



**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ ВМА  
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ У БЕОГРАДУ  
МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ РЕПУБЛИКЕ СРБИЈЕ**

**др Јелена Карајовић**

**ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА У ГЕНИМА ЗА НЕКОДИРАЈУЋЕ РНК СА  
КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА И РИЗИКОМ ЗА НАСТАНАК  
ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ**

**Докторска дисертација**

**Београд, 2024. године**



**MEDICAL FACULTY OF MILITARY MEDICAL  
ACADEMY**



**UNIVERSITY OF DEFENSE IN BELGRADE  
MINISTRY OF DEFENSE OF THE REPUBLIC OF SERBIA**

**Dr. Jelena Karajović**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN NON-CODING RNA GENES WITH  
CLINICO-PATHOLOGICAL PARAMETERS AND THE RISK OF PAPILLARY  
THYROID CARCINOMA**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2024**

**Име и презиме:** др Јелена Карајовић

**Наслов: ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА У ГЕНИМА ЗА НЕКОДИРАЈУЋЕ РНК СА КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА И РИЗИКОМ ЗА НАСТАНАК ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ**

**Установа где је рад израђен:** Војномедицинска академија, Београд

**Ментор, титула, име и презиме, звање, афилијација, ужа научна област:**

проф. др Гордана Шупић, редовни професор Медицинског факултета ВМА, генетика и епигенетика

**Комисија за оцену теме и тезе:**

1. доц. др Немања Ранчић, председник комисије, доцент МФ ВМА УО, уже научне области Радиологија и Фармакологија,
2. проф. Ружица Козомара, МФ ВМА УО, ужа научна област Максилофацијална хирургија,
3. доц. др Мирјана Стојковић, Медицински факултет Универзитета у Београду, ужа научна област Ендокринологија.
4. доц. др Божидар Ковачевић, доцент МФ ВМА УО, ужа научна област Патологија,
5. доц. др Петар Ристић, доцент МФ ВМА УО, ужа научна област Ендокринологија,

**Комисија за оцену готове докторске дисертације:**

1. доц. др Немања Ранчић, председник комисије, доцент МФ ВМА, уже научне области Радиологија и Фармакологија,
2. доц. др Божидар Ковачевић, доцент МФ ВМА, ужа научна област Патологија,
3. проф. др Ружица Козомара, МФ ВМА, ужа научна област Максилофацијална хирургија,
4. доц. др Петар Ристић, доцент МФ ВМА, ужа научна област Ендокринологија
5. доц др Мирјана Стојковић, Медицински факултет Универзитета у Београду, ужа научна област Ендокринологија.

## ИЗВОД

Полиморфизми у генима за дуге некодирајуће РНК и микро РНК могу играти значајну улогу у предиспозицији појаве папиларног карцинома штитасте жлезде (*PTC*) и прогресији овог тумора. У овој студији истраживали смо полиморфизме HOTAIR rs920778, MIR155HG rs1893650, TERC rs10936599, miR-155 rs767649, miR-196a2 rs11614913 и miR-146a rs2910164 користећи методологију PCR у реалном времену, код 102 пацијента и 106 особа контролне групе одговарајуће полне и старосне дистрибуције. Сви испитаници су били кавказоиди популације Србије. Уочене су разлике у дистрибуцији генотипова HOTAIR rs920778 ( $p = 0,016$ ) и MIR155HG rs1893650 ( $p = 0,0002$ ) полиморфизама између *PTC* болесника и контролне групе. Анализа односа ризика (OR) прилагођеног за пол и године је показала да је HOTAIR rs920778 повезан са повећаним ризиком за појаву *PTC* (OR = 1,497,  $p = 0,021$ ), при чему је ТТ варијантни генотип повећавао ризик у поређењу са изворним СС генотипом (OR = 2,466,  $p = 0,012$ ) и носиоцима С-алела (СС+СТ), (OR = 1,585,  $p = 0,006$ ). Генотип HOTAIR rs920778 ТТ био је повезан са појавом метастаза у лимфним чворовима ( $p = 0,022$ ), рецидивом тумора ( $p = 0,016$ ) и преживљавањем без прогресије болести ( $p = 0,010$ ) у поређењу са носиоцима С-алела. Мултиваријантна Коксова регресија је показала да су се АТА ризик (HR = 14,210,  $p = 0,000004$ ) и HOTAIR rs920778 (HR = 2,811,  $p = 0,010$ ) издвојили као независни прогностички фактори за *PTC*. Полиморфизам MIR155HG rs1893650, који је по први пут истраживан код *PTC*, био је у негативној корелацији са предиспозицијом појаве *PTC*, при чему су ТС хетерозиготи испољили протективни ефекат (OR = 0,268,  $p = 0,0001$ ). Наши резултати сугеришу да би полиморфизми HOTAIR rs920778 и MIR155HG rs1893650 потенцијално могли да буду прогностички и биомаркери ризика код папиларних карцинома штитасте жлезде.

**Кључне речи:** Папиларни карцином штитасте жлезде, некодирајуће РНК, полиморфизми, прогноза, ризик.

# ABSTRACT

Long noncoding RNAs and microRNAs play essential roles in cancers, including papillary thyroid carcinoma (PTC). Polymorphisms in their genes may play a significant role in the disease susceptibility and progression of PTC.

The aim of the current study is to investigate the polymorphisms HOTAIR rs920778, MIR155HG rs1893650, TERC rs10936599, miR-155 rs767649, miR-196a2 rs11614913 and miR-146a rs2910164 in 102 PTC patients undergoing total thyroidectomy and 106 age- and sex-matched controls of the Caucasian-Serbian population, using real-time PCR technology.

We observed significant differences in the genotype distribution of the HOTAIR rs920778 ( $p=0.016$ ) and MIR155HG rs1893650 ( $p=0.0002$ ) polymorphisms between PTC patients and controls. HOTAIR rs920778 was associated with increased PTC susceptibility (adjusted OR=1.497,  $p=0.021$ ), with the TT variant genotype increasing the risk compared to the CC genotype (OR=2.466,  $p=0.012$ ) and to C-allele carriers (CC+CT) (OR=1.585,  $p=0.006$ ). The HOTAIR rs920778 TT genotype was associated with lymph node metastasis ( $p=0.022$ ), tumor recurrence ( $p=0.016$ ), and progression-free survival ( $p=0.010$ ), compared to C-allele carriers. Multivariate Cox regression revealed that ATA risk (HR=14.210,  $p=0.000004$ ) and HOTAIR rs920778 (HR=2.811,  $p=0.010$ ) emerged as independent prognostic factors in PTC. A novel polymorphism MIR155HG rs1893650 was negatively correlated with susceptibility to PTC, with TC heterozygotes exerting a protective effect (OR=0.268,  $p=0.0001$ ).

Polymorphisms HOTAIR rs920778 and MIR155HG rs1893650 may serve as a potential prognostic and/or risk biomarkers in papillary thyroid carcinomas.

**Keywords:** Papillary thyroid carcinoma, noncoding RNAs, polymorphisms, prognosis, risk

# САДРЖАЈ

<b>ИЗВОД</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>УВОД</b> .....	7
Карциноми штитасте жлезде - дефиниција и подела.....	7
Папиларни карцином штитасте жлезде.....	10
Епидемиологија папиларног карцинома штитасте жлезде.....	10
Етиологија карцинома штитасте жлезде.....	10
Клиничко испољавање, дијагноза и лечење <i>PTC</i> .....	12
Патохистолошке карактеристике <i>PTC</i> .....	17
Молекуларна основа <i>PTC</i> .....	20
ЕПИГЕНЕТИЧКЕ МОДИФИКАЦИЈЕ <i>PTC</i> .....	23
<b>ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	33
<b>ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	34
<b>МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	35
Врста студије.....	35
Етички аспект судије.....	35
Селекција болесника.....	35
Патохистолошка анализа, патолошка евалуација и стадијум тумора.....	36
Изолација ДНК и провера квалитета, концентрације и чистоће изоловане ДНК.....	36
Генотипизација полиморфизама нуклеотидне секвенце Real-time PCR технологијом....	37
Статистичка обрада података и биоинформатика.....	41
Снага студије.....	42
<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	44
<b>ДИСКУСИЈА</b> .....	56
<b>ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	65
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	66

# УВОД

## Карциноми штитасте жлезде - дефиниција и подела

Карциноми штитасте жлезде (ШЖ) су најчешћи малигни тумори ендокриних жлезда. Ови тумори чине 2,5% свих малигнитета и око 4% новодијагностикованих карцинома код жена (1).

У односу на клиничко понашање, порекло и морфологију карциноми ШЖ представљају хетерогену групу тумора. Према пореклу, карциноми ШЖ се деле на карциноме који потичу из тироцита и показују фоликуларну диференцијацију и карциноме порекла неуроендокриних, парафоликуларних „С“ ћелија (енгл. *Parafollicular cells, C-cells*).

Према петом издању класификације тумора ШЖ Светске здравствене организације (СЗО) из 2022. године, тумори порекла фоликуларних ћелија деле се на основу морфологије, молекуларне основе и степена диференцијације на: 1. туморе ниског степена малигнитета (ниског ризика), 2. добро диферентоване карциноме, 3. карциноме порекла фоликуларних ћелија високог градуса и 4. анапластичне карциноме. Детаљни приказ класификације тумора ШЖ порекла фоликуларних ћелија приказан је у Табели 1.

**Табела 1.** Класификација тумора штитасте жлезде порекла фоликуларних ћелија

<b>БЕНИГНИ ТУМОРИ</b>
Фоликуларна нодуларна болест
Фоликуларни аденом
Фоликуларни аденом са папиларном архитектоницом
Онкоцитни аденом
<b>ФОЛИКУЛАРНЕ НЕОПЛАЗМЕ НИСКОГ РИЗИКА</b>
Неинвазивна фоликуларна неоплазма са нуклерним карактеристикама папиларног карцинома (енгл. <i>Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features, NIFTP</i> )
Добро диферентовани тумор нејасног малигног потенцијала (енгл. <i>Well-differentiated Tumor of Uncertain Malignant Potential, WDT-UMP</i> )
Хијалинизирајући трабекуларни тумор
<b>ДОБРО ДИФЕРЕНТОВАНИ КАРЦИНОМИ</b>
Папиларни карцином (енгл. <i>Papillary Thyroid Carcinoma, PTC</i> )
Инвазивна инкапсулирана фоликуларна варијанта папиларног карцинома (енгл. <i>Invasive Encapsulated Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma, IEFV-PTC</i> )
Фоликуларни карцином (енгл. <i>Follicular Thyroid Carcinoma, FTC</i> )
Онкоцитни карциноми (енгл. <i>Oncocyte Thyroid Carcinoma, OTC</i> ).
<b>КАРЦИНОМИ ПОРЕКЛА ФОЛИКУЛАРНИХ ЋЕЛИЈА ВИСОКОГ ГРАДУСА</b>
Слабо диферентовани карцином (енгл. <i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma, PDTC</i> )
Диферентован карцином штитасте жлезде високог градуса (енгл. <i>Differentiated High-grade Thyroid Carcinoma, DHTC</i> )
<b>АНАПЛАСТИЧНИ КАРЦИНОМ</b>

Преузето и прилагођено из Basolo F, et al. 2023.



Основу пете класификације тумора ШЖ поред морфологије чине и познате генетичке измене као основа неопластичне трансформације тироцита. На основу морфологије и генетичких промена сви тумори ШЖ порекла фоликуларних ћелија деле се на три групе (2,3).

Прву групу тумора чине карциноми инвазивног раста са папиларном морфологијом и најчешћом мутацијом у гену <sup>V600E</sup> BRAF. Поред тумора са мутацијом <sup>V600E</sup> BRAF у овој групи спадају и тумори са генетичким реаранжманима који укључују гене BRAF, RET и NTRK . Због карактеристичне морфологије и најчешће присутне мутације <sup>V600E</sup> BRAF цела група тумора назива се BRAF-like тумори. Најзначајнији представник ове групе тумора је *PTC*.

У генетичкој основи друге групе тумора најчешће постоје мутације у једној од три изоформе гена RAS (NRAS, HRAS, KRAS) или, ређе тачкасте мутације у генима EIF1AX, EZH1, DICER1, PTEN и <sup>K601E</sup> BRAF . Ова група тумора се означава као RAS-like тумори. Морфолошки ови тумори су фоликуларне грађе. RAS-like тумори су најчешће јасно ограничени и инкапсулирани. У RAS-like туморе без инвазивног раста спадају фоликуларни аденом и неинвазивна фоликуларна неоплазма са нуклераним карактеристикама папиларног карцинома (енгл. *Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features*, NIFTP). У туморе са инвазивним растом спадају инвазивна инкапсулирана фоликуларна варијанта папиларног карцинома и фоликуларни карцином (2,3).

Трећа туморска група се означава као non <sup>V600E</sup> BRAF/ non RAS тумори и укључују туморе са генетичким реаранжманом PAX8::PPARG и туморе са тачкастим мутацијама у генима EIF1AX, EZH1, IDH1, SOS1, SPOP, DICER1 и PTEN (2,3).

