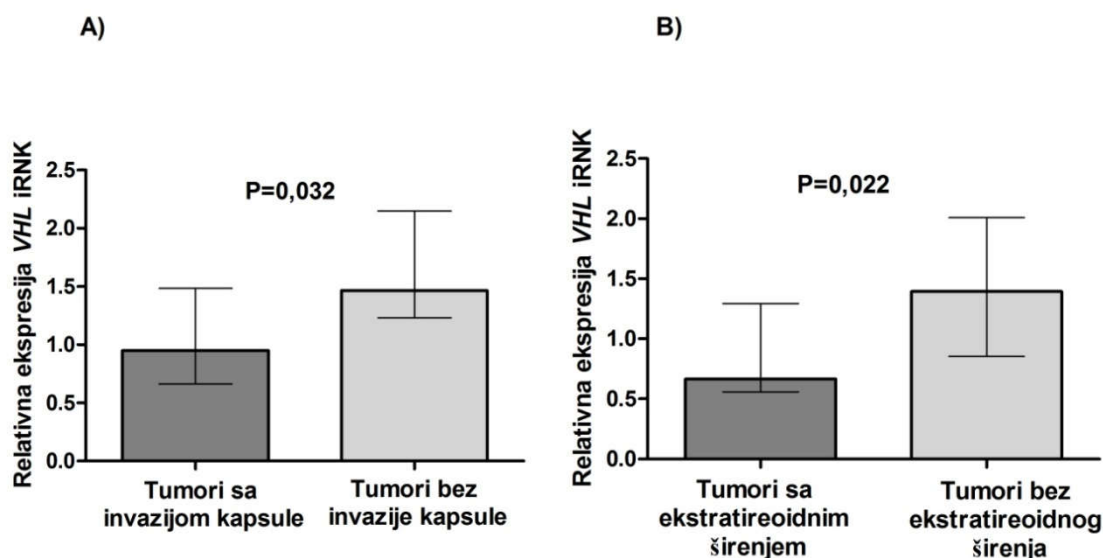
Analiza korelacije nivoa *VHL* ekspresije sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama dala je sledeće rezultate (**Tabela 4.13**).

Tabela 4.13. Promena nivoa ekspresije *VHL* u korelaciji sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih od PTC.

Kliničko-patološki parametar	Broj slučajeva	Promena <i>VHL</i> iRNK ekspresije	P vrednost
Pol			
Muškarci	12	1,497 (0,566–2,478)	0,878
Žene	30	1,228 (0,748–1,540)	
Starost prilikom			
<45 godina	25	1,436 (0,927–1,968)	0,249
≥ 45 godina	17	1,165 (0,659–1,496)	
Veličina tumora			
≤ 20 mm	10	1,147 (0,620–1,401)	0,198
> 20 mm	32	1,359 (0,756–1,968)	
pT status			
pT1+2	20	1,346 (1,104–1,922)	0,284
pT3+4	22	1,130 (0,627–1,845)	
Fokalni status tumora			
Multifokalni	13	0,799 (0,663–1,559)	0,174
Monofokalni	28	1,394 (1,102–2,402)	
Invazija kapsule			
prisutna	24	0,950 (0,661–1,484)	0,032
odsutna	18	1,465 (1,230–2,149)	
Prisustvo ekstrahir. širenja			
prisutno	9	0,667 (0,559–1,295)	0,022
odsutno	32	1,394 (0,853–2,009)	
Prisustvo vaskularne invazije			
prisutna	16	1,104 (0,646–1,477)	0,169
odsutna	25	1,417 (0,785–1,886)	
Limfne nodalne metastaze			
prisutne	11	0,756 (0,642–1,501)	0,097*
odsutne	31	1,413 (0,799–2,023)	
Histološka varijanta			
klasična	20	1,113 (0,661–1,589)	0,235
folikularna+ostale	21	1,417 (1,105–1,995)	
Klinički stadijum			
I+II	34	1,346 (0,748–1,845)	0,471
III	8	0,978 (0,661–2,063)	

Vrednosti relativne ekspresije *VHL* su predstavljene kao medijane sa interkvartilnim opsegom. P vrednosti dobijene primenom Man–Vitnijičevog testa. Značajne P vrednosti prikazane podebljano. *Statistički trend.

Tumori kod kojih postoji invazija tumorske kapsule i tumori sa ekstratireoidnim širenjem imali su statistički značajno niži nivo ekspresije *VHL* u tumorskom tkivu u poređenju sa neizmenjenim tireoidnim tkivom (**Grafik 4.10. A i B**). Isti trend dobijen je i u analizi tumora sa prisutnim limfnim nodalnim metastazama.



Grafik 4.10. Asocijacija nivoa ekspresije *VHL* sa A) invazijom kapsule i B) prisustvom ekstratireoidnog širenja. Vrednosti ekspresije predstavljene kao medijana sa interkvartilnim opsegom. P vrednosti dobijene Man–Vitnjevim testom.

U **tabeli 4.14.** prikazani su rezultati Spirmanovog testa korelacije između vrednosti promene nivoa *VHL* i starosti bolesnika, veličine tumora, pT kategorije i kliničkog stadijuma. Ni u jednom slučaju nije dobijen značajan koeficijent korelacije.

Tabela 4.14. Spirmanov test korelacije promene ekspresije *VHL* iRNA sa kliničkim i patološkim parametrima.

	Relativna <i>VHL</i> iRNA ekspresija	
	ρ	P vrednost
Starost bolesnika (godine) prilikom dijagnostikovanja	-0,165	0,300
Veličina tumora	0,267	0,088
pT kategorija	-0,091	0,565
Klinički stadijum	-0,199	0,204

Rezultati logističke regresije (**Tabela 4.15**) ukazali su na to da je ekstratireoidno širenje asocirano sa niskim nivoom ekspresije *VHL* u tumorskom tkivu tj. verovatnoća da nivo ekspresije *VHL* bude snižen je 4 puta veća ukoliko postoji ekstratireoidno širenje. Trend ka asocijaciji sa niskim nivoom ekspresije *VHL* dobijen je u slučaju postojanja invazije tumorske kapsule i limfnih nodalnih metastaza. Ostali parametri nisu bili značajni prediktori nivoa ekspresije *VHL*.

Tabela 4.15. Analiza korelacije između kliničko-patoloških karakteristika i promena u nivou ekspresije *VHL* u PTC tkivu metodom logističke regresije.

Parametar	Poređenje	Odds Ratio	95% CI	P vrednost
Ekstratireoidno širenje	prisutno vs. odsutno	4,07	1,147–14,493	0,038
Invazija kapsule	prisutna vs. odsutna	2,54	0,894–7,194	0,080*
Limfne nodalne metastaze	prisutne vs. odsutne	2,58	0,897–7,463	0,079*
Histovarijanta	klasična vs.ostale	1,12	0,439–2,882	0,806
Fokalni status	multifokalni vs. monofokalni	2,30	0,842–6,250	0,104
Vaskularna invazija	prisutna vs. odsutna	1,64	0,649–4,149	0,296
pT kategorija	3+4 vs.1+2	2,01	0,684–5,917	0,204
Klinički stadijum	III vs. I+II	1,59	0,543–4,651	0,398

OR – količnik verovatnoće (engl. *Odds Ratio*); 95% CI – 95% Interval poverenja (engl. *Confidence Interval*). Značajna P vrednost je prikazana podebljano. *Statistički trend. Predikovan je probabilitet za nisku *VHL* ekspresiju.

4.3. Analiza ekspresije miR-92a u uzorcima PTC

S obzirom na rezultate drugih studija koji ukazuju na to da u nekim tipovima malignih tumora miR-92a direktno reguliše ekspresiju VHL (Ghosh i sar. 2009), kako bi ispitali da li bi to mogao da bude slučaj i u PTC, u našim uzorcima je takođe ispitivan i nivo ekspresije miR-92a, koji je zatim korelisan sa nivoom ekspresije *VHL* i to kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina. MiR-92a je jedna od prvih mikroRNK okarakterisanih kao onkogene mikroRNK, te je analizom korelacije sa kliničko-patološkim parametrima PTC ispitan i njen potencijalni značaj u patogenezi ovog tipa karcinoma.

4.3.1. Karakteristike grupe bolesnika sa PTC kod kojih je analizirana ekspresija miR-92a

Grupa obolelih od PTC kod kojih je ispitivana ekspresija miR-92a obuhvatila je 36 bolesnika. U **tabeli 4.16.** dat je prikaz grupe u odnosu na standardne kliničke i histopatološke parametre.

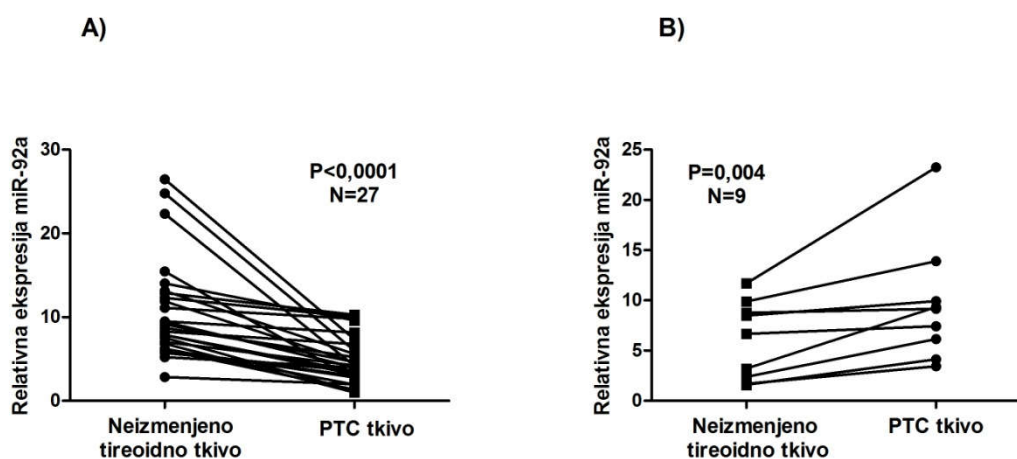
Tabela 4.16. Klinički i patohistološki parametri bolesnika obolelih od PTC kod kojih je analizirana ekspresija miR-92a.

Klinički parametri	Broj bolesnika
Starost prilikom postavljanja dijagnoze, srednja vrednost ± SD (opseg), godine	41,42 ± 17,26 (12–77)
Pol	
Muški	7 (19,4%)
Ženski	29 (80,6%)
Histopatološke karakteristike tumora	
pT kategorija	
pT1	2 (5,6%)
pT2	19 (52,8%)
pT3	8 (22,2%)
pT4	7 (19,4%)
Nodalne metastaze	
prisutne	10 (28%)
odsutne	26 (72%)
Veličina tumora, srednja vrednost ± SD	29,92 ± 12,91 (8–60)
≤ 10 mm	1 (2,8%)
>10 and ≤ 20 mm	10 (27,8%)
> 20 mm	25 (69,4%)
Ekstratireoidno širenje	
prisutno	8 (22%)
odsutno	28 (78%)
Vaskularna invazija	
prisutna	12 (33%)
odsutna	24 (67%)
Fokalni status ¹	
multifokalni	12 (33%)
monofokalni	23 (64%)
Invazija kapsule	
prisutna	20 (56%)
odsutna	16 (44%)
Klinički stadijum	
I	26 (72%)
II	5 (14%)
III	5 (14%)
Histopatološka varijanta ²	
Klasična	28 (50%)
Folikularna	16 (44%)
Solidna	1 (3%)

^{1,2}Fokalni status i histopatološka varijanta nepoznati u jednom slučaju.

4.3.2. Nivo ekspresije miR-92a kod bolesnika sa PTC i njena asocijacija sa kliničko-patološkim parametrima

Nivo ekspresije miR-92a paralelno je analiziran u parovima PTC i odgovarajućeg neizmenjenog tireoidnog tkiva. Promene u nivoima ekspresije u tumorskim tkivima u odnosu na odgovarajuća neizmenjena tkiva kretala se u opsegu 0,15 – 2,89 puta (6,8 puta manja do 2,89 puta veća). Kod 27 (75%) bolesnika nivo ekspresije miR-92a u tumorskom tkivu bio je niži od onog u odgovarajućim neizmenjenim tireoidnim tkivima, dok je kod 9 (25%) bolesnika ekspresija u tumorskom tkivu bila viša (**Grafik 4.11**). Prosečno smanjenje je iznosilo 2,7 puta, a povećanje 1,9 puta.



Grafik 4.11. Promene u nivoima ekspresije miR-92a u PTC tkivu u odnosu na neizmenjeno tireoidno tkivo. A) grupa bolesnika kod kojih je ekspresija miR-92a bila snižena u tumorskom tkivu, B) grupa bolesnika kod kojih je ekspresija bila povišena. P vrednost dobijena je primenom Vilkoksonovog testa ranga.

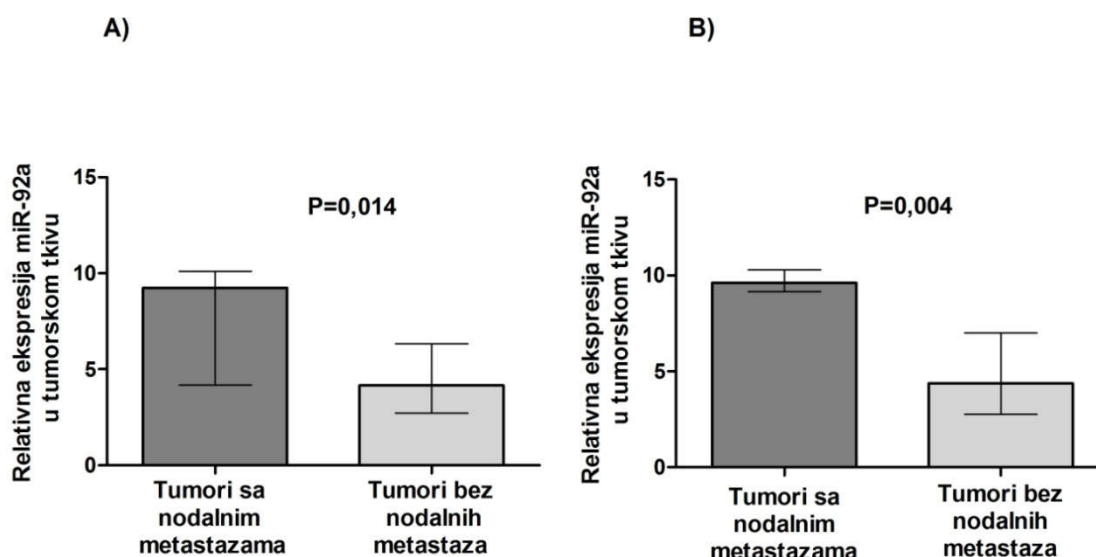
Analiza korelacije između kliničko-patoloških parametara bolesnika i relativne ekspresije miR-92a samo među tumorskim tkivima dala je sledeće rezultate (**Tabela 4.17**).

Tabela 4.17. Asocijacija nivoa relativne ekspresije miR-92a u tumorskom tkivu sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama.

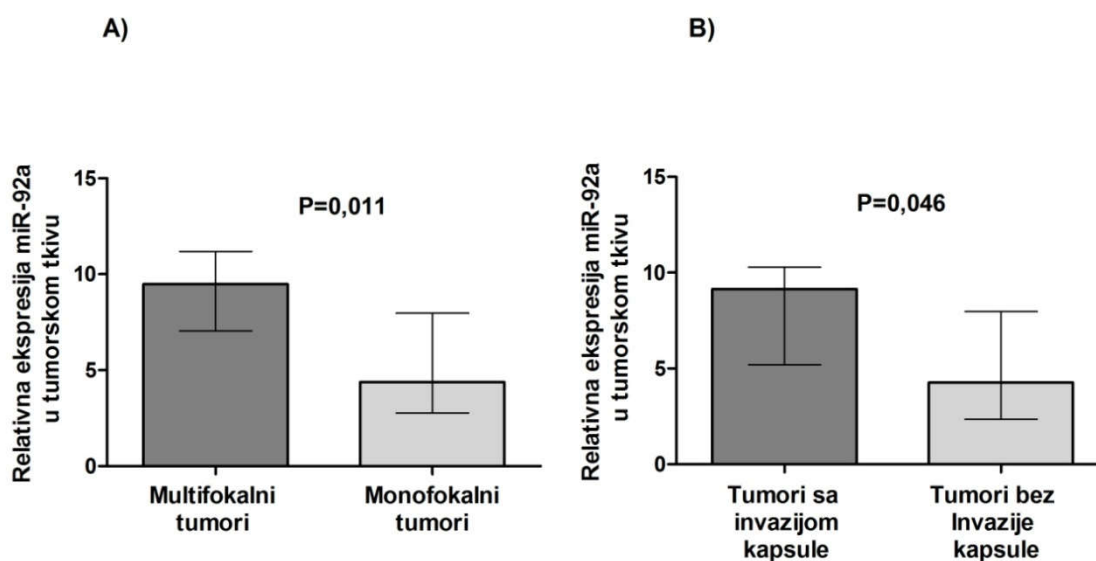
Kliničko-patološki parametar	Broj slučajeva	Relativna ekspresija miR-92a u tumorskom tkivu	P vrednost
Pol			
Muškarci	7	7,418 (2,996–9,788)	0,300
Žene	29	4,231 (3,307–7,763)	
Starost prilikom dijagnostikovanja			
≤ 45 godina	23	5,979 (3,531–9,613)	0,081*
>45 godina	13	4,008 (2,886–5,404)	
Veličina tumora			
≤ 20 mm	11	4,193 (3,156–7,418)	0,471
> 20 mm	25	4,643 (3,227–9,700)	
pT status			
pT1+2	21	4,231 (2,998–7,072)	0,352
pT3+4	15	4,643 (3,156–9,613)	
Fokalni status tumora			
multifokalni	12	6,699 (2,831–9,842)	0,179
monofokalni	23	4,231 (3,531–6,793)	
Invazija kapsule			
prisutna	20	5,591 (3,369–9,544)	0,157
odsutna	16	4,062 (2,350–7,212)	
Prisustvo ekstrahir. širenja			
prisutno	8	6,897 (3,369–9,544)	0,530
odsutno	28	4,399 (3,111–7,401)	
Prisustvo vaskular. invazije			
prisutna	12	5,870 (3,696–9,291)	0,261
odsutna	24	4,186 (2,693–7,968)	
Limfne nodalne metastaze			
prisutne	10	9,244 (4,175–10,110)	0,014
odustne	26	4,167 (2,717–6,322)	
Histološka varijanta			
klasična	18	5,591 (3,795–9,406)	0,173
folikularna+ostale	17	3,983 (2,657–7,385)	
Klinički stadijum			
I+II	31	5,202 (3,531–9,151)	0,253
III	5	3,156 (2,462–6,963)	

Vrednosti relativne ekspresije miR-92a su prikazane kao medijane sa interkvartilnim opsegom. P vrednosti dobijene primenom Man-Vitnijevoog testa. Značajna P vrednost prikazana podebljano. *Statistički trend.