Акумулацијом генетичких измена у туморским ћелијама добро диферентованих карцинома ШЖ све три наведене групе, могу показати прогресију и дедиференцијацију према карциномима фоликуларних ћелија високог градуса и анапластичном карциному. Најчешће пријављиване генетичке измене у прогресији добро диферентованих карцинома су мутације у генима p53 и промотеру TERT (2,3).

Малигни тумори порекла парафоликуларних ћелија су медуларни карциноми ШЖ који чине мање од 5% примарних малигнитета ШЖ. Ови карциноми имају агресивнији

клинички ток у односу на добро диферентоване карциноме ШЖ, а десетогодишње преживљавање је око 75-85% (4).

### **Папиларни карцином штитасте жлезде**

Према дефиницији СЗО, *PTC* је малигни епителни тумор порекла фоликуларних ћелија који има карактеристично измењена једра, папиларну грађу и/или инвазиван раст (2,5). Ради се о најчешћем карциному ШЖ који чини око 90% новодијагностикованих случајева (5).

### **Епидемиологија папиларног карцинома штитасте жлезде**

Инциденца *PTC* је уназад неколико деценија у сталном порасту и његова учесталост се пријављује у распону од 65-93 % у зависности од географског поднебља. Тренутно, у односу на учесталост осталих карцинома, *PTC* заузимају 13. место, док су на 6. месту најчешћих карцинома код жена (1).

### **Етиологија карцинома штитасте жлезде**

Етиолошки фактори настанка *PTC* још увек нису довољно познати. Најиспитиванији фактор ризика за настанак *PTC* је свакако радиокативно зрачење, посебно истраживан након нуклеарних катастрофа у Чернобилу и Фукошими.

Изложеност радиоактивном зрачењу може бити инцидентална, дијагностичка или терапијска. Јонизујуће зрачење утиче на раскидање ДНК ланаца и изазива соматске мутације, последично доводећи до канцерогенезе. Посебно неповољан и опасан утицај јонизујуће зрачење има код деце, јер је штитаста жлезда у том узрасту врло радиосензитивна и вулнерабилна (6). Експериментално је још 2005. год. доказано да изложеност радиоактивном зрачењу код тироцита може довести и до RET::PTC реаранжмана (7). После Чернобилског акцидента, највећи број раних *PTC* су били тумори са RET::PTC-3 реаранжманом који је упућивао на радијационо оштећење, док су каснији случајеви *PTC* били карциноми са RET::PTC-1 реаранжманом карактеристичним за класичне папиларне карциноме (6).

Медицинске и денталне радиолошке дијагностичке и терапијске процедуре у пределу главе и врата повећавају изложеност ШЖ X-зрацима, због чега је и ризик за настанак *PTC* већи, посебно ако је до те изложености дошло у детињству или раној

младости. Отприлике 30% од свих учињених скенерских (СТ) процедура су у регији главе и врата (8).

Терапијска примена радиоактивног јода  $I^{131}$  у склопу лечења нестабилне форме хипертиреозе на терену Грејвс-Базедовљеве (енгл. *Graves-Basedow*, GB) болести може такође корелирати са већим ризиком за настанак *PTC*, али и карцинома других органа. Овај ризик је дозно зависан, што значи да је примена  $I^{131}$  у дози већој од 1 Gy потенцијално опаснија и повезана са повећаним ризиком настанка *PTC* (9).

Дуготрајни блажи дефицит јода у исхрани доводи до повећања концентрације TSH (тиреостимулирајући хормон) који је главни стимулаторни фактор раста фоликуларних ћелија штитасте жлезде и потенцијални фактор ризика за настанак *PTC*. Хронична TSH стимулација и BRAF мутација могу бити укључени у механизам карциногенезе (10). Утицај селена са његовим антиоксидантним својствима, као претективног фактора у тироидној карциногенези и метаболизму тироидних хормона још увек није јасно дефинисан. Досадашње епидемиолошке студије су по питању утицаја микроелемената у патогенези *PTC* недоследне (11).

Значајан пораст преваленце гојазности и типа 2 шећерне болести, који се бележи од осамдесетих година прошлог века, корелира са порастом инциденце *PTC* у истом периоду (12). Последњих деценија су спроведене бројне студије којима је доказана повезаност између гојазности и инциденце *PTC*. Екссес масног ткива директно утиче на туморски раст и прогресију код *PTC* који су  $V^{600E}$  BRAF позитивни, док ова повезаност није уочена код *PTC*  $V^{600E}$  BRAF негативних *PTC* (13). Најважнији фактори којима се објашњава утицај гојазности на појаву *PTC* су инфламација и инсулинска резистенција. Гојазност условљава хипоадипонектемију, проинфламаторно стање и инсулинску резистенцију (енгл. *Insuline resistance*, IR). IR доводи до повећања концентрације ILGF-1 (енгл. *Insuline-like growth factor-1*), чиме се повећава ризик за настанак тироидног карцинома. Кључну улогу у овом процесу има IR кроз интеракцију са ILGF-1, адипоцитокинима и цитокинима као и TSH (14,15).

У прилог овоме иду и резултати неких студија у којима је показано да код особа са типом 2 шећерне болести које користе метформин постоји смањен ризик за настанак *PTC* (16).

Улога естрогена у настанку *PTC* је још увек предмет расправа и контроверзи. Чињеница да је *PTC* чешћи код жена у односу на мушкарце отворила је могућност хормоналне улоге у етиологији овог тумора. Естрадиол као најпотентнији женски полни хормон стимулатор је настанка како бенигну тако и малигну туморских лезија. Међутим, још увек не постоје адекватне епидемиолошке студије које би ову тврдњу подржале. Неке студије су доказале да хормонска супституциона терапија након оваријектомије није довела до повећаног ризика за настанак *PTC*. За сада нема података о протективном ефекту раног губитка оваријалних естрогена на *PTC* (17). На већу инциденцу *PTC* код жена у односу на мушкарце свакако утиче чешће присуство аутоимунске болести штитасте жлезде, као што је Хашимотов тиреоидитис (енгл. *Hashimoto Thyroiditis*, HT) и Грејс-Базедовљев тиреоидитис (18).

Бенигне болести ШЖ, као што су тироидни нодуси, гушавост, хипертиреоза, хипотиреоза, тиреоидитиси (HT и GB) често претходе *PTC*. Међутим и даље је нејасно да ли и како ова стања директно утичу на настанак и прогресију *PTC*. У склопу дијагностичке обраде тироидних болести, инцидентално могу бити дијагностиковани *PTC*. Многе досадашње клиничке студије су показале да су бенигни тироидни нодуси/аденоми и струме ШЖ значајни фактори ризика за настанак *PTC* (19). Студије такође показују мање значајну повезаност између хипер и хипотиреозе и *PTC*, као и безначајну повезаност тиреоидитиса и *PTC* (18,20,21).

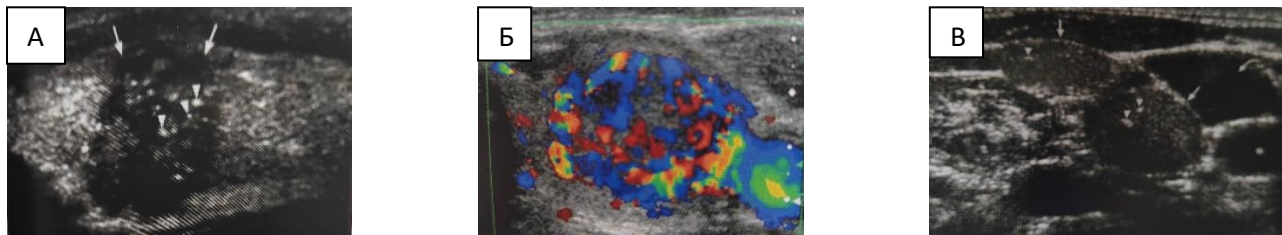
Иако је у експерименталним студијама висок TSH схваћен као могућ промотер раста и пролиферације тироидних канцерских ћелија, јасна повезаност у клиничким студијама није доказана. Са друге стране, супримиран TSH може условити позитивну корелацију између хипертиреозе и *PTC*, јер је доказано да су ризични алели за настанак карцинома близу FOXE1 (TTF2) и KNX2-1(TTF1) гена који су повезани са ниском концентрацијом TSH (22).

### **Клиничко испољавање, дијагноза и лечење *PTC***

Нодозно или полинодозно измењене ШЖ су честа појава, и према резултатима ултразвучно (УЗ) дијагностикованих нодуса, њихова преваленца је 67% у општој популацији (23). Клиничке манифестације *PTC* зависе од величине нодуса у ком се налазе

и/или од његове испољене функционалне активности. Уколико су присутни нодуси великих димензија или је дошло до инфилтрисања околних анатомских структура (једњак, душник, лимфне жлезде) испољиће се симптоми компресивног синдрома (кашаљ, гушење, отежано дисање, отежано гутање, немогућност лежања на равном, притисак у врату...). Код тумора који притискају или инфилтришу гласнице и рекурентни нерв испољиће се промуклост. Код нодуса мањих димензија изостају симптоми компресивног синдрома и они се понашају асимптоматски. Међутим уколико је *PTC* у функционално активном нодусу/нодусима клиничком сликом доминирају симптоми хиперметаболизма и адренергичке стимулације, са или без симптома компресивног синдрома. *PTC* који се проширио на вратне лимфне чворове (ЛН) може условити њихово увећање, које може бити уни или билатерално, најчешће асиметрично. И метастатски увећани вратни лимфни чворови могу условити компресивне сметње.

Након клиничког прегледа ШЖ, најважнија дијагностичка процедура је ехосонографски преглед врата. Ултразвучни изглед *PTC* и метастатски измењених ЛН је приказан на слици 1. На основу УЗ прегледа се процењује присуство или одсуство суспектних морфолошких карактеристика *PTC*.



**Слика 1.** Ултразвучни изглед *PTC* и метастатски измењених ЛН. А – хипоехоген, нејасно ограничен паренхимски нодус са микрокалцификатима (лонгитудиналном пресек). Б – хиперваскуларизација нодуса, В – два округла, јасно ограничена хипоехогена ЛН са микрокалцификатима. *Из архиве Клинике за ендокринологију ВМА*

Суспектне морфолошке (УЗ) карактеристике малигнитета су уочена хипоехогеност нодуса, присутни микрокалцификати и неравне ивице, већи вертикални од хоризонталног промера, наглашена пери и интранодуларна васкуларизација. Уколико неки од нодуса показује

наведене УЗ карактеристике индикована је апсирациона биопсија танком иглом (енгл. *Fine-Needle Aspiration Biopsy*, FNAB) и цитолошка анализа пунктата нодуса. Због минималне инвазивности, високе сензитивности (80%) и високе специфичности (приближно 100%), FNAB и УЗ преглед представљају најчешће дијагностичке процедуре у процени малигнитета ШЖ. (24,25).

УЗ вођена FNAB је ефикасна метода утврђивања малигнитета и код *PTC* који су мањи од 1 cm. Међутим, према важећим водичима Америчког удружења тиреоидолога (енгл. *American Thyroid Association*, АТА) и Европског удружења тиреоидолога (*European Thyroid Association*) FNAB се не препоручује за туморе мање од 1 cm чак и уколико су присутне УЗ карактеристике малигнитета, а не уочава се суспектно присуство секундарних депозита у лимфним жлездама врата. У оваквим случајевима се саветује клиничко праћење које подразумева УЗ контроле и, по потреби понављање FNAB. FNAB је индикована уколико се примети увећање нодуса или појаве суспектно малигно измењене лимфне жлезде врата (23,25). На основу цитолошке анализе пунктата нодуса се разматра даљи модалитет лечења и праћења болесника. Иницијални корак у терапији *PTC* је хируршко лечење које подразумева тоталну тиреоидектомију са или без медијалне, унилатералне или билатералне дисекције лимфних нодуса врата. Код *PTC* мањих од 1 cm, без мултифокалног раста и екстратироидног ширења препоручује се лобектомија.

Примењен начин лечења *PTC* зависи од стадијума болести. На основу VIII издања АЈСС/TNM (енгл. *American Joint Committee on Cancer/Tumor Node Metastasis*) за стадијуме болести *PTC*, поред основних клиничко-патолошких параметара (величина тумора, присуство метастаза у лимфне чворове и удаљених метастаза) стадијум болести се процењује и на основу година болесника, и то кроз две старосне групе. Прву групу чине болесници млађи од 55 година, а другу групу болесници са и више од 55 година (26).

У Табели 2 је приказан начин одређивања клиничког стадијума болести код *PTC*.