Poređenje nivoa ekspresije miR-92a među tumorskim tkivima je pokazalo da tumori kod kojih su detektovane limfne nodalne metastaze imaju značajno viši nivo ekspresije miR-92a u poređenju sa tumorima kod kojih nema nodalnih metastaza, što je naročito bilo izraženo kod bolesnika mlađih od 45 godina (**Grafik 4.12.A i B**). Kod bolesnika mlađih od 45 generalno je utvrđen trend ka višoj ekspresiji miR-92a u odnosu na bolesnike koji su stariji od 45. U ovoj grupi je takođe dobijena i značajna povezanost visokog nivoa ekspresije miR-92a sa prisustvom kapsularne invazije i multifokalnosti (**Grafik 4.13.A i B**). Kada su u pitanju ostale kliničke i patohistološke karakteristike, iako su medijane u multifokalnim, tumorima sa ekstratiroidnim širenjem, vaskularnom invazijom i invazijom tumorske kapsule veće, nije dobijena statistička značajnost (**Tabela 4.17**).



Grafik 4.12. Realtivna ekspresija miR-92a u tumorima sa različitim nodalnim statusom: A) u celoj grupi; B) kod bolesnika mlađih od 45 godina u trenutku postavljanja dijagnoze. Vrednosti ekspresije predstavljene kao medijana sa interkvartilnim opsegom. P vrednost dobijena primenom Man–Vitnjevog testa.



Grafik 4.13. Relativna ekspresija miR-92a u tumorima bolesnika sa PTC mlađih od 45 godina u trenutku postavljanja dijagnoze; A) u odnosu na fokalni status tumora; B) u odnosu na prisustvo invazije kapsule. Vrednosti ekspresije predstavljene kao medijana sa interkvartilnim opsegom. P vrednost dobijena primenom Man–Vitnijevog testa.

U **tabeli 4.18.** prikazani su rezultati Spirmanovog testa korelacije između nivoa ekspresije miR-92a u tumorskom tkivu i starosti bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze, izmerene veličine primarnog tumora, pT statusa i kliničkog stadijuma. Ni u jednom slučaju nije dobijena statistički značajna korelacija.

Tabela 4.18. Spirmanov test korelacije nivoa ekspresije miR-92a sa kliničkim i patološkim parametrima.

	Relativna ekspresija miR-92a u tumorskom tkivu	
	ρ	P vrednost
Starost bolesnika (godine) prilikom dijagnostikovanja	-0,225	0,188
Veličina tumora	0,181	0,291
pT kategorija	0,188	0,271
Klinički stadijum	-0,240	0,159

Prema rezultatima logističke regresije (**Tabela 4.19**), samo je prisustvo nodalnih metastaza značajno asocirano sa povišenom ekspresijom miR-92a u tumorima. Statistički značajna P vrednost i vrednost OR pokazuju da su bolesnici sa limfnim nodalnim metastazama imali 4,7 puta veću verovatnoću za povišenu ekspresiju miR-92a

od bolesnika kod kojih nisu bile prisutne nodalne metastaze. Logistička regresija je pokazala i trend ka značajnoj asocijaciji povišenog nivoa ekspresije miR-92a sa klasičnom histološkom varijantom tumora i invazijom tumorske kapsule, dok se trend ka asocijaciji povišene ekspresije miR-92a sa mlađom životnom dobi (≤ 45), dobijen Man–Vitnijevim testom, gubi u logističkoj regresiji.

Tabela 4.19. Analiza korelacije između kliničko-patoloških karakteristika i nivoa ekspresije miR-92a u PTC tkivu metodom logističke regresije.

Parametar	Poređenje	Odds Ratio	95% CI	P vrednost
Histološka varijanta tumora	klasična vs. ostale	3,38	0,902–12,649	0,071*
Invazija kapsule	prisutna vs. odustna	3,19	0,983–10-351	0,053*
Limfne nodalne metastaze	prisutne vs. odustne	4,70	1,109–19,938	0,036
Fokalni status tumora	multifokalni vs. monofokalni	1,42	0,390–5,164	0,596
Vaskularna invazija	prisutna vs. odsutna	1,96	0,657–5,828	0,228
Ekstratiroidno širenje	prisutno vs. odsutno	2,15	0,542–8,502	0,276
pT kategorija	pT3+4 vs. pT1+2	2,0	0,694–5,749	0,200
Klinički stadijum	III vs. I+II	0,43	0,101–1,863	0,261
Starost prilikom dijagnostikovanj	>45 vs. ≤ 45	0.686	0,143–3,284	0.637

OR – količnik verovatnoće (engl. *Odds Ratio*); 95% CI – 95% Interval poverenja (engl. *Confidence Interval*). Značajna P vrednost prikazana podebljano. *Statistički trend. Rezultati dobijeni uz korekciju na pol i starost bolesnika. Predikovani probabilitet je za povećanu miR-92a ekspresiju.

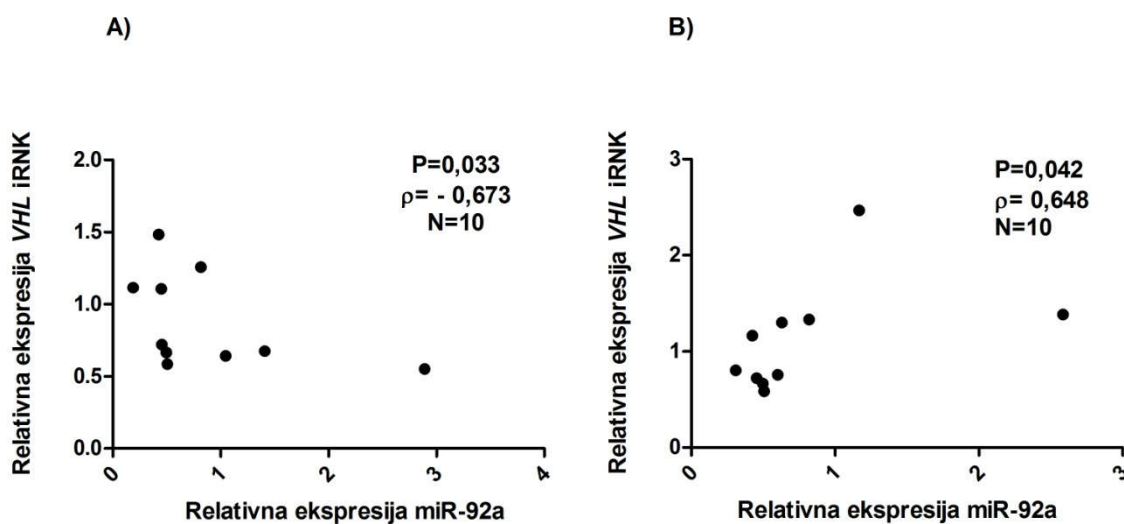
4.4. Korelacija nivoa ekspresije *VHL* iRNK i nivoa ekspresije miR-92a u uzorcima PTC

U tabeli 4.20. prikazani su rezultati analize korelacije nivoa ekspresije *VHL* iRNK i miR-92a u grupama bolesnika sa različitim kliničkim i patohistološkim parametrima.

Tabela 4.20. Spirmanov test korelacije ekspresije *VHL* iRNK i miR-92a kod PTC bolesnika podeljenih na grupe u odnosu na standardne kliničke i patohistološke parametre.

Grupe bolesnika sa PTC	Korelacija <i>VHL</i> iRNK i miR-92a		
	ρ	P vrednost	N
Svi bolesnici	-0,098	0,611	29
Pol			
Muški	0,029	0,957	6
Ženski	-0,142	0,517	23
Starost (godine)			
≤45	-0,384	0,104	19
>45	0,648	0,042	10
Histološka varijanta tumora			
klasična	-0,215	0,425	16
folikularna i ostale	0,098	0,762	12
Fokalni status tumora			
multifokalni	-0,167	0,668	9
monofokalni	-0,063	0,797	19
pT status tumora			
1+2	0,036	0,899	15
3+4	-0,244	0,401	13
Limfne nodalne metastaze			
prisutne	-0,595	0,120	8
odsutne	0,034	0,884	21
Invazija kapsule			
prisutna	-0,221	0,395	17
odsutna	-0,327	0,326	11
Prisustvo vaskularne invazije			
prisutna	-0,673	0,033	10
odsutna	0,114	0,642	19
Prisustvo ekstratireoidnog širenja			
prisutno	-0,143	0,760	7
odsutno	-0,077	0,732	22
Klinički stadijum			
I+II	-0,205	0,325	25
III	0,400	0,600	4

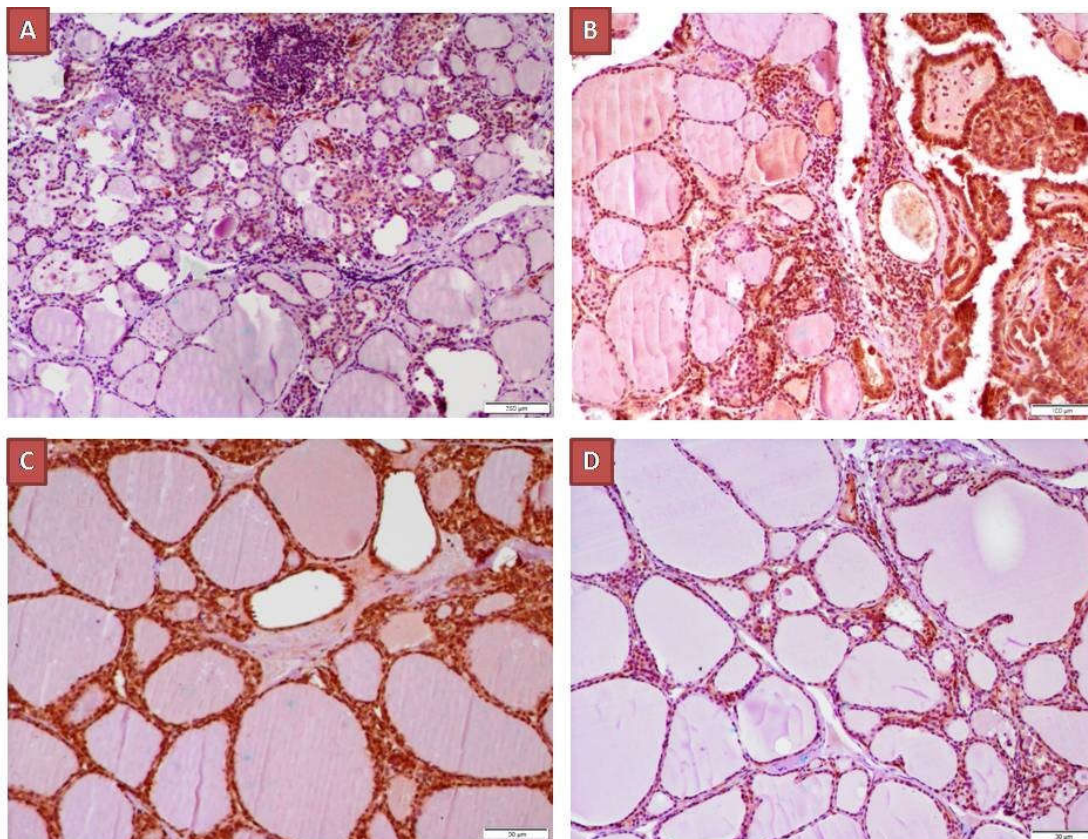
U celoj grupi bolesnika sa PTC nije dobijena značajna povezanost između nivoa ekspresije *VHL* iRNK i miR-92a. Ispitivanje korelacije ekspresije ova dva molekula u grupama bolesnika sa PTC koje su dobijene podelom prema kliničkim i patohistološkim karakteristikama dalo je sledeće rezultate: i) u grupi bolesnika sa prisutnom vaskularnom invazijom dobijena je značajna negativna korelacija između nivoa ekspresije *VHL* i miR-92a ($P=0,033$, $\rho= -0,673$) (**Grafik 4.14.A**); ii) u grupi bolesnika koji su bili stariji od 45 godina prilikom dijagnostikovanja bolesti dobijena je značajna pozitivna korelacija ($P=0,042$, $\rho=0,648$) (**Grafik 4.14.B**). U ostalim grupama nisu dobijeni značajni koeficijenti korelacije (**Tabela 4.20**).



Grafik 4.14. Spirmanov test korelacije ekspresije *VHL* iRNK i miR-92a: A) u grupi bolesnika kod kojih postoji vaskularna invazija tumorom; B) u grupi bolesnika kod kojih je bolest dijagnostikovana posle 45. godine života.

4.5. Rezultati imunohistohemijskog određivanja nivoa ekspresije proteina VHL

Za analizu ekspresije VHL na nivou proteina bilo je dostupno 19 uzoraka PTC. Kod 18 uzoraka uočeno je prisustvo peritumorskog tkiva, koje je uključeno u analizu kao neizmenjeno tkivo prema nalazu patologa. Na **slici 4.2.** prikazani su reprezentativni primeri imunoekspresije u tumorskom i peritumorskom tkivu štitaste žlezde.



Slika 4.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije proteina VHL u PTC i peritumorskom tireoidnom tkivu. A) i B) Jaka imunoreaktivnost detektovana u tumorskom tkivu dok je u peritumorskom detektovana slaba do umerena imunoreaktivnost. C) Primer jake imunoreaktivnosti u tumorskom i u peritumorskom tkivu. D) Umerena imunoreaktivnost u tumorskom a slaba u peritumorskom tkivu. A) bar=200 μm ; B) bar=100 μm ; C) i D) bar=20 μm .

Rezultati imunohistohemijske detekcije proteina VHL predstavljani su u **tabeli 4.21.** Imunohistohemijski detektabilni nivo ekspresije proteina VHL bio je detektovan u svim uzorcima tumorskog i peritumorskog tireoidnog tkiva bolesnika sa PTC. Razlika u ekspresiji VHL između tumorskog i peritumorskog tkiva je bila statistički značajna ($P=0,002$). Među tumorskim tkivima, najviše uzoraka je pokazivalo jaku

imunoreaktivnost (58% uzoraka), zatim umerenu imunoreaktivnost (26%), a najmanje uzoraka (16%) je pokazalo slabu imunoreaktivnost. Obrnut slučaj bio je sa peritumorskim tkivima, kod kojih je najviše uzoraka imalo slabu imunoreaktivnost (61%) dok je 33% imalo umerenu a svega 6% jaku imunoreaktivnost. Srednja ocena imunoreaktivnosti u tumorskom tkivu bila je 2,42 a u peritumorskom tkivu 1,44. Difuznu pozitivnost je imalo 11 od 19 tumorskih tkiva, dok je fokalnu pozitivnost imalo 7 tumorskih tkiva. Sva peritumorska tkiva sem jednog imala su fokalnu pozitivnost.

Tabela 4.21. Rezultati imunohistohemijske detekcije proteina VHL u uzorcima tumorskog i peritumorskog tkiva bolesnika sa PTC.

Ocena imunoreaktivnosti	Broj bolesnika (%)		P vrednost
	Tumorsko tkivo	Peritumorsko tkivo	
Negativna – 0	0	0	0,002
Slaba imunoreaktivnost – 1	3 (16%)	11 (61%)	
Umerena imunoreaktivnost – 2	5 (26%)	6 (33%)	
Jaka imunoreaktivnost – 3	11 (58%)	1 (6%)	
Srednja ocena	2,42	1,44	

0 – odsustvo imunoreaktivnosti, 1 – slaba imunoreaktivnost (<10% ćelija pozitivno), 2 – umerena imunoreaktivnost (10–50% ćelija pozitivno), 3 – jaka imunoreaktivnost (>50% ćelija pozitivno). P vrednost dobijena χ^2 testom. Srednja ocena predstavlja zbir proizvoda broja pacijenata i odogovarajućih ocena, podeljen sa brojem bolesnika.

Zatim je ispitivana povezanost nivoa ekspresije proteina VHL sa kliničkim i patohistološkim parametrima, kao i korelacija sa nivoima ekspresije *VHL* iRNK i miR-92a. Nije dobijena statistički značajna povezanost između nivoa ekspresije proteina VHL i kliničko-patoloških karakteristika PTC tumora. Nije dobijena statistički značajna povezanost između nivoa ekspresije *VHL* iRNK i proteina VHL, kao ni između nivoa ekspresije proteina VHL i miR-92a.

5. DISKUSIJA

Papilarni karcinomi štitaste žlezde predstavljaju najučestalije karcinome endokrinog porekla. Ovi karcinomi se obično odlikuju sporim rastom i slabom invazivnošću, i često su izlečivi primenom ograničene ili totalne tireoidektomije u kombinaciji sa supstitucionom hormonskom terapijom i/ili terapijom radioaktivnim jodom (Tuttle i sar. 2010; F. Pacini i sar. 2012).