**Табела 2.** Начин одређивања клиничког стадијума болести код болесника са *PTC*

<b>Клинички стадијум болести код болесника млађих од 55 година</b>			
Стадијум I	Било који Т-стадијум	Било који N-стадијум	M0
Стадијум II	Било који Т-стадијум	Било који N-стадијум	M1
<b>Клинички стадијум болести код болесника старијих од 55 година</b>			
Стадијум I	T1a,T1b,T2	N0	M0
Стадијум II	T3a,3b	N0	M0
	T1a,T1b,T2,T3a,T3b	N1a,N1b	M0
Стадијум III	T4a	Било који N-стадијум	M0
Стадијум IVa	T4b	Било који N-стадијум	M0
Стадијум IVb	Било који Т-стадијум	Било који N-стадијум	M1

Т-патолошки стадијум одређен величином тумора и/или локалном проширеношћу тумора; N-патолошки стадијум одређен присуством метастаза у ЛН врата; N0 – нема метастаза; N1a-метастазе су присутне у централној вратној регији; N1b – метастазе су присутне у ЛН латералних вратних регија; M – патолошки стадијум одређен присуством или одсуством удаљених метастаза; M0 – нема удаљених метастаза; M1 – присутне су удаљене метастазе. Преузето и прилагођено из Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, editors. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2017. (World health organization classification of tumours).

На основу критеријума наведених у Табели 2 сви болесници млађи од 55 година, без удаљених метастаза, без обзира на Т и N-стадијум, су у првом клиничком стадијуму. Код ове групе болесника присуство удаљених метастаза их сврстава у други клинички стадијум.

Болесници старији од 55 година, са патолошким стадијумом N1a и/или N1b су у другом клиничком стадијуму. Уколико је тумор инфилтрисао пертитироидне мишиће, трахеју или рекурентни нерв болесници су у трећем клиничком стадијуму, док присуство удаљених метастаза указује на постојање четвртог клиничког стадијума.

Код болесника са трећим и четвртим клиничким стадијумом болести лечење обухвата тоталну тиреоидектомију са или без лимфаденектомије (централне и латералне/их), као и примену терапије радиоактивним I<sup>131</sup> (27,28). Одлука о постоперативној примени радиоактивног I<sup>131</sup> (RAI) се доноси на основу иницијалних прогностичких индикатора који повезују *PTC* и ризик од појаве рецидива болести или смртог исхода. Најважнији параметри анализирања у стратификацији ризика су: хируршки и патохистолошки налаз, постоперативна концентрација тиреоглобулина и постоперативни УЗ налаз. Очекиван бенефит постоперативне примене RAI терапије зависи од индивидуалног АТА (American Thyroid Association) ризика за појаву рецидива тумора или смртог исхода. Код *PTC* је већи ризик од појаве рецидива или перзистентне болести у односу на ризик од леталног исхода. Према АТА класификацији су дефинисане три групе болесника са различитим ризиком за појаву рецидива болести (29).

Прву групу чине болесници са високим АТА ризиком (већим од 20%) и то су они са присутном макроскопском инвазијом тумора у перитиреоидна мека ткива, са непотпуном ресекцијом тумора, са удаљеним метастазама и постоперативном концентрацијом тиреоглобулина (Tg) која указује на постојање удаљених метастаза, као и они са присутним било којим метастатским ЛН већим од 3 цм у највећем дијаметру. Болесници са оваквим АТА ризиком имају велики ризик и од смртог исхода услед *PTC*. Другу групу чине болесници са умереним АТА ризиком (5-20%). Код ових болесника је присутна микроскопска инвазија тумора у перитиреоидна мека ткива, агресивна патохистолошка слика (високоћелијски, клинасти, цииндрични подтип *PTC*), затим васкуларна инвазија, клинички N1 стадијум или више од 5 патолошких N1, са свим N1 мањим од 3 см у највећој димензији, као и мултифокални папиларни микрокарцином са микроскопском инвазијом у

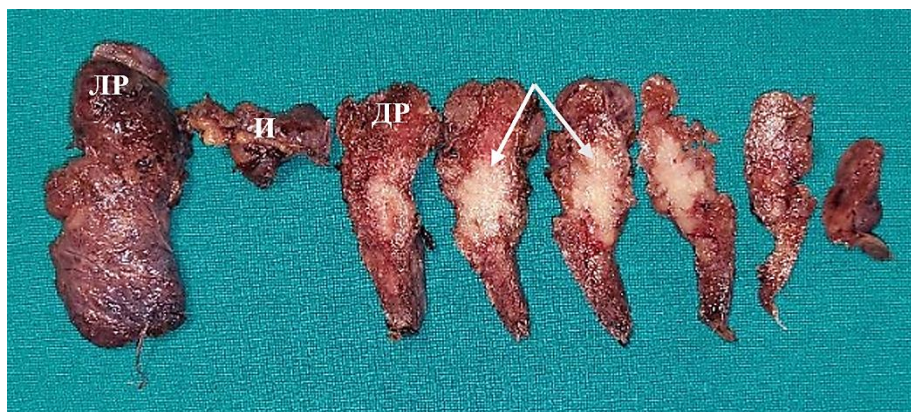


перитиреоидина мека ткива и <sup>V600E</sup> BRAF мутацијом уколико је позната. Трећу групу болесника чине они са ниским АТА ризиком (мањи од 5%) код којих је *PTC* интратиреоидно локализован, без васкуларне инвазије, са или без малих метастатски измењених ЛН (клинички N0 или до 5 N1, сви мањи од 0,2 cm у највећој димензији), затим интратироидни инкапсулиран фоликуларни подтип *PTC* који је <sup>V600E</sup> BRAF WT (*BRAF-wild-type*) или <sup>V600E</sup> BRAF позитиван, уколико је познато. Претходним студијама је доказано да присуство минималног екстратироидног ширења (енгл. *Extrathyroid extension*, ЕТЕ) *PTC* не утиче на појаву рецидива и укупно преживљавање (29).

## Патохистолошке карактеристике *PTC*

### Макроскопски изглед *PTC*

Најчешће, *PTC* се презентује као инвазивни тумор нејасно ограничених, инфилтративних ивица. Тумор је чвршће конзистенцијуе, ситнозрнасте површине пресека, беличастосивкасте боје. У тумору могу постојати назначена поља склерозе, цистична дегенерација, депозити калцификата. Макроскопски изглед класичног подтипа *PTC* је приказан на слици 2.



**Слика 2.** Макроскопски изглед *PTC*. На учињеној серији пресека у десном режњу жлезде (ДР) налази се *PTC* (стрелица) инфилтративних ивица, солидне и ситнозрнасте површине пресека. ЛР – леви режањ ШЖ; И – истмус ШЖ. Из архиве Института за патологију и судску медицину ВМА.

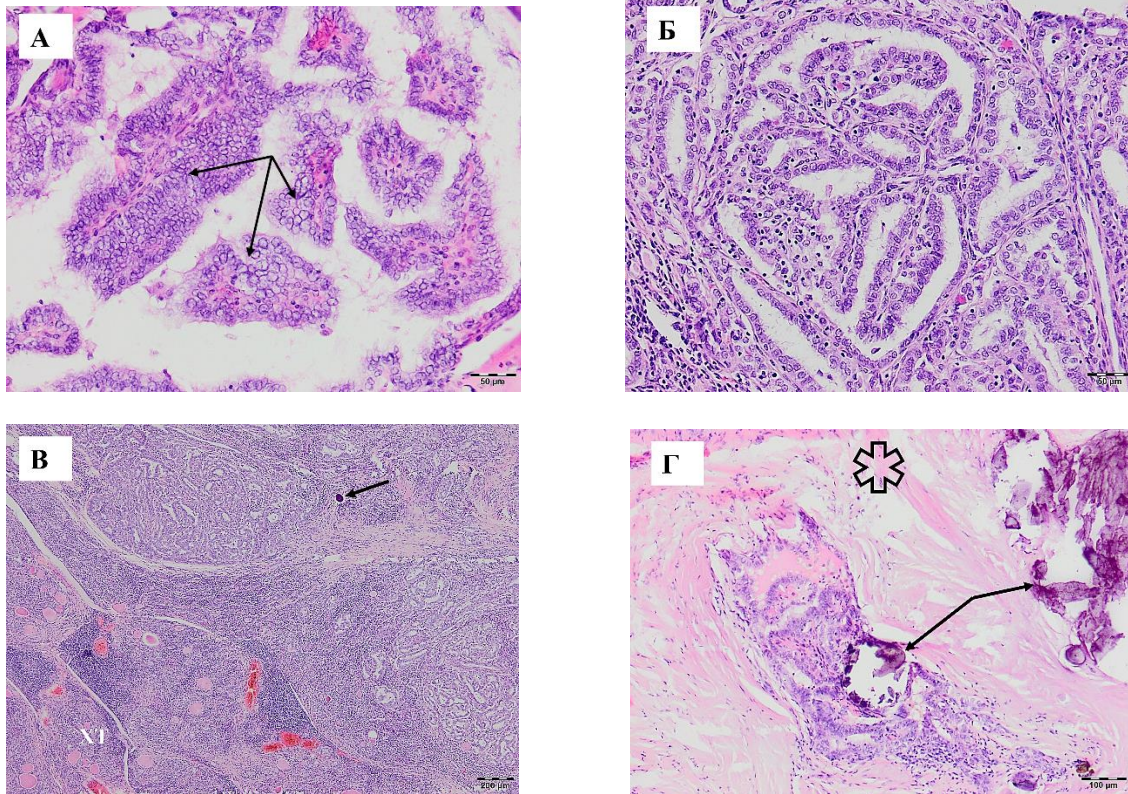
Варијације у величини *PTC* су значајне и прате се од субмилиметрских димензија до величине од преко 10 cm. Просечна величина је од 2 до 3 cm. Карцином може настати у свим деловима ШЖ и често показује интратиреоидно ширење и/или мултифокални раст (2,3,5).

### **Микроскопски изглед *PTC***

Патохистолошки и дијагностички водећа карактеристика *PTC* је морфологија нуклеуса његових ћелија. Нуклеуси ћелија *PTC* су типично увећани оптички светлог изгледа. У нуклеусима постоји периферна маргинација хроматина због чега су нуклеране мембране назначене. Нуклеолуси су мали и периферно локализовани. У склопу сета нуклераних измена карактеристично постоје уврати нуклераних мембрана који се презентују као нуклеране бразде и нуклеране псеудоинклузије. Нуклеуси су овални или ирегуларног изгледа и могу се видети троугласте, клинасте и биконкавне форме. Присутан је и карактеристичан распоред нуклеуса у виду нуклераног преклапања и нагомилавања. (5).

Постоји више од 10 хистолошких подтипова *PTC* који су одређени морфолошком формом (папиларни подтип, фоликуларни подтип, солидни подтип), изгледом ћелија (подтип високих ћелија, подтип цилиндричних ћелија, подтип клинастих ћелија, подтип вретенастих ћелија), изгледом цитоплазме (онкоцитни подтип, светлоћелијски подтип) и типом строме (дифузни склерозирајући подтип, подтип са стромом налик нодуларном фасцитису). На основу инвазивности *PTC* се могу поделити на јасно ограничене са или без капсуле и инвазивне *PTC* (2,5,30).

У случајевима када је *PTC* изграђен од неопластичних папила ради се о класичном подтипу. Важну морфолошку карактеристику *PTC* представља и присуство псамозних тела, која се врло ретко уочавају у бенигним лезијама ШЖ и RAS-like туморима (2,5). Туморска строма у *PTC* може бити неупадљива или са присутном фиброзом различитог степена и форме (фибробластична, дезмопластична, склеротична или слична нодуларном фасцитису). У строми могу бити присутни калцификати, масне или коштане метаплазије. Запаљенску компоненту туморске строме чине интратуморски лимфоцити, хистиоцити и мултинуклеарне циновске ћелије. Микроскопски изглед *PTC* приказан је на слици 3.



**Слика 3.** Микроскопски изглед класичног подтипа *PTC*. **А** и **Б** – разгранате неопластичне папиларне пролиферације оивичене ћелијама типичних нуклераних карактеристика. **А** – назначена нуклеомегалија са хипохромазијом, нуклераним преклапањем и нагомилавањем (стрелица). **В** – класични подтип *PTC* инфилтративног раста у Хашимотовом тиреоидитису (ХТ). Присутно је и псамозно тело (стрелица). **Г** – карцином класичне морфологије наглашене склеротичне строме (звездица) са крупним калцификатима (стрелица). *Из архиве Института за патологију и судску медицину ВМА.*

Туморска некроза се не налази у *PTC*. Митотска активност је ниска (2,3,5). Уколико се у *PTC* детектује некроза која није секундарно изазавана претходном биопсијом или се у тумору детектује више од 5 митоза на  $2\text{mm}^2$ , према новој каласификацији тумора ШЖ, карцином се не дијагностикује као *PTC* већ као диферентован карцином ШЖ високог градуса (енгл. *Differentiated High-grade Thyroid Carcinoma*, ДНТС) (2,3). Значај хистолошких подтипова *PTC* је дијагностички и прогностички. Прогностички значај је у томе што поједини

подтипови попут подтипова клинастих, цилиндричних и високих ћелија показују агресивније биолошко понашање, чешћу појаву метастаза и рецидива (2,3). У подтиповима *PTC* са инвазивним растом, инвазија лимфатика се пријављује у до 67% и повезана је са интратироидним ширењем карцинома и појавом метастаза у регионалне лимфне чворове. Васкуларна инвазија се јавља у до 10% случајева и повезана је са неповољним клиничким током (5,31).

## Молекуларна основа *PTC*

У протеклих 15-ак година развој молекуларне биологије значајно је допринео бољем разумевању карциногенезе свих органа, па и ШЖ. Све је више података који потврђују повезаност генетичких и епигентичких промена са настанком и биолошким понашањем папиларних карцинома. Укључивање молекуларних параметара у патохистолошку анализу тумора значајно доприноси бољем сагледавању прогностичких показатеља и терапијске ефикасности (26). Многи протоонкогени, као што су RET, NTRK1, RAS и BRAF укључени су у патогенезу *PTC* (32). Најчешћи молекуларни догађаји у *PTC* су тачкасте мутације и генски реаранжмани који покрећу MAPK (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*), тачније ERK (енгл. *Extracellular signal-regulated kinase1/2*) /MAPK сигнални пут (33). Рецептор за који се везује ванћелијски индуктор који покреће овај сигнални пут најпре бива фосфорилисан, након чега ступа у интеракцију са протеином GRB-2 (енгл. *Growth factor receptor-bound protein 2*) који затим ступа у интеракцију са фактором SOS (енгл. *Son of sevenless*). Фактор SOS врши замену молекула GDP (енгл. *Guanosine diphosphate*), који је везан за неактиван протеин Ras (енгл. *Rat sarcoma virus*), молекулом GTP (енгл. *Guanosine triphosphate*). Везивањем GTP молекула долази до активирања Ras протеина, који затим каскадно активира Raf киназе, најпре MEK која потом активира ERK. MAP киназа има способност фосфорилације бројних супстрата, од којих су неки регулаторни транскрипциони протеини (33). Молекуларне измене сигналног пута MAP киназе региструју се у различитим фазама неопластичне трансформације, и то најчешће као тачкасте мутације у BRAF и RAS генима или у RET::PTC и PAX8::PPAR $\gamma$  реаранжманима (34).

BRAF ген је локализован на 7. хромозому (7q34) и кодира B-Raf протеин који припада фамилији Raf (енгл. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*). Тачкасте мутације у BRAF гену најчешће су анализирание генетичке мутације код *PTC*. Најчешћа тачкаста мутација на BRAF гену је замена тиамин аденином на нуклеотидној позицији 1799 (Т1799А) егзона 15. Ова трансверзија доводи до конверзије валина у глутамин на позицији 600 (V600). Као последица тачкасте мутације <sup>V600E</sup> BRAF гена настаје активна форма B-Raf киназе, са пет стотина пута већом киназном активношћу и проонкогеним деловањем (33,34). Мутација у <sup>V600E</sup> BRAF гену је присутна у око 45% класичних *PTC*, и повезана је са агресивнијим карактеристикама тумора као што су екстратиреоидно ширење, присуство метастаза у лимфне нодуса на врату, узнапредовали стадијум болести у тренутку постављања дијагнозе и рецидив болести (33,34). Међутим, значај <sup>V600E</sup> BRAF мутације као биомаркера агресивности *PTC* још увек није сасвим јасан. У BRAF гену су, поред наведене <sup>V600E</sup> BRAF тачкасте мутације, уочене и друге тачкасте измене као што су <sup>K601E</sup> BRAF и <sup>E611K</sup> BRAF, које су у ствари мале делеције или инсерције у околним кодонима 600, као и AKAP9::BRAF реаранжман (35).

Код *PTC* су детектоване и тачкасте мутације сва три гена која кодирају Ras протеин класе G, а то су HRAS (енгл. *Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), NRAS (енгл. *Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) и KRAS (енгл. *Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) ген. Ras протеин има централну улогу у активацији сигналних путева MAP и PI3 (енгл. *Phosphoinositol 3*) киназе. Тачкасте мутације на 12 и 13. кодону RAS гена доводе до стварања протеина који имају повишен афинитет за GTP. Мутацијом на кодону 61 настају протеини који испољавају способност инхибиције аутокаталитичке функције GTP (36). Оба ова механизма условљавају непрекидну аберантну нисходну активацију ефектора у MAP и PI3 сигналним путевима. Код *PTC* доминира мутациона изоформа NRAS 61(Q61R;c.182A>G) (36). Тачкасте мутације на RAS гену нису карактеристичне само за малигне туморе ШЖ, тако да се уочавају и у бенигним лезијама као што су фоликуларни аденоми и аденоматозни нодуси. Мутација у RAS гену је код *PTC* повезана са фоликуларном морфологијом тумора, ограниченом формом раста и мање израженим променама једра које су типичне за *PTC*, као и ређим појавама метастаза у вратне лимфне чворове (34,37).

RET протоонкоген (енгл. *Rearranged during transfection*, RET) је локализован на хромозому 10q 11.2 и кодира трансмембрански рецептор са тирозин-киназом активношћу. Овај протоонкоген је уобичајено испољен у парафоликуларним ћелијама и одговоран је за настанак медуларног карцинома ШЖ (38). У фоликуларним ћелијама ШЖ овај протоонкоген је у неактивном стању. Генетичким изменама, као што су хромозомски реаранжмани означени као RET::PTC долази до његове активације. RET::PTC реаранжмани су последица интрахромозомске парацентричне инверзије која доводи до фузије 3' дела RET гена и 5' дела неколико различитих гена. Најчешћи RET::PTC реаранжмани су RET::PTC1, RET::PTC3 и RET::PTC2. Реаранжман RET::PTC је подједнако присутан и у класичном и у фоликарном подтипу *PTC* и детектује се у распону од 5–35% случајева (38). RET::PTC3 реаранжман је наглашеније присутан код *PTC* који испољавају агресивније биолошко понашање, док су карциноми са RET::PTC1 генетским реаранжманом углавном класични *PTC* са ниским малигним потенцијалом и тзв. *бонсаи* фенотипом (39).

Теломераза је рибонуклеопротеински ензим и главни комплекс који је одговоран за продужавање теломера. Теломеразне секвенце су важни делови на крајевима хромозома. Теломеразни комплекс се састоји од две главне субјединице и низа протеина као што су Ku, HSP90 и TP1 (енгл. *Telomerase associated protein1*) (40). Главну субјединицу овог комплекса чини високо конзервиран, каталитички TERT протеин (енгл. *Telomerase reverse transcriptase*) који се састоји од 1132 аминокиселине), док другу субјединицу чини TERC (енгл. *Telomerase RNA componente*). Обе субјединице су неопходне за теломеразну активност. Ku протеин је есенцијалан протеин за ДНК репарацију тако што утиче на теломеразу кроз интеракцију између TERT и TERC субјединица (41). TERT локус се налази на кратком краку хромозома 5 (5p15.33), 2 Мб дистално од теломере. Генетички механизми који доприносе регулацији TERT у карциномима су мутације промотора, нумеричке варијације генских копија и генски реаранжмани. Епигенетичке модификације које утичу на регулацију TERT експресије у туморским ћелијским линијама су метилација промотора, метилација и ацетилација хистона, као и транскрипцијски и посттранскрипцијски механизми и некодирајуће РНК (42). TERT покретач мутација, као секундарног патогенетског догађаја, јавља се код 10% *PTC* и повезан је са агресивнијим клиничким током болести (2,3).

## ЕПИГЕНЕТИЧКЕ МОДИФИКАЦИЈЕ *PTC*

Епигенетичке модификације су промене генске експресије, до којих долази без промена у ДНК секвенци. Механизми епигенетичке контроле експресије гена су метилација ДНК, модификације хистона и регулација експресије путем регулаторних некодирајућих РНК (43). Доказано је да ниједан од ових механизма није доминантан и да између свих њих постоји сложена кооперација и интеракција, међусобно преплитање, где један механизам регрутује ензиме који затим покрећу други. Епигенетичке промене се такође називају и парамутацијама, јер су стабилна стања поремећене експресије гена која су митотички, или чак мејотски наследна. Међутим, епигенетичке промене су и потенцијално реверзибилне, што даје пластичност геному и могућност да ове промене генске експресије могу бити исправљене или поништене. Епигенетичке модификације имају кључну функцију у важним ћелијским процесима који укључују диференцијацију, ембриогенезу, као и карциногенезу. Осим тога, аберантна генска регулација услед епигенетичких промена код свих типова карцинома је доведена у везу са малигном трансформацијом, прогресијом тумора и метастатским потенцијалом (44).

Метилација ДНК укључује ковалентно додавање метил групе цитозинима који претходе гуанинима, тзв. CpG динуклеотидима, чиме се формира 5 метилцитозин (5mC). CpG динуклеотиди су често у виду острваца груписани у оквиру промотора гена. Метилацијом ових секвенци може се потенцијално блокирати везивање комплекса активације транскрипције, што резултира смењем генске експресије. На овај начин долази до „утишавања“ генске експресије више од 60% гена код човека, укључујући и тумор супресорске гене. Из овога произилази и кључна улога метилације у бројним физиолошким процесима који укључују развиће, диференцијацију, импринтинг, инактивацију X-хромозома, инактивацију транспозона и других покретних елемената чиме се одржава стабилност генома. ДНК метилација такође има улогу у закључавању једног алела код гена код којих постоји моноалелска експресија гена специфична за родитељски алел, односно геномски импринтинг. Импринтовани гени задржавају свој родитељски образац метилације, што доводи до успостављања родитељских образаца експресије тих локуса која се задржавају током живота. ДНК метилација је и у основи инактивације другог X-хромозома

код женског пола (45). Промене у обрасцима метилације ДНК се дешавају прогресивно током живота и налазе се у основи физиолошког старења, различитих комплексних обољења, као и настанку и прогресији карцинома (45,46).

Епигенетичке промене имају кључну улогу у диференцијацији. Геном свих ћелија нашег организма је идентичан, ДНК секвенца је идентична у свим неизмењеним ћелијама и управо епигенетичке промене доводе до диференцијалне експресије гена у диференцираним ћелијама адулта. Тако се метилација ДНК налази у основи различитости између зиготне тотипотентне ембрионалне матичне ћелије, плурипотентних матичних ћелија и унипотентних диференцираних адултних ћелија. Метилација ДНК се најчешће отклања у тренутку оплодње и поново успоставља током ембриогенезе, али новија истраживања указују да могу заостати неке епигенетске промене, чиме се остварује Ламарксов концепт наслеђивања стечених особина (46).

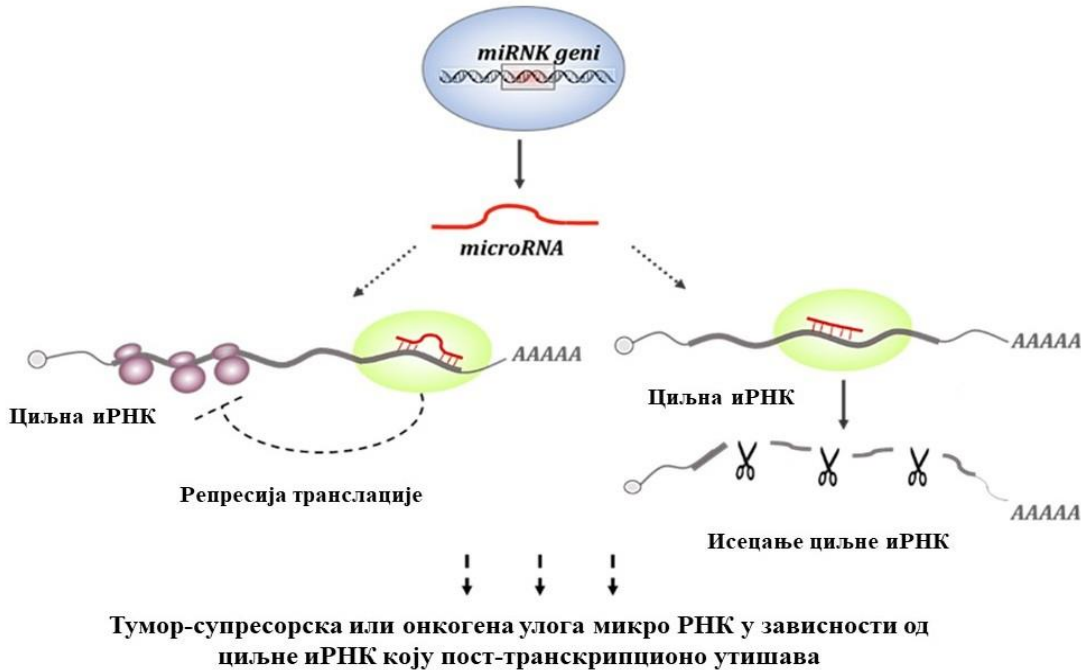
Модификације хистона имају динамичку улогу у организацији хроматина и регулацији експресије гена. Ковалентне модификације хистона обухватају процесе као што су метилација, фосфорилација, ацетилација, деацетилација, убиквитилација, сумоилација итд. Ацетилација хистона мења наелектрисање хистонских репова чиме хроматин постаје релаксиран и доступан факторима транскрипције. Остали видови модификација хистона утичу на хемијске карактеристике хистона и афинитет фактора транскрипције или других регулаторних протеина везивања за хроматин (47). Услед широког дијапазона модификације хистона које доводе до промене организације хроматина, уведен је термин „хистонски код“, који говори да није кључна само ДНК секвенца, ДНК код, већ и ове промене хистона које мењају архитектуру генома.