Iako su PTC najčešće biološki indolentni i imaju dobru prognozu, neki bolesnici imaju povećan rizik od pojave lokoregionalnih recidiva ili udaljenih metastaza, što povećava i rizik od smrti kao posledice ove bolesti. Prema nekim studijama, u 20–30% slučajeva registruje se pojava recidiva, koji se mogu javiti i više puta tokom života (Ortiz i Rodríguez 2001; Mazzaferri i Jhiang 1994; Tuttle i sar. 2010). Potreba za ponovljenim lečenjem, kao i povećanje šansi za komplikacije negativno utiču na kvalitet života ovih bolesnika. Svaki recidiv nosi sa sobom značajno povećanje rizika od daljih komplikacija i smrti kao posledice PTC (Ortiz i Rodríguez 2001). Osim toga, dobro diferencirani PTC mogu procesom dediferencijacije preći u slabo diferencirane ili nediferencirane – anaplastične karcinome, kod kojih je stopa mortaliteta blizu 100% (Tuttle i sar. 2010; Omur i Baran 2014; Asa i Mete 2013). Postoje i slučajevi dobro diferenciranih karcinoma koji ispoljavaju agresivno ponašanje bez prisustva vidljivih pokazatelja dediferencijacije (Papp i Asa 2015). Prepoznavanje bolesnika kod kojih se može očekivati agresivnije ponašanje tumora i planiranje najboljeg terapijskog pristupa u skladu sa tim je od izuzetnog kliničkog značaja.

Prognoza bolesnika sa PTC se još uvek bazira samo na kliničko-patološkim karakteristikama kao što su starost prilikom postavljanja dijagnoze, veličina tumora, stepen ekstratireoidnog širenja, prisustvo nodalnih i udaljenih metastaza. Na ovim karakteristikama se baziraju različiti sistemi klasifikacije, između ostalog i TNM sistem, koji se najčešće koristi. TNM ima visoku prediktivnu moć kada je u pitanju rizik od smrti ali je znatno manje efikasan u predikciji rizika od recidiva, što je klinički značajnije s obzirom da se recidivi javljaju mnogo češće od smrti u slučaju PTC. Čak i uz integraciju dodatnih kliničkih podataka kao što su nivo tireoglobulina u serumu i rezultati pregleda celog tela skenerom posle završenog tretmana, ovaj pristup ima nisku

prediktivnu moć za dugoročni ishod kod ovih bolesnika (Pacini i sar. 2012; Lebastchi i Callender 2014).

Molekularno profilisanje PTC, osim na polju dijagnostike, od izuzetnog je značaja naročito za napredak na polju klasifikacije ovih tumora i njihove prognostike, kao i za identifikaciju novih potencijalnih terapijskih pristupa. U skladu sa tim, najveća potreba postoji za boljim razumevanjem molekularno-genetičkih promena koje karakterišu tireoidne karcinome visokog rizika, kao i za unapređenjem terapije uznapređovalih i agresivnijih oblika ove bolesti. S druge strane, od značaja bi bila i efikasna identifikacija bolesnika kojima tretman uopšte nije potreban, kako bi se sprečio fenomen “prekomernog tretmana” (engl. *overtreatment*), koji se u zadnje vreme sve češće povezuje sa PTC (Rahib i sar. 2014).

Otkriće fundamentalne uloge signalnog puta MAPK u patogenezi velikog broja PTC deo je značajnog napretka koji je ostvaren u razumevanju molekularnih mehanizama koji promovišu razviće i progresiju ovih karcinoma. Putem prenosa signala MAPK posredovana tumorigeneza uključuje i veliki broj sekundarnih molekularnih promena, genetičkih i epigenetičkih, koje deluju sinergistički (Xing 2013). Do danas je identifikovan veći broj genetičkih promena odgovornih za patogenezu PTC. Međutim, pored njihovog izvesnog dijagnostičkog značaja, mali je broj onih koje bi mogle imati i prognostički potencijal. Osim toga, oko 30% diferenciranih tireoidnih karcinoma nema nijednu od opisanih genetičkih promena, što ukazuje na to da u njihovoj osnovi leže neke druge genetičke i/ili epigenetičke promene (Omur i Baran 2014; Asa 2017).

Protein VHL detektovan je u različitim neizmenjenim i neoplastično transformisanim tkivima u organizmu, uključujući i folikularni epitel tireoidee (Los i sar. 1996; Corless i sar. 1997). Ovaj protein je uključen u kontrolu velikog broja procesa kao što su angiogeneza, formiranje ekstraćelijskog matriksa, regulacija propagacije ćelija kroz ćelijski ciklus i diferencijacija ćelija. Regulacijom ovih procesa on ostvaruje svoju tumor supresorsku funkciju (Frew i Krek 2007; Gossage, Eisen, i Maher 2015; Barry i Krek 2004).

Zato nije iznenađujuće da je u različitim tipovima naslednih i sporadičnih malignih tumora utvrđeno da su ekspresija i/ili funkcija VHL poremećene (Kim i Kaelin 2004;

Giles i sar. 2006; Koch i sar. 2006; Zia i sar. 2007; Hu i sar. 2012; Hasegawa i sar. 2017).

Aberantna ekspresija gena *VHL*, povezana sa povećanom invazivnošću tumorskih ćelija *in vitro*, nađena je kod visokoagresivnih ćelijskih linija karcinoma dojke. Osim toga, snižena ekspresija povezana je sa agresivnijom formom bolesti kod bolesnika sa karcinomom dojke (Zia i sar. 2007). Slična asocijacija utvrđena je i kod ćelijskih linija karcinoma jajnika (T. Liu i sar. 2014). Visoka korelacija između niske ekspresije *VHL* i manje verovatnoće preživljavanja detektovana je i u grupi bolesnika sa neuroblastomima (Hoebeeck i sar. 2006).

O ulozi i značaju *VHL* tumor supresora za nastanak tumora štitaste žlezde, uključujući i njihovu najbrojniju grupu – PTC, zna se vrlo malo. Dasadašnje studije pokazale su da je protein *VHL* detektabilan imunohistohemijski u neizmenjenom tireoidnom tkivu i u neoplastičnim lezijama. Takođe je pokazano da je njegova ekspresija u neoplastičnim tireoidnim lezijama u korelaciji sa stepenom diferencijacije ćelija (Corless i sar. 1997; Hinze i sar. 2000). Jedna studija, sprovedena na folikularnim tireoidnim karcinomima, utvrdila je gubitak heterozigotnosti u *VHL* lokusu i snažnu asocijaciju sa smrtnim ishodom (Hunt i sar. 2003). Kad je u pitanju PTC, do sada je objavljena samo jedna studija koja je analizirala ekspresiju *VHL* iRNK kod bolesnika sa ovim tipom karcinoma (Baldini i sar. 2017). Rezultati ove studije ukazuju da je ekspresija *VHL* u PTC izmenjena u odnosu na neizmenjeno tireoidno tkivo. Po našem saznanju, osim studije Baldini i sar., ne postoje druge studije koje su ispitivale potencijalni značaj ovog tumor supresora u nastanku i progresiji PTC.

Cilj naše studije bio je da ispita da li u toku patogeneze PTC dolazi do promene nivoa ekspresije *VHL* i da li postoji asocijacija sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama. Osim analize nivoa ekspresije ovog tumorskog supresora, analiziran je i mutacioni status sva tri egzona kako bi se utvrdilo da li su mutacioni događaji u kodirajućoj sekvenci gena potencijalno odgovorni za promene u nivou ekspresije. Takođe, ispitano je u kojoj meri se menja ekspresija *VHL* iRNK i proteina u tumorskom tkivu u odnosu na odgovarajuće neizmenjeno tireoidno tkivo kao i da li za promene njegove ekspresije u PTC može biti odgovorna i post-transkripciona regulacija RNK interferencijom koja je posredovana miR-92a.

U prvoj fazi ove studije analiziran je status *VHL* tumorskog supresora – njegova ekspresija na nivou iRNK i potencijalno prisustvo mutacionih promena u kodirajućim regionima ovog gena u grupi od 264 uzoraka PTC tkiva, koja su bila fiksirana u formalinu i ukalupljena u parafin. Kako bi se ispitaio potencijalni značaj *VHL* u patogenezi PTC, dobijeni rezultati su korelisani sa standardnim kliničkim i patohistološkim parametrima.

Rezultati ove analize pokazali su značajnu asocijaciju između niske ekspresije *VHL* i starije životne dobi bolesnika, višeg pT statusa tumora, udaljenih metastaza, uznapredovalog kliničkog stadijuma i klasične histološke varijante. Takođe, trend statističke značajnosti asocijacije sa niskom *VHL* ekspresijom utvrđen je u slučaju prisustva ekstratireoidnog širenja, limfnih nodalnih metastaza i vaskularne invazije, kao i u slučaju većih dimenzija tumora. Logistička regresija je potvrdila da su klasična histovarijanta i uznapredovali klinički stadijum, kao i multifokalnost značajno povezani sa niskim nivoom ekspresije *VHL*.

Starija životna dob bolesnika je jedan od najvažnijih faktora rizika kod PTC, o čemu svedoče brojne studije kao i činjenica da se ovaj faktor uzima u obzir prilikom TNM klasifikacije tumora u kliničke stadijume (Sobin, Gospodarowicz i Wittekind 2010). Tako, samo bolesnici stariji od 45 godina bivaju klasifikovani u više kliničke stadijume ukoliko ostali parametri zadovoljavaju kriterijume za to. Rezultati naše studije su pokazali da je upravo u ovoj grupi bolesnika nivo ekspresije *VHL* iRNK značajno snižen. Parametar pT status reflektuje veličinu tumora kao i stepen ekstratireoidnog širenja. Više pT kategorije (pT3 i pT4) ukazuju na veće dimenzije tumora i/ili prisustvo manjeg ili većeg lokalnog širenja tumora van kapsule tireoidee. Klinički stadijum uzima u obzir, osim starosti i pT statusa tumora, prisustvo ili odsustvo limfnih nodalnih metastaza i udaljenih metastaza. Sve su ovo karakteristike koje ukazuju na agresivnije biološko ponašanje tumora tako da, značajna asocijacija niskog nivoa ekspresije *VHL* sa njima, utvrđena u našoj studiji, govori u prilog tome da je ovaj tumor supresor uključen u patogenezu bar nekih PTC i da do poremećaja njegove ekspresije dolazi sa razvojem agresivnijeg ponašanja tih tumora.

Jedan od rezultata ove studije je i povezanost niskog nivoa ekspresije *VHL* sa klasičnom histološkom varijantom PTC. Značajna asocijacija sa niskim nivoom ekspresije *VHL*

utvrđena je poređenjem klasične varijante sa folikularnom i ostalim histovarijantama zajedno, kao i kada je klasična poređena samo sa folikularnom varijantom. Klasična histovarijanta je najučestalija histovarijanta PTC (Sak 2015). Sledeća po učestalosti je folikularna varijanta, i ona čini oko 20–30% svih PTC. Ostale histovarijante su retke (<10% svih PTC). Klasična i folikularna histovarijanta PTC se svrstavaju u istu grupu rizika u pogledu ponašanja i prognoze (Pacini i sar. 2006; Cooper i sar. 2009). Neke studije međutim ukazuju na to da ove dve histovarijante nose različit rizik za razvoj agresivnijeg ponašanja. Poređenjem kliničko-patoloških karakteristika i ishoda, utvrđeno je da se visoko rizične karakteristike i lošija prognoza češće javljaju kod klasične histovarijante nego kod folikularne (D. Ozdemir i sar. 2011; Shi i sar. 2016). U studiji TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas*) *Research Network*, koja se odnosi na genomsku karakterizaciju karcinoma štitaste žlezde, na osnovu ekspresije gena uključenih u tireoidnu funkciju određen je skor diferencijacije (engl. *thyroid differentiation score* – TDS) koji ukazuje na to da klasična varijanta, iako spada u dobro diferencirane tumore, ipak ima manji stepen diferencijacije od folikularne varijante PTC (Asa, Giordano i LiVolsi 2015).

PTC se često javljaju kao multifokalni ili bilateralni tumori sa prevalencom koja se kreće od 32–39% (Kato i sar. 1992; H. J. Kim i sar. 2013; K.-J. Kim i sar. 2015). Multipli fokusi se mogu javiti kao nezavisni tumori (Shattuck i sar. 2005) a mogu predstavljati i tumore istog klonalnog porekla koji su nastali kao intraglandularno metastatsko širenje primarnog tumora te njihovo postojanje ukazuje na agresivniju prirodu tumora (Lu i sar. 2016). Brojne studije su ispitivale prognostički značaj multifokalnosti kod PTC. Prema rezultatima studije Wang i saradnika, postojanje većeg broja fokusa ne predstavlja nezavisni faktor rizika za lošiji klinički ishod kod bolesnika sa PTC (F. Wang i sar. 2017). Druge studije međutim, ukazuju na to da je multifokalnost značajno asocirana sa ekstratireoidnim širenjem, nodalnim metastazama i višim kliničkim stadijumom, kao i da predstavlja nezavisni prognostički faktor za pojavu recidiva (H. J. Kim i sar. 2013; K.-J. Kim i sar. 2015). Utvrđeno je i da je multifokalnost asocirana sa nižom stopom preživljavanja kod bolesnika sa PTC (Ng i sar. 2017) kao i da tendencija ka agresivnijem ponašanju raste sa brojem tumorskih fokusa (Qu i sar. 2014). Naši rezultati ispitivanja ekspresije *VHL* u multi- i

monofokalnim tumorima ukazuju da nizak nivo ekspresije *VHL* možda favorizuje selekciju ćelija kancera koje su sklonije intraglandularnom metastaziranju.

Praćenje bolesnika u našoj studiji, u okviru kojeg su evidentirani pojava recidiva i/ili smrtnog ishoda, trajalo je 7–187 meseci. Utvrđeno je da je za to vreme došlo do pojave recidiva kod 20 bolesnika, od kojih je šestoro umrlo od posledica progresije bolesti. Poređenje nivoa ekspresije *VHL* u grupama sa i bez pojave recidiva je pokazalo značajnu povezanost niskog nivoa ekspresije *VHL* i pojave recidiva. I Kaplan–Majerova analiza je dala statističku značajnost, mada graničnu, za vezu između kraćeg vremenskog perioda bez ikakvih znakova i simptoma bolesti i niskog nivoa ekspresije *VHL*. Rezultati ove studije u velikoj su meri u saglasnosti sa rezultatima studije (Baldini i sar. 2017), koja je analizirala nivo ekspresije obe transkriptne varijante *VHL* u grupi od 96 bolesnika sa PTC. I u ovoj studiji, dobijena je značajna asocijacija između niskog nivoa ekspresije *VHL* i pojave recidiva, kao i kraći period bez znakova bolesti kod bolesnika sa niskom ekspresijom. Ipak, s obzirom na indolentnu prirodu PTC i mogućnost pojave recidiva i više decenija nakon inicijalnog tretmana, potrebno je duže praćenje ovih bolesnika kako bi se stekla kompletnija slika o stvarnom prognostičkom značaju nivoa ekspresije *VHL*.

Nastanak i razvoj PTC najčešće je povezan sa konstitutivnom aktivacijom signalnog puta MAPK, koji prenosi potentne mitogene signale i signale za preživljavanje ćelije. U 70% slučajeva, za konstitutivnu aktivaciju ovog signalnog puta su odgovorne određene varijante gena *BRAF* ili gena iz *RAS* familije, kao i genski rearanžmani *RET/PTC*. Za grupu bolesnika ispitivanih u prvom delu ove studije, bili su dostupni i podaci o mutacionom statusu ovih gena, koji su dobijeni u našim prethodnim studijama (Stanojevic i sar. 2011). Ispitivanje povezanosti između nivoa ekspresije *VHL* i mutacionog statusa komponenti signalnog puta MAPK pokazalo je da ne postoji značajna veza među njima, u ispitanoj grupi uzoraka. Odsustvo korelacije u ispitivanoj grupi ukazuje na to da konstitutivna aktivacija signalnog puta MAPK u PTC verovatno ne utiče na ekspresiju *VHL* iRNK. Ovo međutim ne isključuje mogućnost da utiče na nivo ekspresije proteina VHL i njegovu funkciju. U ćelijama melanoma koje imaju mutaciju *BRAF* V600E utvrđena je povišena ekspresija HIF-1 α , jednog od ciljnih proteina pVHL, koja biva smanjena ako se proizvod gena *BRAF* inhibira RNK

inteferencijom dok u isto vreme dolazi do povećanja ekspresije pVHL (Kumar i sar. 2007). S druge strane, studija u ćelijskim linijama karcinoma dojke pokazala je da mutacija u genu *RAS* dovodi do povišene ekspresije HIF α faktora ali da se to ne dešava posredstvom aktivnosti pVHL (Blancher i sar. 2001).

Rezultati sekvenciranja sva tri egzona gena *VHL* pokazali su da u kodirajućoj sekvenci ovog gena u našoj grupi uzoraka PTC ne postoje mutacione promene. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživačkih grupa, koji ukazuju na to da su mutacije u sekvenci *VHL* veoma retke u nenaslednim tipovima tumora koji nisu kao nasledne forme karakteristični za VHL bolest (Gnarra i sar. 1994; Foster i sar. 1995; Sourvinos i sar. 2001; Miyakis i sar. 2003; Koch i sar. 2006). Samo jedna studija do sada prijavila je postojanje tačkaste mutacije u kodirajućem regionu gena *VHL*, i to samo u jednom slučaju među ispitivanim PTC (Costa i sar. 2015). Redukovana ekspresija gena može između ostalog biti i posledica haploinsuficijencije (postojanje samo jedne funkcionalne kopije gena) koja nastaje kao posledica gubitka heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity* – LOH) tokom progresije bolesti. Ova mogućnost ne može biti isključena u našem slučaju. Par studija je utvrdilo postojanje LOH-a u različitim regionima kratkog kraka hromozoma 3 u 28–40% analiziranih PTC uzoraka (Grebe i sar. 1997; Rodrigues-Serpa, Catarino i Soares 2003). Do danas međutim, u PTC nije otkriven LOH specifičan za gen *VHL*. Do inhibicije ekspresije gena često dovode i epigenetičke promene kao što su metilacija DNK i histonske modifikacije. Izmenjena metilacija promotorskog regiona gena, naročito tumor supresorskih, je česta epigenetička promena u malignim bolestima generalno, pa i u karcinomima štitaste žlezde (Hoque i sar. 2005; Xing 2007; Khatami i sar. 2017). Dosadašnja istraživanja ukazuju da je gen *VHL* "utišan" metilacijom u 20–30% karcinoma bubrega (Herman i sar. 1994; Dulaimi i sar. 2004; Yang i sar. 2016), a takođe i u drugim malignitetima kao što su sporadični endokrini maligni tumori pankreasa (Schmitt i sar. 2009), sporadični feohromocitomi (Andreasson i sar. 2013), leukemije (Benetatos i sar. 2008), karcinomi jajnika (F. Ozdemir i sar. 2012), cerviksa (Chakraborty i sar. 2018) i pluća (Dmitriev i sar. 2012). Metilacija promotorskog regiona gena *VHL* je detektovana i u PTC pri čemu je, u poređenju sa drugim tumor supresorskim genima koji su analizirani (*ARHI*, *CDHI*, *KCNQ1*, *MEST*, *p16INK4A*, *RASSF1A*, *SLC5A8*), frekvencija metilacije u njegovom slučaju bila najniža. Nivoi metilacije ovih tumor supresorskih gena su bili tek nešto malo viši u PTC tkivu u

odnosu na odgovarajuće neizmenjeno tireoidno tkivo (Migdalska-Sęk i sar. 2011). Navedeni rezultati ukazuju na to da hipermetilacija u promotorskom regionu nije ključni događaj u utišavanju gena *VHL* u PTC.