Новија истраживања показују веома важну улогу велике фамилије некодирајућих РНК (енгл. *Noncoding RNA*, ncRNA) у епигенетичкој регулацији генске експресије. Еукариотске некодирајуће РНК представљају веома хетерогену групу транскрипата које се разликују како по величини, тако и по биогенези и механизмима активности. Дужине „зрелих“ ncRNA варирају од око 18–22 нуклеотида, колике су просечно микро РНК, до око 17.000 нуклеотида, колика је XIST некодирајућа РНК, кључна за инактивацију другог Х-хромозома код женског пола (45). Некодирајуће РНК са регулаторном активношћу деле се на основу дужине и биогенезе на оне дужине преко 200 nt, које укључују дуге некодирајуће



РНК (енгл. *Long noncoding RNAs*, lncRNAs), и циркуларне РНК (енгл. *Circular RNAs*, circRNAs) и оне које су мање од 200 bp које укључују siRNA (енгл. *Short interfering*), микро РНК (енгл. *MicroRNAs*, miRs) и piRNA (енгл. *piwiRNA*). Дуже siRNA потпуно се спарују са циљном иРНК на основу комплементарности база, што доводи до деградације циљне иРНК. Сматра се да је овај механизам деградације дволанчане РНК еволутивно настао да би се ћелија заштитила од инфекције РНК вирусима и ретровирусима, код којих је РНК молекул носилац наследне информације. С друге стране, парцијалним спаривањем микро РНК са циљном иРНК покрећу се механизми која ће довести до инхибиције транслације блокирањем везивања рибозома и транслационе репресије. Некодирајуће РНК могу бити транскрибоване са независних транскрипционих јединица, али могу настати и исецањем током обраде примарног транскрипта, односно исецањем интронских секвенци. Тако lncRNA могу бити транскрибоване са протеин-кодирајућих секвенци егзона, интрона, транспозабилних елемената или интергенских секвенци (45,46,48). Неке некодирајуће РНК, као што су lncRNA, подлежу обради примарног транскрипта (енгл. *RNA splicing*) и модификују се додавањем 5'-метилгуанозин капе и 3'-поли (А) репа, које су важне за стабилност РНК молекула. Дуге некодирајуће РНК контролишу процесе експресије гена формирањем комплекса са транскрипционим факторима, интеракцијама са протеинима различитих сигналних путева, или ремоделовањем хроматина.

Најбоље окарактерисане мале некодирајуће РНК су фамилија микро РНК, еволуционо конзервисане, дужине од око 18–22 нуклеотида, које инхибирају експресију гена на пост-транскрипционалном нивоу, везујући се на своју циљну иРНК преко 3'-UTR нетранслатирајућих секвенци (енгл. *untranslated region*, UTR). Потпуно комплементарно спаривање микро РНК са иРНК доводи до деградације иРНК, ендорибонуклеазном активношћу Dicer ензима, који исеца дволанчане молекуле РНК и тиме доводи до деградације транскрипта (48), Слика 4. С друге стране, најмање некодирајуће РНК piRNA, су Dicer-независна фамилија малих некодирајућих РНК које формирају комплексе са piwi поткласом Argonaut протеина и учествују у утишавању транспозона и других репетитивних секвенци.



**Слика 4.** Микро-РНК у посттранскрипционој инактивацији генске експресије. *Преузето из (46).*

Комплексна унакрсна интеракција (енгл. *cross talk*) између различитих lncRNA и микро РНК има важну улогу у оркестрираном настајању малигне трансформације и фином подешавању експресије гена како би се створило туморско микроокружење (49). Иако су lncRNA првобитно дефинисане као некодирајуће, због неспособности кодирања протеина, недавне студије показују да неке lncRNA имају потенцијал да кодирају функционалне микропептиде који утичу на стабилност и експресију иРНК, обраду РНК и имунски одговор (50). Дакле, одређени механизми, иницијално приписани lncRNA, могу у ствари бити ефекти њихових кодираних микропептида. Између 2.000 и 3.000 микро РНК је откривено код људи и оне заједно регулишу експресију трећине гена у хуманом геному.

Микро РНК имају важну улогу у широком дијапазону ћелијских процеса, укључујући диференцијацију, апоптозу и одговор на стрес (51). Бројне микро РНК укључене су у регулацију експресије гена током ембрионалног развића, диференцијације, ћелијског старења, пролиферације и апоптозе, очувања самообнављајућег пула матичних ћелија, међућелијске комуникације и у одговору на стрес спољашње средине. Микро РНК у циркулацији су отпорне на слободне нуклеазе присутне у свим телесним течностима.

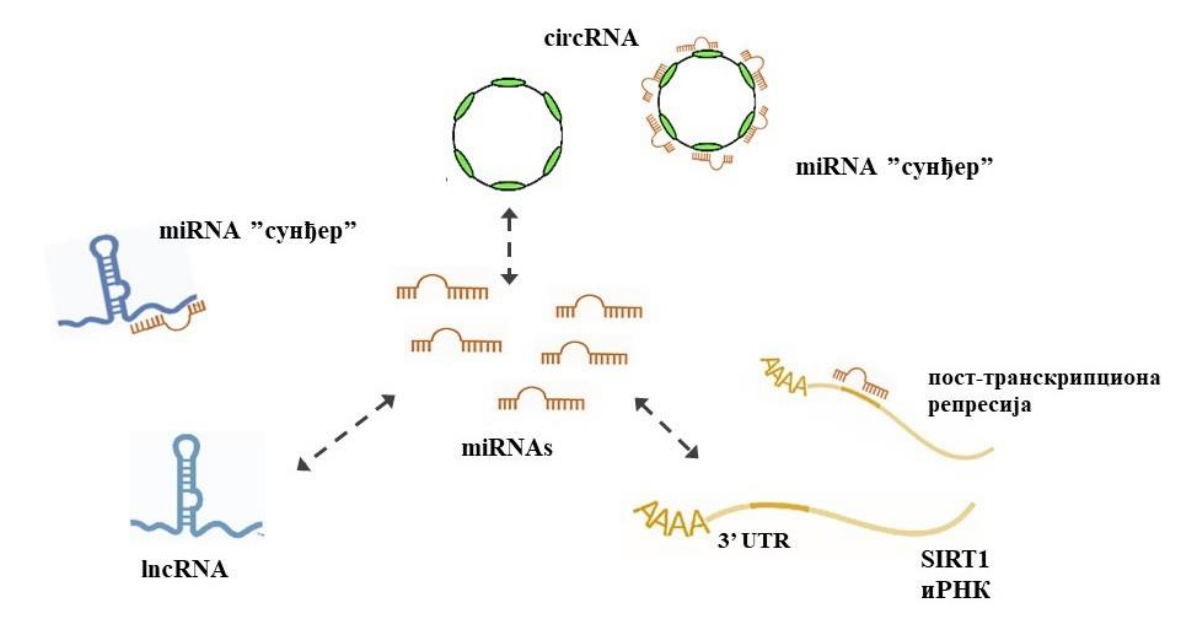
Посебно су заштићене микро РНК у екстрацелуларним везикулама, као што су егзозоми, који могу посредовати у паракриној и ендокриној комуникацији између различитих ћелија и ткива и модулирати експресију гена деловањем на удаљене ћелије. Некодирајуће РНК имају кључну улогу и у метилацији ДНК, модификацији хистона и импринтингу гена. Показано је да неке некодирајуће РНК имају висок афинитет везивања за CpG острвца и да својим везивањем могу довести било до деметилације или метилације CpG острвца, у зависности од стадијума развића или типа ткива (52).

Тренутно многе студије истражују улогу микро РНК у патогенези комплексних обољења као што су аутоимунске, неуродегенеративне и малигне болести. У односу на улогу у карциногенези микро РНК се деле на проонкогене и тумор супресорске (52). Поремећај експресије микро РНК може довести до активирања експресије онкогена, као и инхибирања циљних тумор супресорних гена. Међутим, у зависности од типа тумора или степена прогресије, поједине микро РНК могу деловати двојачко, испољавајући и тумор супресорску и проонкогену активност, у зависности од амбијента.

Тако су на пример miR-155, miR-21 и miR-183 онкогене miRNA, чија је експресија повећана код меланома (53) и оралног карцинома (54). MiR-21 је добро позната као miR са онкогеним потенцијалом, тзв. oncomiR и углавном је појачано експримирана код многих типова карцинома (54). Једна од студија показује да је повишена експресија miR-183а, а не miR-21 у вези са сниженим преживљавањем болесника са оралним карциномом (54). MiR-155 се доводи у везу са хиперпролиферацијом код великог броја карцинома, као и са пролиферацијом и апоптозом у Т-ћелијама, које леже у основи антитуморског имунског одговора. Смањење експресије miR-155 се доводи у везу са смањеном способношћу иницирања антитуморског одговора преко макрофага и дендритичних ћелија, као и ефекторских улога CD8<sup>+</sup> Т-ћелија у антитуморском имунском одговору (55). Једна од скоријих студија је показала улогу miR-155 и miR-150 у PD-1/PDL-1/IL33 осовини антитуморског имунског одговора код анималног модела (мишеви) код којег је индукована канцерогенеза ћелијама туморских линија карцинома дојке и колона (54). Повећана експресија miR-155 и miR-150 се доводи у везу са повећаном цитотоксичношћу NK ћелија (енгл. *natural killer*, NK) код мишева који су подвргнути двоструким третманима усмереним на IL-33 и PD-1 (53). Са друге стране, тумор супресорске микро РНК, као што су miR-146,

miR-34a и miR-34b/c показују смањену експресију код већег боја карцинома (52,56). Гени за микро РНК који имају улогу тумор супресора могу бити инактивирани услед делеција, а могу и садржати полиморфизме нуклеотидне секвенце (енгл. *Single Nucleotide Polimorphisms*, SNPs) који доводе до мењања експресије. Промотори гена за miRNA и сами могу подлећи ДНК хиперметилацији и на тај начин бити утишани у ћелијама тумора, као на пример код промотора гена за miR-34b/c (56).

Последњих година нови докази сугеришу да lncRNA и circRNA могу испољавати свој ефекат делујући као конкурентивне ендogene РНК (енгл. *Competing Endogenous RNA*, ceRNA) везујући се и неутралишући ефекте микро РНК, налик молекуларним „сунђерима“ (енгл. *molecular sponging*), чиме инхибирају репресију својих циљних гена, Слика 5. Њихова стабилност у циркулацији и транспорт путем микровезикула (егзозома), отварају различите могућности за клиничку примену miRNA, lncRNA и circRNA у савременој медицини, пре свега у дијагностици и терапији карцинома (46).



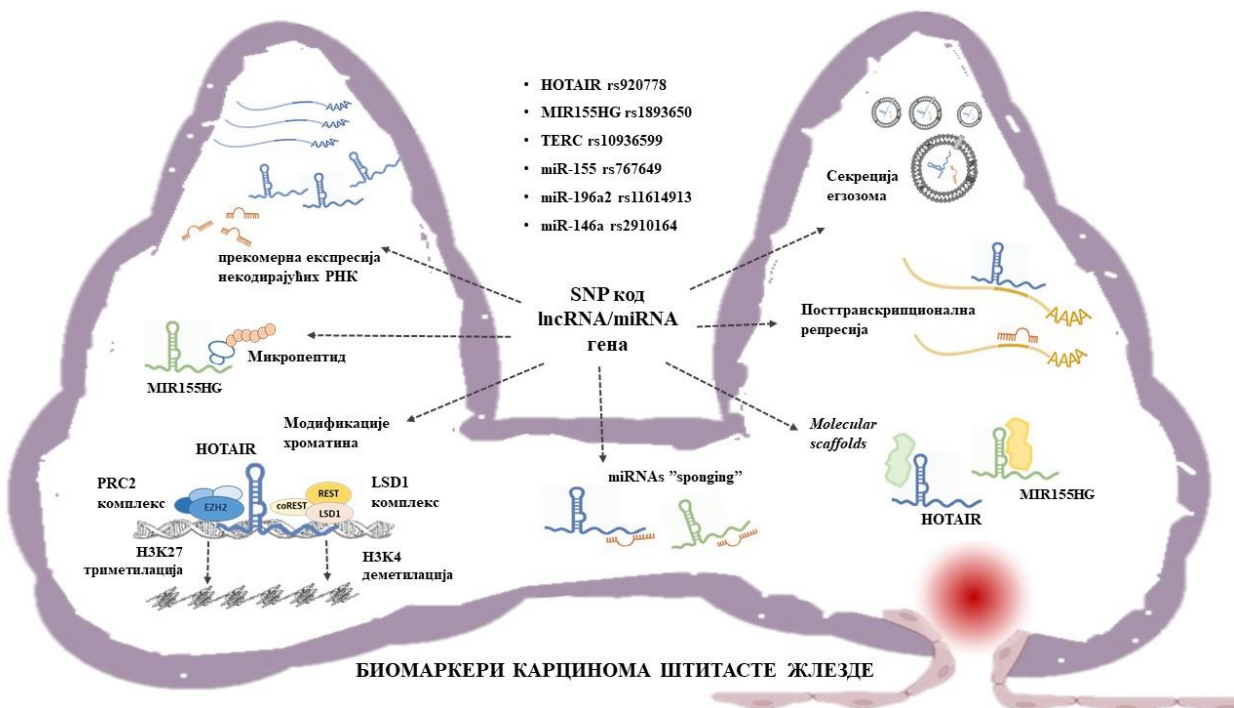
**Слика 5.** Фамилије некодирајућих РНК молекула. Дуге некодирајуће РНК (lncRNA) и циркуларне РНК (circRNA) делују као конкурентске ендogene РНК (ceRNA), функционишући као молекуларни „сунђери“ за микро РНК. *Преузето из (46).*

С обзиром да је доказана корелација између експресије miRNA и туморогенезе, miR миметици би на основу својих тумор супресорских ефеката, или циљног деловања на онкогене могли бити корисни у лечењу малигних обољења. Међуим, без обзира на бројне студије које показују кључну улогу miRNA у карциногенези, због непотпуног комплементог везивања miRNA са циљном секвенцом, и даље су непознати и непредвидиви штетни ефекти miR миметика, због чега су терапијски ризици врло високи. Прва miR циљана терапија у клиничком испитивању код узнапредовалих солидних тумора је била MiR-34a међутим, због озбиљних нежељених догађаја клиничка студија је прекинута (57). Ипак, будуће могуће лечење miR терапијом могло би бити засновано на нанотехнологији и индивидуализованом приступу заснованом на генетичком профилу болесника или ДНК метилацији и експресији микро РНК специфичној за одређено ткиво.