Rezultati dobijeni u prvoj fazi studije ukazuju na to da u toku onkogeneze PTC može doći do poremećaja u nivou ekspresije *VHL* i da je niska ekspresija asocirana sa progresijom bolesti. Analiza mutacionog statusa utvrdila je odsustvo mutacionih promena u egzonima ovog gena i ukazala na to da je do smanjenja nivoa ekspresije *VHL* iRNK najverovatnije došlo pod uticajem drugih regulatornih mehanizama.

S obzirom da je u prvoj fazi studije ekspresija *VHL* iRNK analizirana samo u arhiviranom PTC tkivu, u drugoj fazi studije je ispitivana ekspresija *VHL* u sveže zamrznutom PTC tkivu i odgovarajućem neizmenjenom tireoidnom tkivu. Rezultati ispitivanja ekspresije *VHL* iRNK i proteina su zatim analizirani i korelisani sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama, sa ciljem da utvrdimo da li su rezultati dobijeni u drugoj fazi studije u saglasnosti sa rezultatima prve faze.

Paralelna analiza ekspresije *VHL* iRNK u tumorskom i odgovarajućem neizmenjenom tireoidnom tkivu pokazala je da je u 33% slučajeva nivo *VHL* niži u tumorskom u odnosu na neizmenjeno tkivo, dok je u 67% slučajeva bio viši. Prosečno smanjenje iznosilo je 2,2 puta a prosečno povećanje 1,87 puta. Bilo da je došlo do pada ili porasta nivoa ekspresije, u obe grupe je postojala značajna razlika između tumorskog i neizmenjenog tkiva. Ovi rezultati govore u prilog tome da je ekspresija *VHL* u PTC tkivu značajno izmenjena u odnosu na neizmenjeno tkivo i u saglasnosti su sa rezultatima studije Baldini i saradnika (Baldini i sar. 2017). U pomenutoj studiji analizirana je ekspresija obe transkripcione varijante *VHL* iRNK, označene V1 i V2, i utvrđeno je da su obe izmenjene u tumorskom tkivu u odnosu na odgovarajuće neizmenjeno tireoidno tkivo. Kao i u našoj studiji, kod nekih bolesnika je zabeležen porast, dok je kod drugih zabeležen pad u nivou ekspresije, uz značajnu pozitivnu korelaciju nivoa ekspresije V1 i V2 u svim uzorcima. Između ove dve studije, međutim, postoji razlika u udelu bolesnika kod kojih je došlo do porasta nivoa ekspresije u PTC tkivu u odnosu na neizmenjeno tireoidno tkivo i onih kod kojih je došlo do pada. U studiji Baldini i saradnika je češće detektovano smanjenje, dok je u našoj veći procenat bolesnika sa povećanjem nivoa *VHL* ekspresije. Ovo se, bar donekle, može objasniti

razlikom u veličini i karakteristikama ispitivanih grupa u ove dve studije, kao i različitim pristupom u određivanju *cut-off* vrednosti za evaluaciju promene u ekspresiji *VHL*.

U sledećem koraku, ispitana je veza između promena u nivou ekspresije *VHL* i kliničko-patoloških karakteristika bolesnika sa PTC. Rezultati ove analize pokazali su značajnu asocijaciju između smanjenja nivoa ekspresije *VHL* i prisustva ekstratireoidnog širenja i invazije tumorske kapsule. Zabeležen je i trend statističke značajnosti asocijacije sa prisustvom limfnih nodalnih metastaza. Logističkom regresijom potvrđena je značajnost ovih asocijacija.

U poređenju sa rezultatima prvog dela naše studije, i u ovom slučaju, rezultati ukazuju na to da je snižen nivo ekspresije *VHL* asociran sa karakteristikama tumora koje upućuju na agresivnije biološko ponašanje.

Snižen nivo ekspresije *VHL* je, kao što je već pomenuto, detektovana i u drugim tipovima malignih tumora. Poređenjem njegove ekspresije u tumorskom i neizmenjenom tkivu bolesnika sa karcinomom bubrega, ustanovljena je značajno niža ekspresija u tumorskom tkivu, kao i asocijacija sa višim gradusom tumora (Ma i sar. 2017). U karcinomu dojke, niži nivo ekspresije bio je asociran sa višim gradusom tumora, nodalnim metastazama i lokalnim recidivima (Zia i sar. 2007). Asocijacija sa višim gradusom tumora nađena je i u hondrosarkomima (C. Chen i sar. 2011), kao i u karcinomima skvamoznih ćelija usne duplje. Kod ovih tumora, niži nivo ekspresije *VHL* bio je asociran sa prisustvom nodalnih metastaza, lošijom prognozom i procesom epitelijalno-mezenhimalne tranzicije (S. Zhang i sar. 2014).

Kod jednog dela bolesnika sa PTC u našoj studiji utvrđeno je povećanje nivoa ekspresije *VHL* u tumorskom tkivu u odnosu na neizmenjeno tireoidno tkivo. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija u kojima je takođe registrovano povećanje nivoa ekspresije različitih tumor supresora u tumorskim tkivima (Inoue i sar. 2012; Romagosa i sar. 2011; Huynh 2004). U našoj studiji, primećno je da se povećanje nivoa ekspresije *VHL* češće javlja u tumorima koji nemaju karakteristike agresivnog ponašanja. Moguće objašnjenje za povišenu ekspresiju u ovakvim tumorima je da u njima dolazi do aktivacije nekih protektivnih mehanizama koji se aktiviraju u odgovarajućem genetičko-epigenetičkom miljeu sa ciljem sprečavanja gubitka jedne ili

više funkcija proteina VHL. Dalja istraživanja, uključujući funkcionalne studije, potrebna su kako bi ovi mehanizmi i njihovi efekti bili rasvetljeni.

Imunohistohemijska detekcija proteina VHL u PTC uzorcima analiziranim u našoj studiji je pokazala da je pVHL detektabilan u tumorskom i u peritumorskom tkivu štitaste žlezde, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje su analizirale ekspresiju pVHL u tireoidnim tkivima (Corlessi sar. 1997; Hinze i sar. 2000). Takođe, naši rezultati pokazuju da postoji značajna razlika u ekspresiji ovog proteina u PTC i peritumorskom tkivu, što potvrđuje rezultate koje smo dobili analizom nivoa ekspresije iRNK. Najviše tumorskih uzoraka (84%) pokazalo je jaku do umerenu imunoreaktivnost, dok je među peritumorskim tkivima 61% imalo slabu imunoreaktivnost. Srednja ocena imunoreaktivnosti, koja za tumorsko tkivo iznosi 2,42 a za peritumorsko 1,44 ukazuje na to da je nivo ekspresije pVHL viši u tumorskom nego u peritumorskom tkivu, i svi analizirani uzorci su imali ovaj trend. Nije dobijena značajna korelacija između ekspresije VHL na nivou iRNK i proteina. Odsustvo korelacije između iRNK i proteinske ekspresije je čest slučaj obzirom na veliki broj regulatornih mehanizama koji deluju kako na stabilnost i dostupnost iRNK za translaciju, tako i na sam proces translacije i dalju sudbinu proteinskog produkta u različitim biološkim uslovima (Y. Liu, Beyer i Aebersold 2016).

Jedan od procesa koji deluje na post-transkripcionom nivou i reguliše količinu iRNK koje se prevode procesom translacije u protein, posredovan je malim nekodirajućim RNK – mikroRNK. S obzirom na literaturne podatke koji govore u prilog tome da u nekim malignitetima ekspresija VHL biva snižena aktivnošću miR-92a (Ghosh i sar. 2009; Valera i sar. 2011), koja je u različitim tumorima potvrđena kao onkogeni mikroRNK, sledeći korak u našoj studiji bio je da se ispita ekspresija miR-92a u PTC i njena korelacija sa VHL.

Analiza nivoa ekspresije miR-92a u PTC i neizmenjenom tireoidnom tkivu je pokazala statistički značajnu razliku među uzorcima. Utvrđeno je da je kod 25% bolesnika došlo do povećanja nivoa ekspresije miR-92a u tumorskom tkivu u odnosu na neizmenjeno, dok je kod ostalih došlo do smanjenja. Prosečno povećanje je iznosilo 1,9 puta dok je prosečno smanjenje bilo 2,7 puta.

Povišena ekspresija miR-92a detektovana je u mnogim drugima malignitetima kao što su karcinomi bubrega, želuca, cerviksa, hepatocelularni, kolorektalni i karcinom bešike (Valera i sar. 2011; Ren i sar. 2016; Tan 2014; Shigoka i sar. 2010; Zhao i sar. 2013; Yu, Zhang i Zhang 2013; Al-Sheikh i sar. 2016; H. Wang i sar. 2016). Jedna studija je ispitivala ekspresiju miR-92a u minimalno invazivnim folikularnim tireoidnim karcinomima i utvrdila je da je ekspresija ove mikroRNK viša u tumorima kod kojih postoje udaljene metastaze nego u tumorima bez metastaza (Jikuzono i sar. 2013). U ćelijskoj liniji anaplastičnog tireoidnog karcinoma ARO, ali ne u humanim tkivima ovog karcinoma, takođe je detektovana povišena ekspresija miR-92a (Takakura i sar. 2008).

Snižen nivo ekspresije miR-92a takođe je detektovan i u drugim malignim tumorima. Poređenjem nivoa ekspresije miR-92u uzorcima karcinoma dojke, utvrđeno je da nivo ekspresije opada sa progresijom karcinoma dojke idući od neizmenjenog epitela dojke, preko duktalnih karcinomima *in situ* do invazivnih oblika, u kojima je bila najniža (Smith i sar. 2015). Gubitak heterozigotnosti u lokusu 13q31.3 (sadrži klaster miR-17-92) i snižena ekspresija zrelih miR iz ovog klastera zabeleženi su u većem broju tumora, dok je delecija klastera detektovana kod 16,5% ovarijalnih karcinoma, 21,9% karcinoma dojke i 20% malignih melanoma (L. Zhang i sar. 2006). Porast i pad nivoa ekspresije miR-92a u tumorskom tkivu u odnosu na peritumorsko u okviru iste kohorte bolesnika zabeleženi su i u studiji koja je obuhvatala bolesnike sa karcinomom želuca. Povišen nivo ekspresije detektovan je kod 81% bolesnika, snižen kod 14% a nepromenjen kod 5% (Ren i sar. 2016).

Brojni dokazi ukazuju da članovi miR-17-92 klastera ostvaruju svoju onkogenu funkciju u ćeliji inhibicijom ekspresije određenih anti-proliferativnih i/ili pro-apoptotskih gena kao što su *p63* (Manni i sar. 2009), *Bim* (Ventura i sar. 2008), komponente TGF β (engl. *transforming growth factor β*) signalnog puta (Tili i sar. 2010) i *ER β* (engl. *estrogen receptor β*) (Al-Nakhle i sar. 2010). Neke studije su pokazale da miR-92a promoviše invazivnost malignog tumora. Utvrđeno je da u ćelijama hepatocelularnog karcinoma miR-92a promoviše proliferaciju i invazivnost posredstvom inhibicije FOXA2 (engl. *forkhead box transcription factor α*) (H. Wang i sar. 2016). Stimulacija rasta i invazivnosti usled povišene ekspresije miR-92a pokazana je i u slučaju ćelija humanog

cervikalnog karcinoma (SiHa) i u ćelijskim linijama karcinoma bešike (Yu, Zhang i Zhang 2013; H. Wang i sar. 2016).

Značaj i uloga miR-92a u PTC nisu do sada ispitivani. Postojanje značajne razlike između tumorskog i neizmenjenog tireoidnog tkiva sugerise na mogućnost da je ova mikroRNK uključena u patogenezu PTC. Kako bi se ova mogućnost dalje istražila, u ovoj studiji je ispitana i povezanost ekspresije miR-92a sa kliničkim i patohistološkim parametrima.

Rezultati ove analize pokazali su da je ekspresija miR-92a značajno viša u tumorima bolesnika kod kojih postoje limfne nodalne metastaze. Ova asocijacija je potvrđena i logističkom regresijom, koja je takođe ukazala i na statistički trend asocijacije visokog nivoa ekspresije miR-92a sa klasičnom histološkom varijantom i invazijom kapsule kao nezavisnim prediktorima. Kod bolesnika mlađih od 45 godina života utvrđen je trend ka višoj ekspresiji miR-92a u odnosu na bolesnike koji su stariji od 45. U grupi bolesnika mlađih od 45 dobijena je takođe i značajna povezanost visokog nivoa ekspresije miR-92a sa prisustvom nodalnih metastaza, kapsularne invazije i multifokalnosti. Asocijacija povišenog nivoa ekspresije miR-92a sa mlađim životnim dobom bolesnika gubi se u analizi logističke regresije, što ukazuje na to da je povezanost nivoa ekspresije miR-92a sa starošću bolesnika nastala kao posledica pridruženosti drugih karakteristika (prediktora).

Kada je u pitanju korelacija nivoa ekspresije miR-92a i VHL, na nivou cele grupe bolesnika sa PTC koji su bili dostupni za ovo poređenje, nije utvrđena značajna korelacija između nivoa ekspresije ove mikroRNK i VHL ni na nivou iRNK ni na nivou proteina. Značajna negativna korelacija sa nivoom ekspresije *VHL* iRNK je, međutim, dobijena u grupi bolesnika kod kojih je postojala vaskularna invazija. Vaskularna invazija je još jedna karakteristika koja ukazuje na veću biološku agresivnost tumora (Gonzalez-Gonzalez i sar. 2011). Čak i intratireoidalna vaskularna invazija u PTC je bila asocirana sa većom incidencom recidiva (Gardner i sar. 2000). Prema rezultatima istraživanja Falva i saradnika, vaskularna invazija je značajno povezana sa povišenim stopama udaljenih metastaza i recidiva u regionalnim limfnim čvorovima, kao i sa povišenom stopom mortaliteta kod bolesnika sa PTC (Falvo i sar. 2005). Iako je značajna negativna korelacija nivoa ekspresije miR-92a i *VHL* u grupi bolesnika kod

kojih je postojala vaskularna invazija, koja je utvrđena u našoj studiji, u saglasnosti sa, u literaturi dobro dokumentovanom, tumor-supresorskom ulogom *VHL* i onkogenom ulogom *miR-92a*, kao i sa potvrđenom ulogom *miR-92a* u regulaciji ekspresije *VHL* u nekim malignitetima, zbog malog broja uzoraka, ovaj rezultat treba uzeti sa rezervom.

Gore opisani rezultati druge faze naše studije pokazali su da su i ekspresija *VHL* i ekspresija *miR-92a* poremećene u PTC, što ukazuje na mogućnost da ova dva molekula imaju ulogu u patogenezi ovog tipa karcinoma. Rezultati takođe sugerišu da su, bar u nekim slučajevima, njihovi efekti u toj patogenezi suprotni i da među njima možda postoji funkcionalna veza, s obzirom na utvrđenu značajnu negativnu korelaciju nivoa njihove ekspresije kod bolesnika sa detektovanom vaskularnom invazijom. Povezanost snižene ekspresije *VHL* sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama koje ukazuju na agresivnije biološko ponašanje tumora je u saglasnosti sa rezultatima prve faze studije i sugerišu moguću ulogu *VHL* tumorskog supresora u progresiji PTC.

Prikazana studija je jedna od prvih studija čiji je fokus ispitivanje *VHL* tumorskog supresora u PTC. Sveukupni rezultati studije ukazuju na značaj deregulisane ekspresije *VHL* u patogenezi PTC. Po prvi put je pokazano da postoji veza između niskog nivoa ekspresije ovog tumorskog supresora i kliničkih i patohistoloških karakteristika koje ukazuju na agresivnije biološko ponašanje ovih tumora. Posebno bi istakli rezultat koji pokazuje da bolesnici sa niskim nivoom ekspresije *VHL* imaju kraće trajanje vremenskog perioda bez znakova bolesti. To sugeriše da bi *VHL* mogao biti kandidat za marker prognoze kod bolesnika sa PTC, koji bi potencijalno doprineo preciznijoj stratifikaciji ovih bolesnika u grupe sa povećanim rizikom za progresiju bolesti i time omogućio adekvatniji terapijski pristup. Ova studija je ujedno i prva opsežnija analiza mutacionog statusa gena *VHL* u PTC, koja je pokazala da mutacije u kodirajućem regionu ovog gena nisu čest događaj i ukazuje na to da verovatno drugi regulatorni mehanizmi imaju veći značaj u regulaciji *VHL* tumorskog supresora u PTC. Iako je druga grupa ispitivanih uzoraka bila manja, imajući u vidu da je analizirano sveže zamrznuto postoperativno tkivo, rezultati dobijeni njenom analizom u osnovi potkrepljuju zaključke dobijene analizom arhivskih uzoraka PTC tkiva. Jedan od značajnijih rezultata je i taj da, dok kod nekih bolesnika sa PTC dolazi do pada nivoa ekspresije *VHL* u tumorskom tkivu u odnosu na neizmenjeno tireoidno tkivo (što je,

prema našim rezultatima u vezi sa agresivnijim biološkim ponašanjem tumora), kod drugih bolesnika sa PTC dolazi do porasta nivoa ekspresije *VHL*. Biološki značaj ove pojave i njen dijagnostički/terapijski potencijal će biti rasvetljeni u budućim istraživanjima. Ova studija je takođe i jedna od prvih studija koje su ispitivale ekspresiju miR-92a u PTC. Rezultati ovog segmenta studije su pokazali da je ekspresija miR-92a poremećena u ovim karcinomima i ukazuju na potencijalnu ulogu ove mikroRNK u patogenezi PTC, otvarajući još jedno novo polje istraživanja.