**HOX Transcript Intergenic Antisense RNA (HOTAIR)** је полиаденилирана lncRNA која је дуга 2,2 kb и састоји се од шест егзона. Она се преноси са *antisense* ланца HOX кластера који је на хромозому 12q13.13. Више студија је показало прекомерну експресију HOTAIR у различитим карциномима, укључујући и *PTC* (58–63). Онкогени потенцијал HOTAIR се заснива на његовој јединственој способности да делује као главни епигенетички регулатор динамике хроматина који доводи до транскрипционог утишавања специфичних циљних гена (62). HOTAIR садржи различита места везивања за ензиме који модификују хистоне, као што су 5' домен (1-300 nt) за везивање PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) и 3' домен (1500-2146 nt) за који се везује LCD1A (*Lysine-Specific Histon Demethylase 1A*). HOTAIR се понаша као молекуларна „скела“ (енгл. *Scaffold*) која регрутује PRC2 и LCD1 /CoREST/REST/ комплексе директно за промоторске регионе гена који су повезани са карциногенезом (64). Затим, HOTAIR се понаша и као компетитивна ендогена РНК (енгл. *competitive endogen RNA*, ceRNA), за микро РНК, чиме врши реверзију њихове репресије, доводећи до комплексне интеракције између прекомерно експримиране HOTAIR и различитих микро РНК којом утичу на пролиферацију, миграцију и инвазију канцерске ћелије (65).

**MicroRNA-155 Host Gene (MIR155HG)** који се још назива и lncRNA-155 и *B-cell integration transcript* (BIC) је ген који се састоји од 1,5 Kb са три егзона која се налазе на хромозому 21q21.2. Трећи егзон MIR155HG је високо конзервиран и кодира прекурсор за

miR-155, која има кључну улогу у инфламаторним процесима и антитуморским имунским одговорима (66). Све је више података којим се доказује да локус MIR155HG има двоструку функцију у контролисању урођеног имунитета. Осим што обрађује miR-155 овај локус и кодира lncRNA MIR155HG. Недавна истраживања показују да је аберантна експресија MIR155HG повезана са различитим малигнитетима (67–69). Директни регулатор промотера MIR155HG је нуклеарни фактор kB (енгл. *Nuclear factor kappa B*, NF-kB) који је есенцијални транскрипциони фактор укључен у регулисање урођеног имунског одговора и инфламације NF-kB повећава ниво експресије и MIR155HG и зреле miR-155 (70). Поред наведеног, MIR155HG се понаша и као ceRNA која је молекуларни „сунђер“ за низ микро РНК укључујући и miR-155 која је критична miR укључена у контролу имунског одговора (67,69). Занимљиво је да MIR155HG кодира микропептид који мења презентацију антигена и тиме потискује имунски одговор (71).



Слика 6. Потенцијални генетички и епигенетички биомаркери карцинома штитасте жлезде. Преузето и модификовано из J.Karajovic et al., 2023 (графички приказ).

**Telomerase RNA Component (TERC)** је 451nt дугачак RNK молекул кодиран локусом на 3q26.2 хромозому. TERC је есенцијална компонента теломеразе, рибонуклеотидног ензима потребног за елонгацију теломера. Главне функције TERC-а су да служи као матрица за додавање теломерних поновака помоћ каталитичке TERT субјединице (*Telomerase Reverse Transcriptase*) као и да се понаша као молекуларна „скела” који омогућава везујућа места за теломеразу регулаторне протеине (65,66). Међутим, поред функције у процесима везаним за ензим теломеразу, TERC такође има важну улогу и у низу других биолошких процеса, као што су контрола ћелијских инфламаторних одговора (72), антиапоптотичко деловање у Т-ћелијама (73) и инхибиција активности протеина ATR (енгл. *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), који има кључну улогу у репарацији ДНК након оштећења услед UV зрачења (74). Осим наведеног, TERC садржи и везујуће мотиве, који служе као „скела” за везивање промотера тумор супресорских гена који активирају NF-κB сигнални пут, њихову транскрипцију и ћелијску инфламацију (65). Код бројних малигнитета са TERT експресијом, у које спадају и агресивни тумори ШЖ, прекомерна TERC експресија покреће прогресију тумора (75). На овај начин је повећана експресија TERT независно повезана са преживљавањем без прогресије болести (76).

Две, до сада најпроучаваније микро РНК су **miR-146a** и **miR-155**. Обе су есенцијални регулатори имунске и инфламаторне сигнализације, међутим са потпуно супротним активностима. Док miR-146a делује антиинфламаторно, miR-155 има проинфламаторну функцију (77). Обе микро РНК имају двоструку функцију, и у многим малигнитетима могу деловати и проонкогено и тумор супресорно (78). Тако на пример miR-146a пре свега модулира експресију NF-κB, TLR (енгл. *Toll Like Receptor*) и цитокинску сигнализацију (79). Раније студије су указале да промене у експресији miR-146a могу бити повезане са већим ризиком за настанак и неповољну прогнозу *PTC* (80,81). Експресија miR-146a и miR-155 је већа у плазми боленика са *PTC* у односу на оне са бенигним тироидним нодусима. И miR-146a и miR-155 показују значајно смањење експресије у плазми након тиреоидектомије (32,82). Повишен ниво експресије miR-146a повезан је са лошим прогностичким параметрима *PTC*, као што су узнапредовали стадијум, присуство метастаза у лимфним чворовима и рецидив болести (81,83). Повећана експресија miR-155 у плазми болесника са *PTC* је у директној вези са величином тумора (82) са узнапредовалим

стадијумом болести, екстратиреоидним ширењем, присуством секундарних депозита у вратне лимфне нодусе и неповољним клиничким исходом (84).

Још једна микро РНК која је повезана са инфламацијом и чија је експресија повећана код *PTC* је **miR-196a**. Иако су резултати досадашњих студија у којима је испитивана улога miR-196a код различитих карцинома опречни, ипак је доказано да је miR-196a независан лош прогностички фактор за *PTC* (80,85). Ова miR би могла имати важну улогу у процесима инфламације и антитуморском имунитету кроз интеракцију са TLR2 и NF-κB сигналним путем (86), као и кроз IκBα који доводи до ЕМТ (енгл. *Epithelial-Mesenchymal Transition*) инвазије и метастаза (87).

Према нашим сазнањима, полиморфизми појединачних нуклеотида (SNP) у генима MIR155HG и TERC, као и miR-155 и miR-196a2 гена, нису проучавани код болесника са *PTC*, док је мали број студија испитивао полиморфизме у HOTAIR и miR-146a генима у *PTC* (88–91). Стога, наша студија има за циљ да истражи повезаност полиморфизама гена HOTAIR rs920778, MIR155HG rs1893650, TERC rs10936599, miR-155 rs767649, miR-196a2 rs11614913 и miR-146a rs2910164 са ризиком оболевања, појавом рецидива и преживљавањем без прогресије болести код болесника са *PTC*.



## ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

1. Полиморфизми у *NOTA1R*, *MIR155HG*, *TERC*, *miR-155*, *miR-196a2* и *miR-146a* генима могу бити у вези са етиолошким факторима, полом, годинама или постојањем Хашимотовог тиреоидитиса код болесника са класичним *PTC*.
2. Полиморфизми у истраживаним генима су у вези са неповољним клиничко-патолошким параметрима, стадијумом болести, величином тумора, присуством метастаза у лимфним чворовима и појавом рецидива болести код болесника са *PTC*.
3. Постоје разлике у учесталости полиморфизама у истраживаним генима између групе болесника са *PTC* и контролне групе, што указује да би полиморфизми у *NOTA1R*, *MIR155HG*, *TERC*, *miR-155*, *miR-196a2* и *miR-146a* генима могли бити маркери предиспозиције за појаву карцинома штитасте жлезде.

## ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Утврдити учесталост полиморфизама у HOTAIR, MIR155HG, TERC, miR-155, miR-196a2 и miR-146a *Real-Time* методом код болесника са класичним папиларним карциномом штитасте жлезде, као и код особа контролне групе, здравих особа, без историје малигних обољења.
2. Утврдити повезаност полиморфизама испитиваних гена са предиспозицијом за појаву папиларних карцинома штитасте жлезде поређењем са контролном групом здравих особа.
3. Утврдити повезаност испитиваних генетичких промена са клиничко-патолошким параметрима, укључујући стадијум болести, величину тумора, присуство метастаза у лимфним чворовима и појаву рецидива болести код болесника са *PTC*.
4. Утврдити повезаност полиморфизама у испитиваним генима са преживљавањем без рецидива болести (интервал времена до појаве рецидива – енгл. *Progression-free survival, PFS*).
5. Утврдити повезаност полиморфизама испитиваних гена са факторима ризика, полом, годинама као и присуством Хашимотовог тиреоидитиса код болесника са *PTC*.

# МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

## Врста студије

Истраживање је спроведено по типу ретроспективне студије, у којој су поређени резултати генетичких анализа са клиничко-патолошким параметрима. Други део студије је студија асоцијације полиморфизама у испитиваним генима која је осим анализе генотипова у групи болесника укључила и анализу учесталости промена ових гена у контролној групи здравих особа, одговарајуће полне и старосне дистрибуције.

## Етички аспект студије

Студија је изведена у оквиру пројекта MFVMA/03/23-25, за који је 21. 2. 2023. добијено одобрење Етичког одбора Медицинског факултета ВМА, Одлука бр. 6/4/2023. За спровођење ове докторске дисертације је 12. 5. 2023. добијено одобрење Етичког одбора Медицинског факултета ВМА, Одлука бр. 1/5/2023, а 23. 5. 2023. и одобрење Етичког одбора ВМА у Београду, Одлука бр. 36/2023. Студија је спроведена у складу са принципима добре клиничке праксе и Хелсиншком декларацијом и њеним каснијим изменама. Сви испитаници су дали писмени пристанак за учешће у студији.

## Селекција болесника

У студију су укључена 102 болесника којима је урађена тотална тиреоидектомија, са или без вратне лимфаденектомије у Клиници за општу хирургију ВМА, и сви су постоперативно праћени у Клиници за ендокринологију ВМА. Студија је укључила болеснике са патохистолошки доказаним *PTC*, оба пола, старије од 18 и млађе од 80 година. Контролну групу је чинило 106 здравих испитаника прилагођене старосне дистрибуције. Клинички и патохистолошки фактори који су испитавани су: старост, пол, присуство метастаза у време операције, мултифокалност, екстратиреоидно ширење, лимфо-васкуларна инвазија, величина туомра и присуство Хашимотовог тиреоидитиса. У студији нису укључени болесници након лобектомије штитасте жлезде, као и болесници са претходном историјом малигнух болести. Контролну групу за анализу полиморфизама чинили су здрави

испитаници одговарајуће старосне и полне дистрибуције, без малигног или системског обољења.

## **Патохистолошка анализа, патолошка евалуација и стадијум тумора**

Патохистолошка анализа препарата је спроведена у Институту за патологију и судску медицину ВМА, док су генетичке анализе спроведене у Одсеку за молекулску генетику Института за медицинска истраживања ВМА.

Анализа патохистолошких параметара је учињена на исечцима ткива карцинома из парафинских блокова дебљине 4  $\mu$  бојених стандардном хематоксилин-еозин методом. Патохистолошка класификација тумора је извршена према петом издању Класификације тумора СЗО (3), а стадијум болести је одређен на основу осмог издања АЈСС (*American Joint Committee on Cancer 8th Edition*) TNM за стадијуме болести за *PTC* из 2018. године (26).

## **Изолација ДНК и провера квалитета, концентрације и чистоће изоловане ДНК**

Геномска ДНК је изолована из узорака ткива карцинома фиксираних у формалину и укалупљених у парафину (енгл. *Formalin-fixed Paraffin-embedded*, FFPE) помоћу комерцијалног кита *Extract me*, Пољска. Полиморфозми у нуклеотидној секвенци гена су одређивани *Real Time PCR* методом, коришћењем *Real Time PCR 750* апарата и комерцијалних есеја за анализу полиморфизама нуклеотидних секвенци (енгл. *Single Nucleotid Polymorphism*, SNP) (*Applied Biosystems, Fosters city, CA, USA*). Идентификациони бројеви есеја су дати у Табели 3. Присуство одређене генетичке варијанте, односно одређеног алела полиморфизама је детектовано методом алелске дискриминације.

За анализу полиморфизама контролне групе испитаника геномска ДНК је изолована из узорака од 3 ml периферне крви са додатим антиколагулансом. За изолацију ДНК је коришћен комерцијални кит са колонама за изолацију геномске ДНК из крви, *Purellink TM Genomic DNA Kit*.

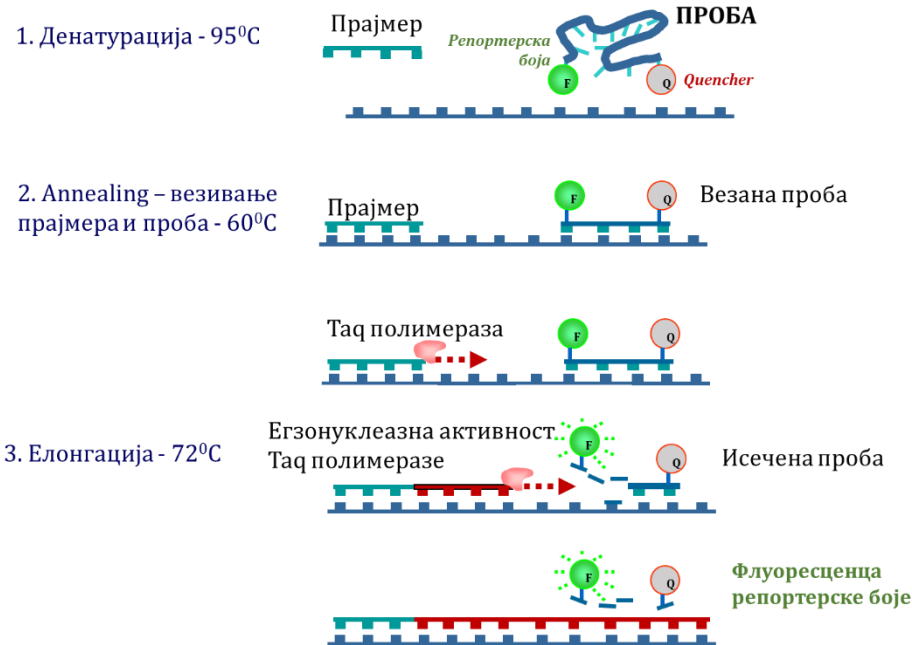
Квалитет изоловане ДНК је проверен електрофорезом на 2% агарозном гелу коришћењем ECX-F20.M *Vilber Lourmat* трансилуминатора. Концентрација и чистоћа изоловане ДНК мерене су спектрофотометријском методом на *BioTek Epoch 2/Take3* спектрофотометру.

## Генотипизација полиморфизама нуклеотидне секвенце **Real-time PCR** технологијом

Метода ланчане реакције полимеразе, PCR метода (енгл. *Polymerase Chain Reaction*) се користи за умножавање циљне секвенце ДНК молекула. Ензим који врши полимеризацију је термостабилна *Taq* полимераза. Сваки ланац ДНК служи као матрица за синтезу новог ланца. Прајмери додати у PCR смешу се везују за ДНК молекуле на основу комплементарности секвенце. *Taq* полимераза, која поседује полимеразну 5'-3' активност, на прајмере додаје нуклеотиде из смеше по принципу комплементарности, па се у сваком циклусу PCR реакције број молекула ДНК дуплира. *Real-time* PCR је модификација PCR методе, где се уз компоненте смеше који су присутни и у конвенционалном PCR-у налазе и флуоресцентно обележене *TaqMan* пробе.

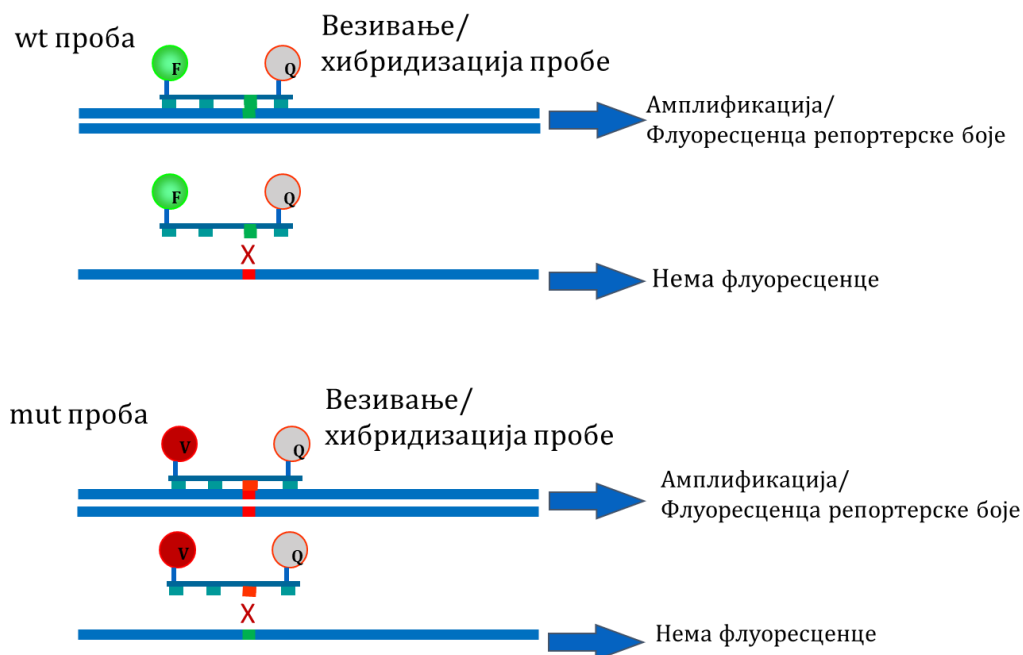
Комерцијални есеји за генотипизацију *TaqMan* технологијом садрже две *TaqMan* пробе, 2 прајмера, узводни и низводни, *Taq* полимеразу, еквимоларне концентрације сва четири нуклеотида и пуфер неопходан за одигравање реакције. *TaqMan* пробе су једноланчани кратки полинуклеотидни молекули комплементарни секвенци која садржи полиморфизам од интереса. Са једне стране *TaqMan* пробе, на 5' крају, се налази везана репортерска флуоресцентна бојом (FAM или VIC), а на њеном супротном 3' крају се налази пригушивач (енгл. *Quencher*, *Q*), Слика ... Интактна проба не флуоресцира, јер пригушивач „апсорбује“ флуоресценцију репортерске боје јер енергију флуоресценције са флуоресцентне боје пребацује на себе путем резонанције, али само уколико се репортерска боја и пригушивач налазе на малој удаљености. Након везивања прајмера и проба са циљном секвенцом, *Taq* полимераза врши полимеризацију додавањем нових нуклеотида из смеше. Међутим, *Taq* полимереза има и егзонуклеазно дејство јер сече испред себе везану пробу, услед чега долази до раздвајања репортерске боје од пригушивача и емитовања флуоресценције, која се регистује преко ласера *Real-time* PCR апарата, Слика 7. На тај начин је могуће праћење

амплификације ДНК молекула током сваког циклуса PCR, у реалном времену, услед чега је технологија и добила име.



Слика 7. Основни принципи *Real-time* PCR *TaqMan* технологије.

У смеси комерцијалних есеја за одређивање SNP налазе се две пробе, за две могуће варијанте алела, па је тако проба за један алел обележена FAM бојом (нпр. изворни wt алел), а друга проба за други алел обележена је VIC бојом (нпр. мутирани mut алел). Уколико је генотип особе хомозиготан (wt/wt или mut/mut) детектује се један флуоресцентни сигнал само једне репортерске боје (FAM или VIC). У случају хетерозиготног генотипа, wt/mut, детектују се флуоресцентни сигнали обе репортерске боје, (и FAM и VIC), Слика 8.



**Слика 8.** Основни принципи алелска дискриминација полиморфизама нукелотидне секвенце, где се применом *TaqMan* технологије врши алел-специфична PCR амплификација.

За припрему реакционе смеше *Real-time*PCR реакције коришћено је 2 $\mu$ л геномске ДНК, *TaqMan Universal PCR MasterMix (2x)*, *TaqMan SNP Genotyping Assay (40x)* и стерилна редестилована вода. Реакција генотипизације је извођена у оптичким плочама од 96 бунарића затвореним оптичком адхезионом фолијом. Температурни профил *Real-time* PCR реакције приказан је у Табели 4. Флуоресцентне криве су анализирани уз помоћ *Real-time* PCR SDS софтвера, в. 3.2 (*Applied Biosystems*, SAD).

Алелска дискриминација гена HOTAIR (rs920778), MIR155HG (rs1893650), TERC (rs10936599), miR-155 (rs767649), miR-196a2 (rs11614913) и miR-146a (rs2910164) вршена је методом ланчане реакције полимеризације у реалном времену (енгл. *Real Time* PCR) на *Real Time* PCR уређају 7500 *Applied Biosystems* коришћењем комерцијано доступних *TaqMan* есеја (*TaqMan SNPs Genotyping Assay*). Детаљи о анализираним варијантама гена дати су у Табели 3.

Табела 3. Анализиране варијанте гена

Ген	Локус	rs број	Идентификациони број есеја	SNP промена	Регион
HOTAIR	12q13.13	rs920778	C__9162435_20	C/T	енхенсер у интрону
MIR155HG	21q21.3	rs1893650	C__11728421_10	T/C	интрон
TERC	3q26.2	rs10936599	C__11798256_10	C/T	интрон
miR-155	21q21.3	rs767649	C__2212229_10	A/T	промотор
miR-196a2	12q13.13	rs11614913	C__31185852_10	C/T	3' UTR
miR-146a	5q33.3	rs2910164	C__15946974_10	C/G	промотор

За *Real Time* PCR реакцију укупне запремине 20  $\mu$ L коришћна је изолована геномска ДНК, *TaqMan Universal PCR MasterMix (2x)*, *TaqMan SNP Genotyping Assay (20x)* и стерилна дестилована вода. Компоненте реакционе смеше и температурни профил *Real Time* PCR реакције приказани су у Табели 4.

Табела 4. Компоненте реакционе смеше и температурни профил *Real Time* PCR реакције

Real Time PCR реакција								
Компоненте	Геномска ДНК	3 $\mu$ l		Укупна запремина	20 $\mu$ L			
	TaqMan® Universal PCR MasterMix (2x)	10 $\mu$ l						
	TaqMan® SNP Genotyping Assay (20x)	2 $\mu$ l						
	Стерилна дестилована вода	5 $\mu$ l						
Фаза реакције	Иницијална денатурација	Број циклуса	1	Температура	95° C	Трајање	10 минута	
	Денатурација		45		95° C		15 секунди	
	Хибридизација пробе и елонгација				60° C		1 минут	



## Статистичка обрада података и биоинформатика

За статистичку анализу добијених података коришћен је софтвер SPSS 20.0 (IBM Inc, Chicago, IL, USA). Непараметријске варијабле су анализирани коришћењем  $\chi^2$  теста или Фишеровог теста уколико је очекивана фреквенција била мања од 5.

### Варијабле које су праћене у студији:

- **Независне варијабле или узрок:** полиморфизми у генима за TERC, HOTAIR, miR-155, miR-196a2 и miR-146a.
- **Зависне варијабле:** присуство/одсуство метастаза у лимфним чворовима, појава рецидива, мултифокалност, екстратироидно ширење, лимфоваскуларна инвазија, величина тумора, присуство Хашимотовог тиреидитиса.
- **„Збуњујуће варијабле“** или додатни фактори који утичу на појаву PTC: старост и пол болесника.

Каплан-Мајерова метода и *log rang* тест су коришћени за израчунавање преживљавања без прогресије болести (PFS). Преживљавање без прогресије болести је дефинисано као време од датума дијагнозе до првог доказа о рецидиву тумора или последњег познатог статуса преживљавања.