Rezultati ovde prikazane studije sugerišu da bi evaluacija ekspresije VHL tumorskog supresora mogla imati klinički značaj u prognozi agresivnijeg toka bolesti kod bolesnika sa PTC. Za potvrdu ovih rezultata potrebne su studije na većem broju uzoraka, kao i dublje funkcionalne analize koje bi rasvetlile preciznu ulogu i mehanizme delovanja i regulacije VHL i miR-92a u PTC. Sagledavanje uloge VHL tumorskog supresora u biologiji PTC otvoriće takođe i mogućnost za dizajniranje i primenu ciljanih molekularnih terapija koje bi kao rezultat imale inhibiciju angiogeneze, jednog od ključnih procesa neoplastične transformacije, koji je odgovoran za rast i širenje tumora.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u prikazanoj studiji izvedeni su sledeći zaključci:

1. Analizom ekspresije *VHL* iRNK i proteina u uzorcima papilarnih karcinoma tireoidee utvrđeno je da u toku onkogeneze ovih karcinoma dolazi do poremećaja ekspresije *VHL* tumorskog supresora.
2. Snižena ekspresija *VHL* iRNK povezana je sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama PTC koje ukazuju na agresivnije ponašanje. Ovaj rezultat govori u prilog tome da je nivo ekspresije *VHL* iRNK potencijalni biološki marker agresivnijeg ponašanja tumora i potencijalni kandidat kao prognostički parametar za stratifikaciju bolesnika sa PTC u grupe sa različitim rizikom za progresiju bolesti.
3. U odnosu na nivo *VHL* iRNK ekspresije u PTC i odgovarajućem neizmenjenom tireoidnom tkivu, utvrđeno je postojanje dve grupe bolesnika – oni sa sniženom i oni sa povišenom ekspresijom *VHL* u tumorskom tkivu. Ovaj rezultat ukazuje na to da nivo ekspresije *VHL* možda može biti osnov za selekciju bolesnika koji bi imali benefit od potencijalnih ciljanih antiangiogenih molekularskih terapija.
4. Odsustvo mutacionih promena u kodirajućem regionu gena *VHL* ukazuje na to da mutacije u sekvenci ovog gena nisu čest događaj u patogenezi PTC. Na osnovu toga, zaključeno je da su za promene u ekspresiji *VHL* u toku onkogeneze PTC od većeg značaja drugi regulatorni mehanizmi.
5. Analizom ekspresije miR-92a u uzorcima papilarnih karcinoma tireoidee utvrđeno je da u toku onkogeneze ovih karcinoma dolazi do poremećaja ekspresije ove mikroRNK. Takođe, utvrđena je i značajna veza između povišenog nivoa ekspresije miR-92a i prisustva nodalnih metastaza kod

bolesnika sa PTC. Ovi rezultati ukazuju na moguću ulogu miR-92a u patogenezi PTC.

6. S obzirom da u glavnini ispitanih uzoraka nije utvrđena značajna korelacija nivoa ekspresije VHL i miR-92a, zaključeno je da ova mikroRNK verovatno nema značajniju ulogu u regulaciji nivoa ekspresije ovog tumorskog supresora u patogenezi PTC.

7. LITERATURA

- Acunzo, Mario, Giulia Romano, Dorothee Wernicke, and Carlo M. Croce. 2015. "MicroRNA and Cancer – A Brief Overview." *Advances in Biological Regulation* 57 (January): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.09.013>.
- Al-Nakhle, H., P. A. Burns, M. Cummings, A. M. Hanby, T. A. Hughes, S. Satheesha, A. M. Shaaban, L. Smith, and V. Speirs. 2010. "Estrogen Receptor 1 Expression Is Regulated by MiR-92 in Breast Cancer." *Cancer Research* 70 (11): 4778–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4104>.
- Al-Sheikh, Yazeed A., Hazem K. Ghneim, Khalil I. Softa, Abdulrahman A. Al-Jobran, Omar Al-Obeed, Mansoor A.V. Mohamed, Maha Abdulla, and Mourad A.M. Aboul-Soud. 2016. "Expression Profiling of Selected MicroRNA Signatures in Plasma and Tissues of Saudi Colorectal Cancer Patients by QPCR." *Oncology Letters* 11 (2): 1406–12. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.4068>.
- Andreasson, Adam, Nimrod B Kiss, Stefano Caramuta, Luqman Sulaiman, Fredrika Svahn, Martin Bäckdahl, Anders Höög, C Christofer Juhlin, and Catharina Larsson. 2013. "The *VHL* Gene Is Epigenetically Inactivated in Pheochromocytomas and Abdominal Paragangliomas." *Epigenetics* 8 (12): 1347–54. <https://doi.org/10.4161/epi.26686>.
- Asa, Sylvia L. 2017. "The Evolution of Differentiated Thyroid Cancer." *Pathology* 49 (3): 229–37. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.01.001>.
- Asa, Sylvia L., Thomas J. Giordano, and Virginia A. LiVolsi. 2015. "Implications of the TCGA Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma for Thyroid Pathology: Does Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma Exist?" *Thyroid* 25 (1): 1–2. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0540>.
- Asa, Sylvia L., and Ozgur Mete. 2013. "Thyroid Neoplasms of Follicular Cell Derivation: A Simplified Approach." *Seminars in Diagnostic Pathology* 30 (3): 178–85. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2013.06.004>.
- Balasubramaniam, Sanjeeve, Elaine Ron, Gloria Gridley, Arthur B. Schneider, and Alina V. Brenner. 2012. "Association between Benign Thyroid and Endocrine Disorders and Subsequent Risk of Thyroid Cancer among 4.5 Million U.S. Male Veterans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (8): 2661–69. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2996>.
- Baldini, Enke, Chiara Tuccilli, Yannick Arlot-Bonnemains, Frank Chesnel, Salvatore Sorrenti, Corrado De Vito, Antonio Catania, et al. 2017. "Deregulated Expression of VHL mRNA Variants in Papillary Thyroid Cancer." *Molecular and Cellular Endocrinology* 443 (March): 121–27. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.019>.

- Barry, Robert E., and Wilhelm Krek. 2004. "The von Hippel–Lindau Tumour Suppressor: A Multi-Faceted Inhibitor of Tumourigenesis." *Trends in Molecular Medicine* 10 (9): 466–72. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.07.008>.
- Baudin, E., J. P. Travagli, J. Ropers, F. Mancusi, G. Bruno-Bossio, B. Caillou, A. F. Cailleux, J. D. Lumbroso, C. Parmentier, and M. Schlumberger. 1998. "Microcarcinoma of the Thyroid Gland: The Gustave-Roussy Institute Experience." *Cancer* 83 (3): 553–59.
- Benetatos, L, A Dasoula, N Syed, E Hatzimichael, T Crook, and K L Bourantas. 2008. "Methylation Analysis of the von Hippel-Lindau Gene in Acute Myeloid Leukaemia and Myelodysplastic Syndromes." *Leukemia* 22 (6): 1293–95. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2405053>.
- Blancher, C., J. W. Moore, N. Robertson, and A. L. Harris. 2001. "Effects of Ras and von Hippel-Lindau (VHL) Gene Mutations on Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , and Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Their Regulation by the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signaling Pathway." *Cancer Research* 61 (19): 7349–55.
- Cady, B., and R. Rossi. 1988. "An Expanded View of Risk-Group Definition in Differentiated Thyroid Carcinoma." *Surgery* 104 (6): 947–53.
- Caini, Saverio, Bianca Gibelli, Domenico Palli, Calogero Saieva, Massimiliano Ruscica, and Sara Gandini. 2015. "Menstrual and Reproductive History and Use of Exogenous Sex Hormones and Risk of Thyroid Cancer among Women: A Meta-Analysis of Prospective Studies." *Cancer Causes & Control: CCC* 26 (4): 511–18. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0546-z>.
- Cao, Yijuan, Zengyan Wang, Juan Gu, Fangfang Hu, Yujuan Qi, Qianqian Yin, Qingqing Sun, Guotao Li, and Bin Quan. 2015. "Reproductive Factors but Not Hormonal Factors Associated with Thyroid Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BioMed Research International* 2015: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/103515>.
- Caronia, L. M., J. E. Phay, and M. H. Shah. 2011. "Role of BRAF in Thyroid Oncogenesis." *Clinical Cancer Research* 17 (24): 7511–17. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1155>.
- Chakraborty, Chandraditya, Sraboni Mitra, Anirban Roychowdhury, Sudip Samadder, Sankhadeep Dutta, Anup Roy, Pradip Das, et al. 2018. "Deregulation of LIMD1–VHL–HIF-1 α –VEGF Pathway Is Associated with Different Stages of Cervical Cancer." *Biochemical Journal* 475 (10): 1793–1806. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170649>.
- Chen, Amy Y., Ahmedin Jemal, and Elizabeth M. Ward. 2009. "Increasing Incidence of Differentiated Thyroid Cancer in the United States, 1988-2005." *Cancer* 115 (16): 3801–7. <https://doi.org/10.1002/cncr.24416>.

- Chen, Changbao, Hua Zhou, Xiaoguang Liu, Zhongjun Liu, and Qingjun Ma. 2011. "Reduced Expression of von Hippel-Lindau Protein Correlates with Decreased Apoptosis and High Chondrosarcoma Grade." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 93 (19): 1833–40. <https://doi.org/10.2106/JBJS.I.01553>.
- Chen, Zhao-li, Xiao-hong Zhao, Ji-wen Wang, Bao-zhong Li, Zhen Wang, Jian Sun, Feng-wei Tan, et al. 2011. "MicroRNA-92a Promotes Lymph Node Metastasis of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma via E-Cadherin." *Journal of Biological Chemistry* 286 (12): 10725–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165654>.
- Chomzynski, P, and N Sacchi. 1987. "Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction." *Analytical Biochemistry* 162 (1): 156–59. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
- Chou, Angela, Christopher Toon, Justine Pickett, and Anthony J. Gill. 2013. "Von Hippel-Lindau Syndrome." In *Frontiers of Hormone Research*, edited by C.A. Stratakis, 41:30–49. Basel: S. KARGER AG. <https://doi.org/10.1159/000345668>.
- Cockman, M. E., N. Masson, D. R. Mole, P. Jaakkola, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. R. Maher, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and P. H. Maxwell. 2000. "Hypoxia Inducible Factor-Alpha Binding and Ubiquitylation by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (33): 25733–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002740200>.
- Cohen, Herbert T., Mi Zhou, Adam M. Welsh, Sharzad Zarghamee, Holger Scholz, Debabrata Mukhopadhyay, Takeshi Kishida, Berton Zbar, Bertrand Knebelmann, and Vikas P. Sukhatme. 1999. "An Important von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Domain Mediates Sp1-Binding and Self-Association." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266 (1): 43–50. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1767>.
- Cohen, Y., M. Xing, E. Mambo, Z. Guo, G. Wu, B. Trink, U. Beller, W. H. Westra, P. W. Ladenson, and D. Sidransky. 2003. "BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma." *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 95 (8): 625–27. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.8.625>.
- Cooper, David S., Gerard M. Doherty, Bryan R. Haugen, Richard T. Kloos, Stephanie L. Lee, Susan J. Mandel, Ernest L. Mazzaferri, et al. 2009. "Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer." *Thyroid* 19 (11): 1167–1214. <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0110>.
- Corless, C. L., A. S. Kibel, O. Iliopoulos, and W. G. Kaelin. 1997. "Immunostaining of the von Hippel-Lindau Gene Product in Normal and Neoplastic Human Tissues." *Human Pathology* 28 (4): 459–64.

- Costa, Valerio, Roberta Esposito, Carmela Ziviello, Romina Sepe, Larissa Valdemarin Bim, Nunzio Antonio Cacciola, Myriam Decaussin-Petrucci, Pierlorenzo Pallante, Alfredo Fusco, and Alfredo Ciccodicola. 2015. "New Somatic Mutations and *WNK1-B4GALNT3* Gene Fusion in Papillary Thyroid Carcinoma." *Oncotarget* 6 (13). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3593>.
- Dandanell, Mette, Lennart Friis-Hansen, Lone Sunde, Finn C. Nielsen, and Thomas V. O. Hansen. 2012. "Identification of 3 Novel VHL Germ-Line Mutations in Danish VHL Patients." *BMC Medical Genetics* 13 (July): 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-54>.
- Datta, K., R. Nambudripad, S. Pal, M. Zhou, H. T. Cohen, and D. Mukhopadhyay. 2000. "Inhibition of Insulin-like Growth Factor-I-Mediated Cell Signaling by the von Hippel-Lindau Gene Product in Renal Cancer." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20700–706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909970199>.
- Datta, Kaustubh, Susanta Mondal, Sutapa Sinha, Jinping Li, Enfeng Wang, Bertrand Knebelmann, S. Ananth Karumanchi, and Debabrata Mukhopadhyay. 2005. "Role of Elongin-Binding Domain of von Hippel Lindau Gene Product on HuR-Mediated VPF/VEGF mRNA Stability in Renal Cell Carcinoma." *Oncogene* 24 (53): 7850–58. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208912>.
- Datta, Kaustubh, Christian Sundberg, S. Ananth Karumanchi, and Debabrata Mukhopadhyay. 2001. "The 104–123 Amino Acid Sequence of the β -Domain of von Hippel-Lindau Gene Product Is Sufficient to Inhibit Renal Tumor Growth and Invasion." *Cancer Research* 61 (5): 1768.
- Davies, Louise, and H Gilbert Welch. 2006. "Increasing Incidence of Thyroid Cancer in the United States, 1973-2002." *JAMA* 295 (18): 4.
- DeLellis, Ronald A., ed. 2004. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. World Health Organization Classification of Tumours of Endocrine Organs 8. Lyon: IARC Press.
- Dideban, Shiva, Alireza Abdollahi, Alipasha Meysamie, Shokouh Sedghi, and Mona Shahriari. 2016. "Thyroid Papillary Microcarcinoma: Etiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, Follow-up, Histopathology and Prognosis," 19.
- Dmitriev, Alexey A., Vladimir I. Kashuba, Klas Haraldson, Vera N. Senchenko, Tatiana V. Pavlova, Anna V. Kudryavtseva, Ekaterina A. Anedchenko, et al. 2012. "Genetic and Epigenetic Analysis of Non-Small Cell Lung Cancer with NotI-Microarrays." *Epigenetics* 7 (5): 502–13. <https://doi.org/10.4161/epi.19801>.
- Dulaimi, Essel, Inmaculada Ibanez de Caceres, Robert G. Uzzo, Tahseen Al-Saleem, Richard E. Greenberg, Thomas J. Polascik, James S. Babb, William E. Grizzle, and Paul Cairns. 2004. "Promoter Hypermethylation Profile of Kidney Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (12 Pt 1): 3972–79. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0175>.

- “ECIS - European Cancer Information System.” 2018. 2018. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>.
- Elisei, Rossella, Cristina Romei, Barbara Cosci, Laura Agate, Valeria Bottici, Eleonora Molinaro, Mariangela Sculli, et al. 2007. “RET Genetic Screening in Patients with Medullary Thyroid Cancer and Their Relatives: Experience with 807 Individuals at One Center.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (12): 4725–29. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1005>.
- Enewold, L., K. Zhu, E. Ron, A. J. Marrogi, A. Stojadinovic, G. E. Peoples, and S. S. Devesa. 2009. “Rising Thyroid Cancer Incidence in the United States by Demographic and Tumor Characteristics, 1980-2005.” *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18 (3): 784–91. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0960>.
- Falvo, Laura, Antonio Catania, Vito D’Andrea, Antonella Marzullo, Maria Cristina Giustiniani, and Enrico De Antoni. 2005. “Prognostic Importance of Histologic Vascular Invasion in Papillary Thyroid Carcinoma.” *Annals of Surgery* 241 (4): 640–46.
- Foster, K., R. J. Osborne, R. A. Huddart, N. A. Affara, M. A. Ferguson-Smith, and E. R. Maher. 1995. “Molecular Genetic Analysis of the von Hippel-Lindau Disease (VHL) Tumour Suppressor Gene in Gonadal Tumours.” *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 31A (13–14): 2392–95.
- Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster. 2008. “Real-Time PCR”. In *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. edited by SR Gallagher and EA Wiley. 1sted., 10.3.1-10.3.33. John Wiley & Sons, Inc.
- Franceschi, S., S. Preston-Martin, L. Dal Maso, E. Negri, C. La Vecchia, W. J. Mack, A. McTiernan, et al. 1999. “A Pooled Analysis of Case-Control Studies of Thyroid Cancer. IV. Benign Thyroid Diseases.” *Cancer Causes & Control: CCC* 10 (6): 583–95.
- Frew, Ian J, and Wilhelm Krek. 2007. “Multitasking by PVHL in Tumour Suppression.” *Current Opinion in Cell Biology* 19 (6): 685–90. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.10.001>.
- Fukushima, Toshihiko, Shinichi Suzuki, Miyuki Mashiko, Tohru Ohtake, Yoshiyuki Endo, Yuji Takebayashi, Koji Sekikawa, Koichi Hagiwara, and Seiichi Takenoshita. 2003. “BRAF Mutations in Papillary Carcinomas of the Thyroid.” *Oncogene* 22 (41): 6455–57. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206739>.
- Gardner, Richard E., R. Michael Tuttle, Kenneth D. Burman, Shinin Haddady, Cynthia Truman, Yvonne H. Sparling, Leonard Wartofsky, Roy B. Sessions, and Matthew D. Ringel. 2000. “Prognostic Importance of Vascular Invasion in Papillary Thyroid Carcinoma.” *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 126 (3): 309. <https://doi.org/10.1001/archotol.126.3.309>.

- Ghosh, A. K., T. D. Shanafelt, A. Cimmino, C. Taccioli, S. Volinia, C.-g. Liu, G. A. Calin, et al. 2009. "Aberrant Regulation of PVHL Levels by MicroRNA Promotes the HIF/VEGF Axis in CLL B Cells." *Blood* 113 (22): 5568–74. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-185686>.
- Giles, R H, M P Lolkema, C M Snijckers, M Belderbos, P van der Groep, D A Mans, M van Beest, et al. 2006. "Interplay between VHL/HIF1 α and Wnt/ β -Catenin Pathways during Colorectal Tumorigenesis." *Oncogene* 25 (21): 3065–70. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209330>.
- Gnarra, J. R., D. R. Duan, Y. Weng, J. S. Humphrey, D. Y. Chen, S. Lee, A. Pause, et al. 1996. "Molecular Cloning of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene and Its Role in Renal Carcinoma." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1242 (3): 201–10.
- Gnarra, J.R., K. Tory, Y. Weng, L. Schmidt, M.H. Wei, H. Li, F. Latif, et al. 1994. "Mutations of the VHL Tumour Suppressor Gene in Renal Carcinoma." *Nature Genetics* 7 (1): 85–90. <https://doi.org/10.1038/ng0594-85>.
- Gonzalez-Gonzalez, Rogelio, Ronell Bologna-Molina, Ramón Gil Carreon-Burciaga, Marcelo Gómezpalacio-Gastelum, Nelly Molina-Frechero, and Sirced Salazar-Rodríguez. 2011. "Papillary Thyroid Carcinoma: Differential Diagnosis and Prognostic Values of Its Different Variants: Review of the Literature." *ISRN Oncology* 2011: 1–9. <https://doi.org/10.5402/2011/915925>.
- Gossage, Lucy, Tim Eisen, and Eamonn R. Maher. 2015. "VHL, the Story of a Tumour Suppressor Gene." *Nature Reviews Cancer* 15 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1038/nrc3844>.
- Grebe, Stefan K. G., Bryan McIver, Ian D. Hay, Patricia S.-C. Wu, Lea M. Z. Maciel, Harry A. Drabkin, John R. Goellner, Clive S. Grant, Robert B. Jenkins, and Norman L. Eberhardt. 1997. "Frequent Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3p and 17p without *VHL* or *P53* Mutations Suggests Involvement of Unidentified Tumor Suppressor Genes in Follicular Thyroid Carcinoma¹." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82 (11): 3684–91. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.11.4352>.
- Guyton, Arthur C., and John E. Hall. 2006. "Thyroid Metabolic Hormones." In *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed., 934–38. Elsevier Inc.
- Harasawa, Makiko, Masanori Yasuda, Takeshi Hirasawa, Masaki Miyazawa, Masako Shida, Toshinari Muramatsu, Kensho Douguchi, et al. 2011. "Analysis of MTOR Inhibition-Involved Pathway in Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma." *Acta Histochemica et Cytochemica* 44 (2): 113–18. <https://doi.org/10.1267/ahc.10029>.
- Hasegawa, Hisashi, Yoshiaki Kusumi, Takeshi Asakawa, Miyoko Maeda, Toshinori Oinuma, Tohru Furusaka, Takeshi Oshima, and Mariko Esumi. 2017. "Expression of von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Protein (PVHL)

- Characteristic of Tongue Cancer and Proliferative Lesions in Tongue Epithelium.” *BMC Cancer* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3364-8>.
- Hay, I. D. 1990. “Papillary Thyroid Carcinoma.” *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 19 (3): 545–76.
- Hay, I. D., E. J. Bergstralh, J. R. Goellner, J. R. Ebersold, and C. S. Grant. 1993. “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* 114 (6): 1050–57; discussion 1057-1058.
- Hayes, Josie, Pier Paolo Peruzzi, and Sean Lawler. 2014. “MicroRNAs in Cancer: Biomarkers, Functions and Therapy.” *Trends in Molecular Medicine* 20 (8): 460–69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>.
- Haymart, M. R. 2009. “Understanding the Relationship Between Age and Thyroid Cancer.” *The Oncologist* 14 (3): 216–21. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0194>.
- He, Lin, J. Michael Thomson, Michael T. Hemann, Eva Hernando-Monge, David Mu, Summer Goodson, Scott Powers, et al. 2005. “A MicroRNA Polycistron as a Potential Human Oncogene.” *Nature* 435 (7043): 828–33. <https://doi.org/10.1038/nature03552>.
- Hergovich, Alexander, Joanna Lisztwan, Robert Barry, Pia Ballschmieter, and Wilhelm Krek. 2003. “Regulation of Microtubule Stability by the von Hippel-Lindau Tumour Suppressor Protein PVHL.” *Nature Cell Biology* 5 (1): 64–70. <https://doi.org/10.1038/ncb899>.
- Herman, J. G., F. Latif, Y. Weng, M. I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D. S. Duan, J. R. Gnarr, and W. M. Linehan. 1994. “Silencing of the VHL Tumor-Suppressor Gene by DNA Methylation in Renal Carcinoma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (21): 9700–9704.
- Hinze, Raoul, Carsten Boltze, Axel Meye, Hans-Jürgen Holzhausen, Henning Dralle, and Friedrich-Wilhelm Rath. 2000. “Expression of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene in Nonneoplastic and Neoplastic Lesions of the Thyroid.” *Endocrine Pathology* 11 (2): 145–55.
- Hippel, E. von. 1904. “Ueber Eine Sehr Seltene Erkrankung Der Nethaut.” *Graefes Arch Ophthalmol* 59: 83–106.
- Hoebeek, Jasmien, Rob van der Luijt, Bruce Poppe, Els De Smet, Nurten Yigit, Kathleen Claes, Richard Zewald, et al. 2005. “Rapid Detection of VHL Exon Deletions Using Real-Time Quantitative PCR.” *Laboratory Investigation* 85 (1): 24–33. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700209>.

- Hoebeek, Jasmien, Jo Vandesompele, Helén Nilsson, Katleen De Preter, Nadine Van Roy, Els De Smet, Nurten Yigit, et al. 2006. "The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Expression Level Has Prognostic Value in Neuroblastoma." *International Journal of Cancer* 119 (3): 624–29. <https://doi.org/10.1002/ijc.21888>.
- Hoque, M. O., E. Rosenbaum, W. H. Westra, M. Xing, P. Ladenson, M. A. Zeiger, D. Sidransky, and C. B. Umbricht. 2005. "Quantitative Assessment of Promoter Methylation Profiles in Thyroid Neoplasms." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (7): 4011–18. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0313>.
- Hou, P., D. Liu, and M. Xing. 2011. "Genome-Wide Alterations in Gene Methylation by the BRAF V600E Mutation in Papillary Thyroid Cancer Cells." *Endocrine Related Cancer* 18 (6): 687–97. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0212>.
- Howell, G. M., S. P. Hodak, and L. Yip. 2013. "RAS Mutations in Thyroid Cancer." *The Oncologist* 18 (8): 926–32. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0072>.
- Hu, Dong, Zhuan Zhou, Nancy E. Davidson, Yi Huang, and Yong Wan. 2012. "Novel Insight into KLF4 Proteolytic Regulation in Estrogen Receptor Signaling and Breast Carcinogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 287 (17): 13584–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343566>.
- Hu, Shuiying, Dingxie Liu, Ralph P. Tufano, Kathryn A. Carson, Eli Rosenbaum, Yoram Cohen, Elizabeth H. Holt, et al. 2006. "Association of Aberrant Methylation of Tumor Suppressor Genes with Tumor Aggressiveness and BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer." *International Journal of Cancer* 119 (10): 2322–29. <https://doi.org/10.1002/ijc.22110>.
- Hunt, Jennifer L., John H. Yim, Michael Tometsko, Sydney D. Finkelstein, Patricia Swalsky, and Sally E. Carty. 2003. "Loss of Heterozygosity of the VHL Gene Identifies Malignancy and Predicts Death in Follicular Thyroid Tumors." *Surgery* 134 (6): 1043–47. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2003.07.023>.
- Huynh, H. 2004. "Overexpression of Tumour Suppressor Retinoblastoma 2 Protein (PRb2/P130) in Hepatocellular Carcinoma." *Carcinogenesis* 25 (8): 1485–94. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh154>.
- Iliopoulos, O., M. Ohh, and W. G. Kaelin. 1998. "PVHL19 Is a Biologically Active Product of the von Hippel-Lindau Gene Arising from Internal Translation Initiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (20): 11661–66.
- Inoue, Keiji, Atsushi Kurabayashi, Taro Shuin, Yuji Ohtsuki, and Mutsuo Furihata. 2012. "Overexpression of P53 Protein in Human Tumors." *Medical Molecular Morphology* 45 (3): 115–23. <https://doi.org/10.1007/s00795-012-0575-6>.

- Ito, Yasuhiro, Takumi Kudo, Minoru Kihara, Yuuki Takamura, Kaoru Kobayashi, Akihiro Miya, and Akira Miyauchi. 2012. "Prognosis of Low-Risk Papillary Thyroid Carcinoma Patients: Its Relationship with the Size of Primary Tumors." *Endocrine Journal* 59 (2): 119–25.
- Ito, Yasuhiro, Akira Miyauchi, Minoru Kihara, Takuya Higashiyama, Kaoru Kobayashi, and Akihiro Miya. 2014. "Prognostic Significance of Young Age in Papillary Thyroid Carcinoma: Analysis of 5,733 Patients with 150 Months' Median Follow-Up." *Endocrine Journal* 61 (5): 491–97.
- Ito, Yasuhiro, Akira Miyauchi, Minoru Kihara, Kaoru Kobayashi, and Akihiro Miya. 2014. "Prognostic Values of Clinical Lymph Node Metastasis and Macroscopic Extrathyroid Extension in Papillary Thyroid Carcinoma." *Endocrine Journal* 61 (8): 745–50.
- Ito, Yasuhiro, Akira Miyauchi, Kaoru Kobayashi, Minoru Kihara, and Akihiro Miya. 2014. "Static and Dynamic Prognostic Factors of Papillary Thyroid Carcinoma [Review]." *Endocrine Journal* 61 (12): 1145–51. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0303>.
- Iwai, K., K. Yamanaka, T. Kamura, N. Minato, R. C. Conaway, J. W. Conaway, R. D. Klausner, and A. Pause. 1999. "Identification of the von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor Protein as Part of an Active E3 Ubiquitin Ligase Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (22): 12436–41.
- Jikuzono, Tomoo, Masashi Kawamoto, Hiroshi Yoshitake, Kunio Kikuchi, Haruki Akasu, Hitoshi Ishikawa, Mitsuyoshi Hirokawa, et al. 2013. "The MiR-221/222 Cluster, MiR-10b and MiR-92a Are Highly Upregulated in Metastatic Minimally Invasive Follicular Thyroid Carcinoma." *International Journal of Oncology* 42 (6): 1858–68. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1879>.
- Jukkola, Arja, Risto Bloigu, Tapani Ebeling, Pasi Salmela, and Guillermo Blanco. 2004. "Prognostic Factors in Differentiated Thyroid Carcinomas and Their Implications for Current Staging Classifications." *Endocrine-Related Cancer* 11 (3): 571–79.
- Kaelin, William G. 2007. "Von Hippel-Lindau Disease." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2 (1): 145–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.092049>.
- Kamura, T., S. Sato, K. Iwai, M. Czyzyk-Krzeska, R. C. Conaway, and J. W. Conaway. 2000. "Activation of HIF1alpha Ubiquitination by a Reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (19): 10430–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.190332597>.

- Katoh, H., K. Yamashita, T. Enomoto, and M. Watanabe. 2015. "Classification and General Considerations of Thyroid Cancer." *Ann Clin Pathol* 3(1): 1045. <https://www.jscimedcentral.com/Pathology/pathology-3-1045.pdf>
- Katoh, R., J. Sasaki, H. Kurihara, K. Suzuki, Y. Iida, and A. Kawaoi. 1992. "Multiple Thyroid Involvement (Intraglandular Metastasis) in Papillary Thyroid Carcinoma. A Clinicopathologic Study of 105 Consecutive Patients." *Cancer* 70 (6): 1585–90.
- Khatami, Fatemeh, Bagher Larijani, Ramin Heshmat, Abbasali Keshtkar, Mahsa Mohammadamoli, Ladan Teimoori-Toolabi, Shirzad Nasiri, and Seyed Mohammad Tavangar. 2017. "Meta-Analysis of Promoter Methylation in Eight Tumor-Suppressor Genes and Its Association with the Risk of Thyroid Cancer." Edited by Hiroyoshi Ariga. *PLOS ONE* 12 (9): e0184892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184892>.
- Kim, Hye Jeong, Seo Young Sohn, Hye Won Jang, Sun Wook Kim, and Jae Hoon Chung. 2013. "Multifocality, But Not Bilaterality, Is a Predictor of Disease Recurrence/Persistence of Papillary Thyroid Carcinoma." *World Journal of Surgery* 37 (2): 376–84. <https://doi.org/10.1007/s00268-012-1835-2>.
- Kim, Kuk-Jin, Seok-Mo Kim, Yong Sang Lee, Woong Youn Chung, Hang-Seok Chang, and Cheong Soo Park. 2015. "Prognostic Significance of Tumor Multifocality in Papillary Thyroid Carcinoma and Its Relationship with Primary Tumor Size: A Retrospective Study of 2,309 Consecutive Patients." *Annals of Surgical Oncology* 22 (1): 125–31. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3899-8>.
- Kim, William Y., and William G. Kaelin. 2004. "Role of *VHL* Gene Mutation in Human Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 22 (24): 4991–5004. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.061>.
- Kimura, Edna T, Marina N Nikiforova, Zhaowen Zhu, Jeffrey A Knauf, Yuri E Nikiforov, and James A Fagin. 2003. "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," 5.
- Kitamura, Hiroshi, and Taiji Tsukamoto. 2008. "Prognostic Biomarkers of Renal Cell Carcinoma: Recent Advances." *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India* 24 (1): 10–15. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.38596>.
- Knauf, Jeffrey A., Hiroaki Kuroda, Saswata Basu, and James A. Fagin. 2003. "RET/PTC-Induced Dedifferentiation of Thyroid Cells Is Mediated through Y1062 Signaling through SHC-RAS-MAP Kinase." *Oncogene* 22 (28): 4406–12. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206602>.
- Koch, Christian A, Frederieke M Brouwers, Alexander O Vortmeyer, Andrea Tannapfel, Steven K Libutti, Zhengping Zhuang, Karel Pacak, Hartmut PH Neumann, and Ralf Paschke. 2006. "Somatic VHLgene Alterations in MEN2-

Associated Medullary Thyroid Carcinoma.” *BMC Cancer* 6 (1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-131>.

- Koperek, Oskar, Oliver Bergner, Bettina Pichlhöfer, Felicitas Oberndorfer, Johannes A Hainfellner, Klaus Kaserer, Reinhard Horvat, Adrian L Harris, Bruno Niederle, and Peter Birner. 2011. “Expression of Hypoxia-Associated Proteins in Sporadic Medullary Thyroid Cancer Is Associated with Desmoplastic Stroma Reaction and Lymph Node Metastasis and May Indicate Somatic Mutations in the VHL Gene.” *The Journal of Pathology* 225 (1): 63–72.
<https://doi.org/10.1002/path.2926>.
- Krek, W. 2000. “VHL Takes HIF’s Breath Away.” *Nature Cell Biology* 2 (7): E121–123. <https://doi.org/10.1038/35017129>.
- Kumar, S. M., H. Yu, R. Edwards, L. Chen, S. Kazianis, P. Brafford, G. Acs, M. Herlyn, and X. Xu. 2007. “Mutant V600E BRAF Increases Hypoxia Inducible Factor-1 Expression in Melanoma.” *Cancer Research* 67 (7): 3177–84.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3312>.
- Kurban, Ghada, Valérie Hudon, Eric Duplan, Michael Ohh, and Arnim Pause. 2006. “Characterization of a von Hippel Lindau Pathway Involved in Extracellular Matrix Remodeling, Cell Invasion, and Angiogenesis.” *Cancer Research* 66 (3): 1313–19. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2560>.
- Kuznetsova, Anna V., Jaroslaw Meller, Phillip O. Schnell, James A. Nash, Monika L. Ignacak, Yolanda Sanchez, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, and Maria F. Czyzyk-Krzeska. 2003. “Von Hippel-Lindau Protein Binds Hyperphosphorylated Large Subunit of RNA Polymerase II through a Proline Hydroxylation Motif and Targets It for Ubiquitination.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5): 2706–11.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0436037100>.
- La Vecchia, Carlo, Matteo Malvezzi, Cristina Bosetti, Werner Garavello, Paola Bertuccio, Fabio Levi, and Eva Negri. 2015. “Thyroid Cancer Mortality and Incidence: A Global Overview: Thyroid Cancer Mortality and Incidence.” *International Journal of Cancer* 136 (9): 2187–95.
<https://doi.org/10.1002/ijc.29251>.
- Landa, Iñigo, Ian Ganly, Timothy A. Chan, Norisato Mitsutake, Michiko Matsuse, Tihana Ibrahimasic, Ronald A. Ghossein, and James A. Fagin. 2013. “Frequent Somatic *TERT* Promoter Mutations in Thyroid Cancer: Higher Prevalence in Advanced Forms of the Disease.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (9): E1562–66. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2383>.
- Latif, F., K. Tory, J. Gnarr, M. Yao, F. M. Duh, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, I. Kuzmin, W. Modi, and L. Geil. 1993. “Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene.” *Science (New York, N.Y.)* 260 (5112): 1317–20.

- Lebastchi, Amir H., and Glenda G. Callender. 2014. "Thyroid Cancer." *Current Problems in Cancer* 38 (2): 48–74. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2014.04.001>.
- Li, Zaibo, Xi Na, Dakun Wang, Susan R. Schoen, Edward M. Messing, and Guan Wu. 2002. "Ubiquitination of a Novel Deubiquitinating Enzyme Requires Direct Binding to von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 4656–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108269200>.
- Li, Zaibo, Dakun Wang, Edward M. Messing, and Guan Wu. 2005. "VHL Protein-Interacting Deubiquitinating Enzyme 2 Deubiquitinates and Stabilizes HIF-1alpha." *EMBO Reports* 6 (4): 373–78. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400377>.
- Lim, Hyeyeun, Susan S. Devesa, Julie A. Sosa, David Check, and Cari M. Kitahara. 2017. "Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013." *JAMA* 317 (13): 1338. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2719>.
- Lin, Jen-Der, Chuen Hsueh, and Tzu-Chieh Chao. 2016. "Soft Tissue Invasion of Papillary Thyroid Carcinoma." *Clinical & Experimental Metastasis* 33 (6): 601–8. <https://doi.org/10.1007/s10585-016-9800-3>.
- Lindau, A. 1927. "Zur Frage Der Angiomatosis Retinae Und Ihrer Hirncomplication." *Acta Ophthalmol (Copenh)*, no. 4: 193–226.
- Lisztwan, J., G. Imbert, C. Wirbelauer, M. Gstaiger, and W. Krek. 1999. "The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Is a Component of an E3 Ubiquitin-Protein Ligase Activity." *Genes & Development* 13 (14): 1822–33.
- Liu, Ting, Le Zhao, Wei Chen, Zhen Li, Huilian Hou, Lu Ding, and Xu Li. 2014. "Inactivation of von Hippel-Lindau Increases Ovarian Cancer Cell Aggressiveness through the HIF1 α /MiR-210/VMP1 Signaling Pathway." *International Journal of Molecular Medicine* 33 (5): 1236–42. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1661>.
- Liu, Yansheng, Andreas Beyer, and Ruedi Aebersold. 2016. "On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance." *Cell* 165 (3): 535–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>.
- LiVolsi, Virginia A. 2011. "Papillary Thyroid Carcinoma: An Update." *Modern Pathology* 24 (S2): S1–9. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.129>.
- Lonser, Russell R., Gladys M Glenn, McClellan Walther, Emily Y Chew, Steven K Libutti, W Marston Linehan, and Edward H Oldfield. 2003 "von Hippel-Lindau disease" *Lancet* 361: 2059–67.
- Los, M., G. H. Jansen, W. G. Kaelin, C. J. Lips, G. H. Blijham, and E. E. Voest. 1996. "Expression Pattern of the von Hippel-Lindau Protein in Human Tissues."

Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology 75 (2): 231–38.

- Lu, Zheming, Jindong Sheng, Yujie Zhang, Jianhua Deng, Yong Li, Aiping Lu, Juan Zhang, et al. 2016. “Clonality Analysis of Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma by Using Genetic Profiles: Field Cancerization and MPTC.” *The Journal of Pathology* 239 (1): 72–83. <https://doi.org/10.1002/path.4696>.
- Ma, En-Guang, Yu-Feng Bai, Wei Cao, Yan Cao, Yong-Gang Huang, Huan-Chen Cheng, and Rui-Hua An. 2017. “Cytosine 5-Hydroxymethylation Regulates VHL Gene Expression in Renal Clear Cell Carcinoma.” *Oncotarget* 8 (38): 63780–87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19070>.
- Maher, E. R., and W. G. Kaelin. 1997. “Von Hippel-Lindau Disease.” *Medicine* 76 (6): 381–91.
- Manni, Isabella, Simona Artuso, Silvia Careccia, Maria Giulia Rizzo, Renato Baserga, Giulia Piaggio, and Ada Sacchi. 2009. “The MicroRNA MiR-92 Increases Proliferation of Myeloid Cells and by Targeting P63 Modulates the Abundance of Its Isoforms.” *The FASEB Journal* 23 (11): 3957–66. <https://doi.org/10.1096/fj.09-131847>.
- Mao, F., WY Leung, and Xin X. 2007. “Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications.” *BMC Biotechnol.* 7:76. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-76>
- Matsuzu, Kenichi, Kiminori Sugino, Katsuhiko Masudo, Mitsuji Nagahama, Wataru Kitagawa, Hiroshi Shibuya, Keiko Ohkuwa, et al. 2014. “Thyroid Lobectomy for Papillary Thyroid Cancer: Long-Term Follow-up Study of 1,088 Cases.” *World Journal of Surgery* 38 (1): 68–79. <https://doi.org/10.1007/s00268-013-2224-1>.
- Maxwell, Patrick H., Michael S. Wiesener, Gin-Wen Chang, Steven C. Clifford, Emma C. Vaux, Matthew E. Cockman, Charles C. Wykoff, Christopher W. Pugh, Eamonn R. Maher, and Peter J. Ratcliffe. 1999. “The Tumour Suppressor Protein VHL Targets Hypoxia-Inducible Factors for Oxygen-Dependent Proteolysis.” *Nature* 399 (6733): 271–75. <https://doi.org/10.1038/20459>.
- Mazeh, Haggi, and Rebecca S. Sippel. 2013. “Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma.” *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* 23 (9): 1049–56. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0079>.
- Mazzaferri, Ernest L., and S. M. Jhiang. 1994. “Long-Term Impact of Initial Surgical and Medical Therapy on Papillary and Follicular Thyroid Cancer.” *The American Journal of Medicine* 97 (5): 418–28.
- Mazzaferri, Ernest L., and Richard T. Kloos. 2001. “Current Approaches to Primary Therapy for Papillary and Follicular Thyroid Cancer.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (4): 1447–63. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.4.7407>.

- Metzger, Rosemarie, and Mira Milas. 2014. "Inherited Cancer Syndromes and the Thyroid: An Update." *Current Opinion in Oncology* 26 (1): 51–61. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000030>.
- Migdalska-Sęk, Monika, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Karolina Czarnecka, Ewa Nawrot, Daria Domańska, Jan Brzeziński, Marek Dedecjus, and Ewa Brzeziańska. 2011. "Methylation Profile of Selected TSGs in Non-Cancerous Thyroid Tissue Adjacent to Primary PTC." *Współczesna Onkologia* 4: 191–97. <https://doi.org/10.5114/wo.2011.24312>.
- Miller, K. 2002. "Immunocytochemical Techniques." In *Theory and Practice of Histological Techniques*, edited by J.D. Bancroft and M. Gamble, 5th ed., 421–64. London, UK: Churchill Livingstone.
- Miyakis, S., T. Liloglou, S. Kearney, G. Xinarianos, D. A. Spandidos, and J. K. Field. 2003. "Absence of Mutations in the VHL Gene but Frequent Loss of Heterozygosity at 3p25-26 in Non-Small Cell Lung Carcinomas." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 39 (3): 273–77.
- Mukhopadhyay, D., B. Knebelmann, H. T. Cohen, S. Ananth, and V. P. Sukhatme. 1997. "The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Product Interacts with Sp1 to Repress Vascular Endothelial Growth Factor Promoter Activity." *Molecular and Cellular Biology* 17 (9): 5629–39.
- Nagy, Rebecca, and Matthew D. Ringel. 2015. "Genetic Predisposition for Nonmedullary Thyroid Cancer." *Hormones and Cancer* 6 (1): 13–20. <https://doi.org/10.1007/s12672-014-0205-y>.
- Namba, Hiroyuki, Masahiro Nakashima, Tomayoshi Hayashi, Naomi Hayashida, Shigeto Maeda, Tatiana I. Rogounovitch, Akira Ohtsuru, Vladimir A. Saenko, Takashi Kanematsu, and Shunichi Yamashita. 2003. "Clinical Implication of Hot Spot *BRAF* Mutation, V599E, in Papillary Thyroid Cancers." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88 (9): 4393–97. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030305>.
- Navarro Silvera, Stephanie A., Anthony B. Miller, and Thomas E. Rohan. 2005. "Risk Factors for Thyroid Cancer: A Prospective Cohort Study." *International Journal of Cancer* 116 (3): 433–38. <https://doi.org/10.1002/ijc.21079>.
- Ng, Soh-Ching, Sheng-Fong Kuo, Szu-Tah Chen, Chuen Hsueh, Bie-Yu Huang, and Jen-Der Lin. 2017. "Therapeutic Outcomes of Patients with Multifocal Papillary Thyroid Microcarcinomas and Larger Tumors." *International Journal of Endocrinology* 2017: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/4208178>.
- Nikiforov, Yuri E. 2006. "Radiation-Induced Thyroid Cancer: What We Have Learned from Chernobyl." *Endocrine Pathology* 17 (4): 307–17.
- Nikiforov, Yuri E. 2008. "Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets." *Modern Pathology* 21 (S2): S37–43. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.10>.

- Nikiforov, Yuri E. 2011. "Molecular Diagnostics of Thyroid Tumors." *Arch Pathol Lab Med* 135: 9.
- Nikiforov, Yuri E., and Marina N. Nikiforova. 2011. "Molecular Genetics and Diagnosis of Thyroid Cancer." *Nature Reviews Endocrinology* 7 (10): 569–80. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.142>.
- Niu, Huanjiang, Kun Wang, Anling Zhang, Shuxu Yang, Zhengfei Song, Wei Wang, Cong Qian, Xinwei Li, Yinxin Zhu, and Yirong Wang. 2012. "MiR-92a Is a Critical Regulator of the Apoptosis Pathway in Glioblastoma with Inverse Expression of BCL2L1." *Oncology Reports* 28 (5): 1771–77. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1970>.
- Noone, AM, N Howlader, M Krapcho, D Miller, A Brest, M Yu, and J Ruhl. 2018. "EER Cancer Statistics Review, 1975-2015." Bethesda: National Cancer Institute. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015.
- Nordstrom-O'Brien, Morgan, Rob B. van der Luijt, Ellen van Rooijen, Ans M. van den Ouweland, Danielle F. Majoor-Krakauer, Martijn P. Lolkema, Aram van Brussel, Emile E. Voest, and Rachel H. Giles. 2010. "Genetic Analysis of von Hippel-Lindau Disease." *Human Mutation*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/humu.21219>.
- Noureldine, Salem I., and Ralph P. Tufano. 2015. "Association of Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer." *Current Opinion in Oncology* 27 (1): 21–25. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000150>.
- Ohh, M., C. W. Park, M. Ivan, M. A. Hoffman, T. Y. Kim, L. E. Huang, N. Pavletich, V. Chau, and W. G. Kaelin. 2000. "Ubiquitination of Hypoxia-Inducible Factor Requires Direct Binding to the Beta-Domain of the von Hippel-Lindau Protein." *Nature Cell Biology* 2 (7): 423–27. <https://doi.org/10.1038/35017054>.
- Ohh, M., R. L. Yauch, K. M. Lonergan, J. M. Whaley, A. O. Stemmer-Rachamimov, D. N. Louis, B. J. Gavin, N. Kley, W. G. Kaelin, and O. Iliopoulos. 1998. "The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Is Required for Proper Assembly of an Extracellular Fibronectin Matrix." *Molecular Cell* 1 (7): 959–68.
- Ohyagi-Hara, Chifumi, Kenjiro Sawada, Shoji Kamiura, Yasuhiko Tomita, Aki Isobe, Kae Hashimoto, Yasuto Kinose, et al. 2013. "MiR-92a Inhibits Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells by Inhibiting Integrin A5 Expression." *The American Journal of Pathology* 182 (5): 1876–89. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.039>.
- Okuda, H., S. Hirai, Y. Takaki, M. Kamada, M. Baba, N. Sakai, T. Kishida, et al. 1999. "Direct Interaction of the Beta-Domain of VHL Tumor Suppressor Protein with the Regulatory Domain of Atypical PKC Isoforms." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263 (2): 491–97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1347>.

- Omur, Ozgur, and Yusuf Baran. 2014. "An Update on Molecular Biology of Thyroid Cancers." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 90 (3): 233–52. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.007>.
- Ortiz, J. M. Rodríguez, P., S. 2001. "Recurrent Papillary Thyroid Cancer: Analysis of Prognostic Factors Including the Histological Variant." *The European Journal of Surgery* 167 (6): 406–12. <https://doi.org/10.1080/110241501750243734>.
- Ozdemir, Didem, Reyhan Ersoy, Neslihan Cuhaci, Dilek Arpaci, Eren P. Ersoy, Birol Korukluoglu, Gulnur Guler, and Bekir Cakir. 2011. "Classical and Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma: Comparison of Clinical, Ultrasonographical, Cytological, and Histopathological Features in 444 Patients." *Endocrine Pathology* 22 (2): 58–65. <https://doi.org/10.1007/s12022-011-9160-0>.
- Ozdemir, Filiz, Julide Altinisik, Ates Karateke, Hakan Coksuer, and Nur Buyru. 2012. "Methylation of Tumor Suppressor Genes in Ovarian Cancer." *Experimental and Therapeutic Medicine* 4 (6): 1092–96. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.715>.
- Pacini, F., M. G. Castagna, L. Brilli, G. Pentheroudakis, and on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. 2012. "Thyroid Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 23 (suppl 7): vii110–19. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds230>.
- Pacini, Furio, Martin Schlumberger, Henning Dralle, Rossella Elisei, Johannes W A Smit, Wilmar Wiersinga, and __. 2006. "European Consensus for the Management of Patients with Differentiated Thyroid Carcinoma of the Follicular Epithelium." *European Journal of Endocrinology* 154 (6): 787–803. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02158>.
- Pal, Soumitro, Kevin P. Claffey, Harold F. Dvorak, and Debabrata Mukhopadhyay. 1997. "The von Hippel-Lindau Gene Product Inhibits Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Renal Cell Carcinoma by Blocking Protein Kinase C Pathways." *Journal of Biological Chemistry* 272 (44): 27509–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27509>.
- Papp, Sylvia, and Sylvia L. Asa. 2015. "When Thyroid Carcinoma Goes Bad: A Morphological and Molecular Analysis." *Head and Neck Pathology* 9 (1): 16–23. <https://doi.org/10.1007/s12105-015-0619-z>.
- Passler, C. 2004. "Prognostic Factors of Papillary and Follicular Thyroid Cancer: Differences in an Iodine-Replete Endemic Goiter Region." *Endocrine Related Cancer* 11 (1): 131–39. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0110131>.
- Pazaitou-Panayiotou, K., K. Michalakis, and R. Paschke. 2012. "Thyroid Cancer in Patients with Hyperthyroidism." *Hormone and Metabolic Research* 44 (04): 255–62. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299741>.
- Pellegriti, Gabriella, Francesco Frasca, Concetto Regalbuto, Sebastiano Squatrito, and Riccardo Vigneri. 2013. "Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer:

- Update on Epidemiology and Risk Factors.” *Journal of Cancer Epidemiology* 2013: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/965212>.
- Pfaffl, M. W. 2001. “A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR.” *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45.
- Podnos, Yale D., David Smith, Lawrence D. Wagman, and Joshua D. I. Ellenhorn. 2005. “The Implication of Lymph Node Metastasis on Survival in Patients with Well-Differentiated Thyroid Cancer.” *The American Surgeon* 71 (9): 731–34.
- Popoveniuc, Geanina, and Jacqueline Jonklaas. 2012. “Thyroid Nodules.” *Medical Clinics of North America* 96 (2): 329–49. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2012.02.002>.
- Qasem, Ebtesam, Avaniyapuram Kannan Murugan, Hindi Al-Hindi, Mingzhao Xing, Mai Almohanna, Meshael Alswailem, and Ali S Alzahrani. 2015. “TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer: A Report from a Middle Eastern Population.” *Endocrine-Related Cancer* 22 (6): 901–8. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0396>.
- Qu, Ning, Ling Zhang, Qing-hai Ji, Yong-xue Zhu, Zhuo-ying Wang, Qiang Shen, Yu Wang, and Duan-shu Li. 2014. “Number of Tumor Foci Predicts Prognosis in Papillary Thyroid Cancer.” *BMC Cancer* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-914>.
- Rahbari, Reza, Lisa Zhang, and Electron Kebebew. 2010. “Thyroid Cancer Gender Disparity.” *Future Oncology* 6 (11): 1771–79. <https://doi.org/10.2217/fon.10.127>.
- Rahib, L., B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, and L. M. Matrisian. 2014. “Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States.” *Cancer Research* 74 (11): 2913–21. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>.
- Ren, Chuanli, Wenshu Wang, Chongxu Han, Hui Chen, Deyuan Fu, Yulin Luo, Hanyu Yao, et al. 2016. “Expression and Prognostic Value of MiR-92a in Patients with Gastric Cancer.” *Tumor Biology* 37 (7): 9483–91. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4865-9>.
- Richards, F. M., M.E. Phipps, F. Latif, M. Yao, P.A. Crossey, K. Foster, W. M. Linehan, et al. 1993. “Mapping the von Hippel-Lindau Disease Tumour Suppressor Gene: Identification of Germline Deletions by Pulsed Field Gel Electrophoresis.” *Human Molecular Genetics*, no. 2: 879–82.
- Robinson, Andrew G., Christopher M. Booth, and Elizabeth A. Eisenhauer. 2014. “Disease-Free Survival as an End-Point in the Treatment of Solid Tumours – Perspectives from Clinical Trials and Clinical Practice.” *European Journal of Cancer* 50 (13): 2298–2302. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.05.016>.

- Rodrigues-Serpa, Ana, Ana Catarino, and Jorge Soares. 2003. "Loss of Heterozygosity in Follicular and Papillary Thyroid Carcinomas." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 141 (1): 26–31.
- Roe, Jae-Seok, and Hong-Duk Youn. 2006. "The Positive Regulation of P53 by the Tumor Suppressor VHL." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (18): 2054–56. <https://doi.org/10.4161/cc.5.18.3247>.
- Romagosa, C, S Simonetti, L López-Vicente, A Mazo, M E Lleonart, J Castellvi, and S Ramon y Cajal. 2011. "P16Ink4a Overexpression in Cancer: A Tumor Suppressor Gene Associated with Senescence and High-Grade Tumors." *Oncogene* 30 (18): 2087–97. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.614>.
- Ron, Elaine. 2007. "Thyroid Cancer Incidence among People Living in Areas Contaminated by Radiation from the Chernobyl Accident." *Health Physics* 93 (5): 502–11. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000279018.93081.29>.
- Sak, Serpil Dizbay. 2015. "Variants of Papillary Thyroid Carcinoma: Multiple Faces of a Familiar Tumor." *Turkish Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.5146/tjpath.2015.01313>.
- Sanderson, T., G. Wild, AM. Cull, J. Marston, and G. Zardin. 2019. "Immunohistochemical and Immunofluorescent Techniques." In *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques.*, edited by SK. Suvarna, C. Layton, and JD. Bancroft, 8th., 337–94. Elsevier Inc.
- Schmitt, A M, S Schmid, T Rudolph, M Anlauf, C Prinz, G Klöppel, H Moch, P U Heitz, P Komminoth, and A Perren. 2009. "VHL Inactivation Is an Important Pathway for the Development of Malignant Sporadic Pancreatic Endocrine Tumors." *Endocrine-Related Cancer* 16 (4): 1219–27. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0297>.
- Schoenfeld, A., E. J. Davidowitz, and R. D. Burk. 1998. "A Second Major Native von Hippel-Lindau Gene Product, Initiated from an Internal Translation Start Site, Functions as a Tumor Suppressor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15): 8817–22.
- Seizinger, B. R., G. A. Rouleau, L. J. Ozelius, A. H. Lane, G. E. Farmer, J. M. Lamiell, J. Haines, et al. 1988. "Von Hippel-Lindau Disease Maps to the Region of Chromosome 3 Associated with Renal Cell Carcinoma." *Nature* 332 (6161): 268–69. <https://doi.org/10.1038/332268a0>.
- Semenza, Gregg L. 2006. "VHL and P53: Tumor Suppressors Team Up to Prevent Cancer." *Molecular Cell* 22 (4): 437–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.001>.
- Shaha, A. R., T. R. Loree, and J. P. Shah. 1995. "Prognostic Factors and Risk Group Analysis in Follicular Carcinoma of the Thyroid." *Surgery* 118 (6): 1131–36; discussion 1136-1138.

- Shattuck, Trisha M., William H. Westra, Paul W. Ladenson, and Andrew Arnold. 2005. "Independent Clonal Origins of Distinct Tumor Foci in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma." *New England Journal of Medicine* 352 (23): 2406–12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044190>.
- Shi, Xiaoguang, Rengyun Liu, Fulvio Basolo, Riccardo Giannini, Xiaopei Shen, Di Teng, Haixia Guan, et al. 2016. "Differential Clinicopathological Risk and Prognosis of Major Papillary Thyroid Cancer Variants." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101 (1): 264–74. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2917>.
- Shigoka, Masatoshi, Akihiko Tsuchida, Takaaki Matsudo, Yuichi Nagakawa, Hitoshi Saito, Yoshiaki Suzuki, Tatsuya Aoki, et al. 2010. "Deregulation of MiR-92a Expression Is Implicated in Hepatocellular Carcinoma Development: MiR-92a in Hepatocellular Carcinogenesis." *Pathology International* 60 (5): 351–57. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02526.x>.
- Siironen, Pälvi, Johanna Louhimo, Stig Nordling, Ari Ristimälki, Hanna Maenpaa;, Reijo Haapiainen, and Caj Haglund. 2005. "Prognostic Factors in Papillary Thyroid Cancer: An Evaluation of 601 Consecutive Patients." *Tumor Biology* 26 (2): 57–64. <https://doi.org/10.1159/000085586>.
- Sipos, J.A., and E.L. Mazzaferri. 2010. "Thyroid Cancer Epidemiology and Prognostic Variables." *Clinical Oncology* 22 (6): 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2010.05.004>.
- Slijepcevic, N, V Zivaljevic, I Paunovic, A Diklic, S Zivokovic-Perisic, D Miljus, A Grgurevic, and S Sipetic. 2016. "Rising Incidence of Thyroid Cancer in Serbia." *HIPPOKRATIA* 20 (1): 9–13.
- Smith, Laura, Euan W. Baxter, Philip A. Chambers, Caroline A. Green, Andrew M. Hanby, Thomas A. Hughes, Claire E. Nash, et al. 2015. "Down-Regulation of MiR-92 in Breast Epithelial Cells and in Normal but Not Tumour Fibroblasts Contributes to Breast Carcinogenesis." Edited by Abdelilah Aboussekhra. *PLOS ONE* 10 (10): e0139698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139698>.
- Soares, Paula, Vitor Trovisco, Ana Sofia Rocha, Jorge Lima, Patrícia Castro, Ana Preto, Valdemar Máximo, Tiago Botelho, Raquel Seruca, and Manuel Sobrinho-Simões. 2003. "BRAF Mutations and RET/PTC Rearrangements Are Alternative Events in the Etiopathogenesis of PTC." *Oncogene* 22 (29): 4578–80. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206706>.
- Sobin, L H, M K Gospodarowicz, and Ch Wittekind. 2010. *UICC: TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. Blackwell Publishing Ltd.
- Sourvinos, George, Spiros Miyakis, Triantafyllos L. Liloglou, John K. Field, and Demetrios A. Spandidos. 2001. "Von Hippel-Lindau Tumour Suppressor Gene Is Not Involved in Sporadic Human Breast Cancer." *Tumor Biology* 22 (3): 131–36. <https://doi.org/10.1159/000050607>.

- Stanojevic, Boban, Radan Dzodic, Vladimir Saenko, Zorka Milovanovic, Gordana Pupic, Ognjen Zivkovic, Ivan Markovic, et al. 2011. "Mutational and Clinico-Pathological Analysis of Papillary Thyroid Carcinoma in Serbia." *Endocrine Journal* 58 (5): 381–93. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K11E-054>.
- Stathatos, N. 2016. "Anatomy and Physiology of the Thyroid Gland." In *Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management*, edited by L Wartofsky and Douglas Van Nostrand, 3rd ed., 3–7. Totowa, NJ: Humana Press.
- Stewart, Bernard W, and Christopher P Wild. 2014. *World Cancer Report 2014*. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization.
- Tabaro, Francesco, Giovanni Minervini, Faiza Sundus, Federica Quaglia, Emanuela Leonardi, Damiano Piovesan, and Silvio C. E. Tosatto. 2016. "VHLdb: A Database of von Hippel-Lindau Protein Interactors and Mutations." *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep31128>.
- Takakura, Shu, Norisato Mitsutake, Masahiro Nakashima, Hiroyuki Namba, Vladimir A. Saenko, Tatiana I. Rogounovitch, Yuka Nakazawa, Tomayoshi Hayashi, Akira Ohtsuru, and Shunichi Yamashita. 2008. "Oncogenic Role of MiR-17-92 Cluster in Anaplastic Thyroid Cancer Cells." *Cancer Science* 99 (6): 1147–54. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00800.x>.
- Tan, Weiqi. 2014. "MiR-106b-25/MiR-17-92 Clusters: Polycistrons with Oncogenic Roles in Hepatocellular Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology* 20 (20): 5962. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i20.5962>.
- Tanimoto, K., Y. Makino, T. Pereira, and L. Poellinger. 2000. "Mechanism of Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein." *The EMBO Journal* 19 (16): 4298–4309. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4298>.
- Tétreault, N., and V. De Guire. 2013. "MiRNAs: Their Discovery, Biogenesis and Mechanism of Action." *Clinical Biochemistry* 46 (10–11): 842–45. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.02.009>.
- "The Human Protein Atlas, funded by Knut & Alice Wallenberg foundation, Upsala University, KarolinskaInstitut, Sweden. 2018. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134086-VHL/tissue>
- "Thyroid Cancer Statistics, Cancer Research UK." 2018. Cancer Research UK. 2018. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/thyroid-cancer/incidence>.
- Tili, Esmerina, Jean-Jacques Michaille, Chang-Gong Liu, Hansjuerg Alder, Cristian Taccioli, Stefano Volinia, George A. Calin, and Carlo M. Croce. 2010. "GAM/ZFp/ZNF512B Is Central to a Gene Sensor Circuitry Involving Cell-Cycle Regulators, TGFβ Effectors, Drosha and MicroRNAs with Opposite Oncogenic Potentials." *Nucleic Acids Research* 38 (21): 7673–88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq637>.

- Tsuchida, Akihiko, Shinichiro Ohno, Weihong Wu, Nariso Borjigin, Koji Fujita, Tastuya Aoki, Shinobu Ueda, Masakatsu Takanashi, and Masahiko Kuroda. 2011. "MiR-92 Is a Key Oncogenic Component of the MiR-17-92 Cluster in Colon Cancer." *Cancer Science* 102 (12): 2264–71. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02081.x>.
- Tuttle, R Michael, Douglas W Ball, David Byrd, Raza A Dilawari, Gerard M Doherty, Quan-Yang Duh, Hormoz Ehya, et al. 2010. "Thyroid Carcinoma." *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 8 (11): 47.
- Valera, Vladimir A, Beatriz A Walter, W Marston Linehan, and Maria J Merino. 2011. "Regulatory Effects of MicroRNA-92 (MiR-92) on VHL Gene Expression and the Hypoxic Activation of MiR-210 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma." *Journal of Cancer*, 12.
- Vasen, H. F., and A. Vermey. 1995. "Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma." *Cancer Detection and Prevention* 19 (2): 143–50.
- Ventura, Andrea, Amanda G. Young, Monte M. Winslow, Laura Lintault, Alex Meissner, Stefan J. Erkeland, Jamie Newman, et al. 2008. "Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the MiR-17~92 Family of MiRNA Clusters." *Cell* 132 (5): 875–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.019>.
- Vigneri, Riccardo, Pasqualino Malandrino, and Paolo Vigneri. 2015. "The Changing Epidemiology of Thyroid Cancer: Why Is Incidence Increasing?" *Current Opinion in Oncology* 27 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000148>.
- Volante, Marco, Paola Collini, Atsuhiko Sakamoto, Ricardo V Lloyd, Virginia A LiVolsi, Mauro Papotti, Manuel Sobrinho-Simoes, and Gianni Bussolati. 2007. "Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: The Turin Proposal for the Use of Uniform Diagnostic Criteria and an Algorithmic Diagnostic Approach." *Am J Surg Pathol* 31 (8): 9.
- Volinia, Stefano, George A. Calin, Chang-Gong Liu, Stefan Ambs, Amelia Cimmino, Fabio Petrocca, Rosa Visone, et al. 2006. "A MicroRNA Expression Signature of Human Solid Tumors Defines Cancer Gene Targets." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (7): 2257–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>.
- Wajjwalku, Worawidh, Shigeo Nakamura, Yasuhisa Hasegawa, Koichi Miyazaki, Yasuyuki Satoh, Hiroomi Funahashi, Mutsushi Matsuyama, and Masahide Takahashi. 1992. "Low Frequency of Rearrangements of the *Ret* and *Trk* Proto-Oncogenes in Japanese Thyroid Papillary Carcinomas." *Japanese Journal of Cancer Research* 83 (7): 671–75. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1992.tb01963.x>.

- Wang, Fei, Xiaolong Yu, Xiaopei Shen, Guangwu Zhu, Yueye Huang, Rengyun Liu, David Viola, et al. 2017. "The Prognostic Value of Tumor Multifocality in Clinical Outcomes of Papillary Thyroid Cancer." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102 (9): 3241–50. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00277>.
- Wang, Haifeng, Changxing Ke, Xingyong Ma, Qinghua Zhao, Mingying Yang, Wei Zhang, and Jiansong Wang. 2016. "MicroRNA-92 Promotes Invasion and Chemoresistance by Targeting GSK3 β and Activating Wnt Signaling in Bladder Cancer Cells." *Tumor Biology* 37 (12): 16295–304. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5460-9>.
- Wang, Ping, Long Lv, Feng Qi, and Feng Qiu. 2015. "Increased Risk of Papillary Thyroid Cancer Related to Hormonal Factors in Women." *Tumor Biology* 36 (7): 5127–32. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3165-0>.
- Welker, Mary Jo, and Diane Orlov. 2003. "Thyroid Nodules." *American Family Physician* 67 (3): 559–66.
- Williams, D. 2008. "Radiation Carcinogenesis: Lessons from Chernobyl." *Oncogene* 27 (S2): S9–18. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.349>.
- Woodward, Emma R., Alexander Buchberger, Steven C. Clifford, Laurence D. Hurst, Nabeel A. Affara, and Eamonn R. Maher. 2000. "Comparative Sequence Analysis of the VHL Tumor Suppressor Gene." *Genomics* 65 (3): 253–65. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6144>.
- Xing, Mingzhao. 2007. "Gene Methylation in Thyroid Tumorigenesis." *Endocrinology* 148 (3): 948–53. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0927>.
- Xing, Mingzhao. 2013. "Molecular Pathogenesis and Mechanisms of Thyroid Cancer." *Nature Reviews Cancer* 13 (3): 184–99. <https://doi.org/10.1038/nrc3431>.
- Yamashita, S., N. Takamura, A. Ohtsuru, and S. Suzuki. 2016. "Radiation Exposure and Thyroid Cancer Risk After the Fukushima Nuclear Power Plant Accident in Comparison with the Chernobyl Accident." *Radiation Protection Dosimetry* 171 (1): 41–46. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncw189>.
- Yang, Lei, Ziyi Zhao, Shasha Zhao, Chen Chen, Xiaofeng Cong, Zhi Li, and Meng Ren. 2016. "The Clinicopathological Significance of Epigenetic Silencing of VHL Promoter and Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis." *Cellular Physiology and Biochemistry* 40 (6): 1465–72. <https://doi.org/10.1159/000453198>.
- Yu, Yu, Yao Zhang, and Shulan Zhang. 2013. "MicroRNA-92 Regulates Cervical Tumorigenesis and Its Expression Is Upregulated by Human Papillomavirus-16 E6 in Cervical Cancer Cells." *Oncology Letters* 6 (2): 468–74. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1404>.
- Yuen, John S.P. 2009. "Molecular Targeted Therapy in Advanced Renal Cell Carcinoma: A Review of Its Recent Past and a Glimpse into the near Future."

Indian Journal of Urology 25 (4): 427. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.57899>.

- Zamora-Ros, Raul, Sabina Rinaldi, Carine Biessy, Anne Tjønneland, Jytte Halkjaer, Agnes Fournier, Marie-Christine Boutron-Ruault, et al. 2015. "Reproductive and Menstrual Factors and Risk of Differentiated Thyroid Carcinoma: The EPIC Study." *International Journal of Cancer* 136 (5): 1218–27. <https://doi.org/10.1002/ijc.29067>.
- Zaydfudim, Victor, Irene D. Feurer, Marie R. Griffin, and John E. Phay. 2008. "The Impact of Lymph Node Involvement on Survival in Patients with Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma." *Surgery* 144 (6): 1070–78. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.08.034>.
- Zhang, Lin, Jia Huang, Nuo Yang, Joel Greshock, Molly S. Megraw, Antonis Giannakakis, Shun Liang, et al. 2006. "MicroRNAs Exhibit High Frequency Genomic Alterations in Human Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (24): 9136–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508889103>.
- Zhang, Shu, Xuan Zhou, Bo Wang, Kailiang Zhang, Su Liu, Kai Yue, Lun Zhang, and Xudong Wang. 2014. "Loss of VHL Expression Contributes to Epithelial–Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Oral Oncology* 50 (9): 809–17. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.06.007>.
- Zhao, Bin, Yueting Zhu, Kai Cui, Jie Gao, Fachang Yu, Liang Chen, and Sheng Li. 2013. "Expression and Significance of PTEN and MiR-92 in Hepatocellular Carcinoma." *Molecular Medicine Reports* 7 (5): 1413–16. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1406>.
- Zhou, Mina I., Hongmei Wang, Jonathan J. Ross, Igor Kuzmin, Chengen Xu, and Herbert T. Cohen. 2002. "The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Stabilizes Novel Plant Homeodomain Protein Jade-1." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (42): 39887–98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205040200>.
- Zia, Mohammad K., Khaled A. Rmali, Gareth Watkins, Robert E. Mansel, and Wen G. Jiang. 2007. "The Expression of the von Hippel-Lindau Gene Product and Its Impact on Invasiveness of Human Breast Cancer Cells." *International Journal of Molecular Medicine* 20 (4): 605–11. <https://doi.org/10.3892/ijmm.20.4.605>.

STRUČNA BIOGRAFIJA

Lidija Todorović je rođena 12. decembra 1978. godine u Požarevcu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Svilajncu. Diplomirala je 03. aprila 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) sa prosečnom ocenom 9,11 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad pod naslovom „Ispitivanje uticaja ugljenohidratnih struktura antigena parazitske nematode *Trichinella spiralis* na interakciju sa makrofagama“ uradila je u Laboratoriji za imunologiju i imunoparazitologiju Instituta za primenu nuklearne energije „INEP“, pod rukovodstvom mentora dr Alise Gruden Movsesijan.

Školske 2011/2012. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od 01.06.2012. godine zaposlena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2013. a reizabrana 2015. godine. Trenutno je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“ (br. projekta 173049).

Do sada je publikovala jedan rad u međunarodnom časopisu kategorije M22, a koautor je još tri rada u međunarodnim časopisima kategorije M22 i jednog rada u međunarodnom časopisu kategorije M21. Autor je ili koautor devet saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Лидија Б. Тодоровић _____

број индекса _____ Б3017/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Експресија и варијанте гена за туморски супресор *VHL* у папиларним
карциномима штитасте жлезде

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.11.2018

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Лидија Б. Тодоровић

Број индекса Б3017/2011

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Експресија и варијанте гена за туморски супресор VHL у папиларним карциномима штитасте жлезде

Ментор: др Бобан Станојевић, виши научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“
др Горан Брајушковић, редовни професор Биолошког факултета, Универзитета у Београду

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.11.2018

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Експресија и варијанте гена за туморски супресор *VHL* у папиларним

карциномима штитасте жлезде

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 28.11.2018.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.