Процена односа опасности (енгл. *Hazard ratio*, HR) са 95% интервалом поверења од 95% (енгл. *Confidence interval*, CI) је анализирана коришћењем Коксове регресионе анализе (енгл. *Cox hazard regression analysis*). Да би се патохистолошке карактеристике и генетске варијанте повезале са проценом нивоа ризика прво је урађена Коксова униваријантна пропорционална регресионе анализа. Варијабле за које је утврђено да су значајне у униваријантној анализи, укључујући оне са нивоима значајности испод 10%, накнадно су анализирани у мултиваријантном Коксовом пропорционалном регресионом моделу да би се истовремено проценио утицај више фактора на преживљавања без прогресије болести. Логистичка регресиона анализа прилагођена полу и старости је коришћена да се тестира повезаност између анализираних полиморфизама и ризика од папиларног карцинома штитасте жлезде. Јачина повезаности је процењена коришћењем односа шансе (енгл. *Odds ratio*, OR) и 95% интервала поверења (енгл. *Confidence interval*, CI). За процену ризика коришћени су генотипски, адитивни, рецесивни, доминантни и прекомерно доминантни модели. Према адитивном моделу, сви генотипови (*wild type* хомозиготи, wt), хетерозиготи

(ht) и мутирани хомозиготи (mt) подједнако доприносе фенотипу. Рецесивни модел претпоставља да мутирани хомозиготни генотип има највећи утицај на фенотип (пореде се mt са wt+ht). Са друге стране, доминантни (wt) хомозигот има најјачи утицај на фенотип (у поређењу wt наспрам ht+mt) према доминантном моделу. Прекомерно доминантни модел претпоставља да хетерозигот има најјачи утицај на фенотип (у поређењу ht са wt+mt). Вредности  $p$  мање од 0,05 су сматране значајним.

*HaploReg* v4.2 платформа је коришћена да би се предвидео потенцијални утицај полиморфизама гена кандидата на везујуће мотиве фактора транскрипције и/или појачиваче (92). TANRIC (енгл. *The Atlas of non-coding RNA in Cancer*) биоинформатичка платформа која повезује профиле експресије из прикупљених података о дугим некодирајућим РНК дубоког секвенцирања из базе података Атласа генома карцинома (енгл. *The Cancer Genome Atlas*, TCGA) коришћена је за истраживање повезаности дугих некодирајућих РНК са клиничким карактеристикама или подацима о преживљавању који су доступни у глобалним базама са подацима о карциному штитасте жлезде (93).

## Снага студије

Прорачун студијског узорка је учињен за ретроспективну студију (на основу ранијих студија и прелиминарне анализе) и коришћењем посебне методе за утврђивање величине узорка и снаге за генетичке студије асоцијације за тестирање генетичких варијанти. За студију асоцијације однос броја испитаника у групи пацијената са *PTC* и контролне групе здравих особа био је 1 : 1, како је препоручено за генетичке студије асоцијације, а контролну групу нису чинили случајни узорци популације, већ особе без карцинома штитасте жлезде и без других малигних или системских обољења. Уз вероватноћу грешке од 0,05, снагу студије 0,80 и дихотомно обележје посматрања ( $\chi^2$  тест), добијен је минимални број испитаника од 70 за анализе појединачних полиморфизама (снага студије 0,80) у свакој од група. Због истовремене анализе више полиморфизама и генетичких варијанти са малом учесталашћу у популацији, коришћени су строжији критеријуми и укључен је значајно већи број болесника. За наведени број испитаника снага студије асоцијације је ишла од 86% до 96,8% у зависности од вредности учесталости полиморфизма у здравој популацији, као и

учесталости карцинома штитасте жлезде у популацији, које су коришћене као улазни параметри за израчунавање.

## РЕЗУЛТАТИ

Демографске карактеристике испитиваних болесника и учесталост контролне групе и генотипова испитиваних генетских варијанти дате су у Табели 5. Групу болесника је чинило 71 жена и 31 мушкарац. Средња старост болесника са *PTC* била је 42 године, у опсегу од 20 до 80 година. Просечна величина тумора била је  $23,22 \pm 15,54$  mm. Удружен *PTC* са ХТ, је имало 46 болесника, 45,1% од укупног броја испитаника. Од ових 46 болесника, 4 је имало присутне метастазе у ЛН врата, што је 8,7% од болесника са удруженим ХТ и *PTC*. Калцификације у *PTC* је имало 29,41% (30/102 болесника). Мултифокалан *PTC* је доказан код 77,45% болесника (79/102 болесника). Постоперативно је RAI примило 75,49% болесника (77/102 болесника).

Међу 102 болесника са *PTC* 30,4% је било у стадијуму I (31/102 болесника), 58,8% је било у стадијуму II (60/102 болесника), а 10,8% је имало тумор III стадијума (11/102 болесника). Просечан период праћења био је 58 месеци (опсег 28–120 месеци). Стопа рецидива била је 13,7% (14/102 болесника), а већина болесника имала је рецидив болести у року од две године од операције. Период појаве рецидива се кретао од 5 до 65 месеци, са медијаном времена до рецидива од 14 месеци и средњим временом од 15,71 месеци. Ниједан од болесника није имао удаљене метастазе и ниједан није преминуо током периода праћења.

Резултати наше студије су показали значајну разлику у дистрибуцији генотипа између болесника са *PTC* и контролне групе одговарајуће старости и пола за полиморфизме NОТАIR rs920778 ( $p = 0,016$ ) и MIR155HG rs1893650 ( $p = 0,0002$ ), Табела 5. Није уочена разлика у учесталости генотипова других анализираних полиморфизама у TERC, miR-155, miR-196a2 и miR-146a генима.

Табела 5. Демографске карактеристике и учесталости варијанти гена код болесника са папиларним карциномом штитасте жлезде (*PTC*) и у контролној групи

Варијабле		Контроле		<i>PTC</i>		<i>p</i>
		N = 106	%	N = 102	%	
Пол	М	39	36.79	31	30.39	0,379
	Ж	67	63.21	71	69.61	
Године	55<	75	70.75	67	65.69	0,459
	≥ 55	31	29.25	35	34.31	
НОТАIR rs920778	CC	51	48.11	40	39.22	0,016
	CT	37	34.91	27	26.47	
	TT	18	16.98	35	34.31	
MIR155HG rs1893650	TT	53	50.00	75	73.53	0,0002
	TC	46	43.40	17	16.67	
	CC	7	6.60	10	9.80	
TERC rs10936599	CC	65	61.32	68	66.67	0,146
	CT	33	31.13	21	20.59	
	TT	8	7.55	13	12.75	
miR-155 rs767649	TT	95	89.62	86	84.31	0,255
	TA	11	10.38	16	15.69	
	AA	0	0	0	0	
miR-196a2 rs11614913	CC	55	51.89	56	54.90	0,149
	CT	41	38.68	29	28.43	
	TT	10	9.43	17	16.67	
miR-146a rs2910164	GG	72	67.92	72	70.59	0,473
	GC	27	25.47	20	19.61	
	CC	7	6.60	10	9.80	

*PTC* – папиларни карцином штитасте жлезде; Н – укупан број болесника/контрола наглашени су болдовањем

У Табели 6. је приказана повезаност анализираних варијанти гена са клиничко-патолошким карактеристикама *PTC* болесника.

*PTC* болесници са генотипом ТТ НОТАIR полиморфизма rs920778 имали су већу учесталост метастаза у лимфним чворовима у поређењу са CC генотипом ( $p = 0,042$ ) и у поређењу са носиоцима C алела (комбиновани CC+CT) ( $p = 0,022$ ), Табела 6.

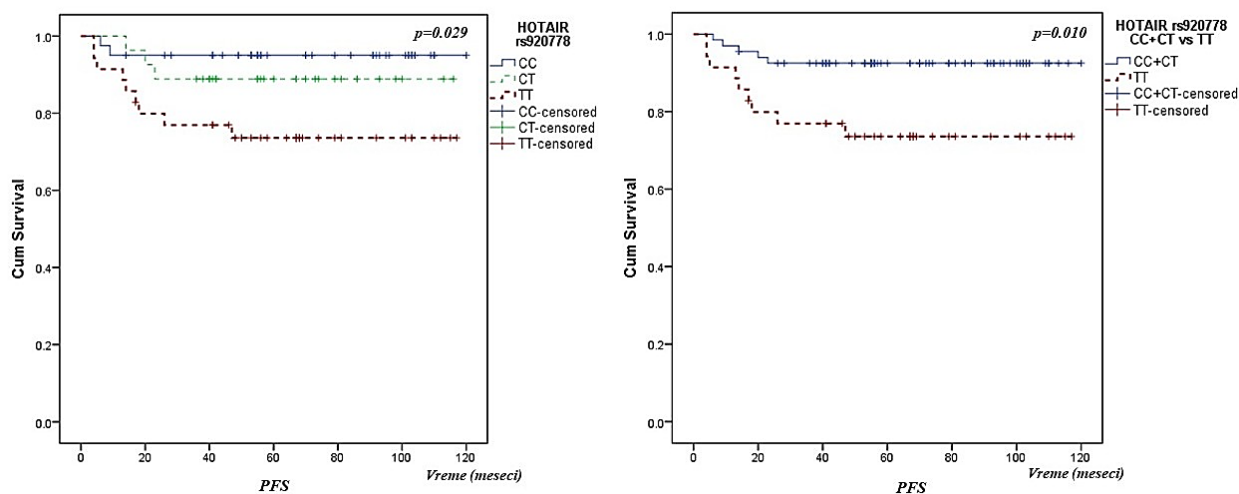
Табела 6. Повезаност анализираних варијанти гена са клиничко-патолошким карактеристикама *PTC* болесника

Варијабле		Н	<i>HOTAIR</i> rs920778 wt/ht/mt	<i>MIR155H</i> G rs1893650 wt/ht/mt	<i>TERC</i> rs1093659 9 wt/ht/mt	<i>miR-155</i> rs767649 wt/ht	<i>miR-196a2</i> rs1161491 3 wt/ht/mt	<i>miR-146a</i> rs2910164 wt/ht/mt
Године	<55	67	22/21/24	52/9/6	46/11/10	56/11	38/20/9	46/15/6
	≥55	35	18/6/11	23/8/4	22/10/3	30/5	18/9/8	26/5/4
	<i>p/p*</i>		0.142/0.414	0,404/0,733	0,287/0,534	1	0,477/0,175	0,602/0,733
Пол	Мушки	31	12/8/11	22/6/3	19/9/3	26/5	14/10/7	23/4/4
	Женски	71	28/19/24	53/11/7	49/12/10	60/11	42/19/10	49/16/6
	<i>p/p*</i>		0.986/1	0,890/1	0,356/0,749	1	0,380/0,386	0,463/0,487
Хашимото тироидитис	-	56	21/17/18	42/8/6	38/11/7	46/10	28/19/9	39/11/6
	+	46	19/10/17	33/9/4	30/10/6	40/6	28/10/8	33/9/4
	<i>p/p*</i>		0.615/0.610	0,754/1,000	0,958/1,000	0,591	0,389/1,000	0,941/1,000
Мултифока -лност	-	23	8/5/10	19/0/4	18/2/3	20/3	17/5/1	16/5/2
	+	79	32/22/25	56/17/6	50/19/10	66/13	39/24/16	56/15/8
	<i>p/p*</i>		0.587/0.621	0,030/0,227	0,267/1	1	0,077/0,110	0,946/1
ЕТЕ	-	84	33/23/28	61/15/6	52/19/13	69/15	45/23/16	60/16/8
	+	18	7/4/7	14/2/2	16/2/0	17/1	11/6/1	12/4/2
	<i>p/p*</i>		0.868/0.785	0,780/1	0,069/0,117	0,292	0,376/0,294	0,922/1
Васкуларна инвазија	-	48	22/16/10	35/8/5	32/10/6	40/8	25/18/5	33/11/4
	+	54	18/11/25	40/9/5	36/11/7	46/8	31/11/12	39/9/6
	<i>p/p*</i>		0.024/0.012	0,981/1	0,997/1	0,797	0,087/0,110	0,687/0,746
Калцифика ције	-	72	31/14/27	52/11/9	46/16/10	64/8	41/21/10	51/15/6
	+	30	9/13/8	23/6/1	22/5/3	22/8	15/8/7	21/5/4
	<i>p/p*</i>		0.045/0.363	0,340/0,274	0,653/0,592	0,049	0,505/0,244	0,694/0,475
АТА ризик	Низак	7	2/2/3	6/0/1	6/1/0	6/1	3/4/0	5/1/1
	Умерен	81	34/22/25	58/16/7	51/17/13	68/13	47/17/17	57/16/8
	Висок	14	4/3/7	11/1/2	11/3/0	12/2	6/8/0	10/3/1
	<i>p/p*</i>		0.670/0.336	0,531/0,741	0,359/0,145	0,981	0,012/0,071	0,985/0,873
Т	Т1	43	17/12/14	30/9/4	32/6/5	36/7	28/8/7	33/8/2
	Т2	35	17/8/10	27/4/4	17/11/7	28/7	15/13/7	22/9/4
	Т3	24	6/7/11	18/4/2	19/4/1	21/3	13/8/3	17/3/4
	<i>p/p*</i>		0.464/0.371	0,852/0,916	0,071/0,193	0,295	0,305/0,747	0,374/0,263
N	-	45	23/12/10	30/9/6	32/7/6	41/4	27/11/7	28/10/7
	+	57	17/15/25	45/8/4	36/14/7	45/12	29/18/10	44/10/3
	<i>p/p*</i>		0.042/0.022	0,354/0,330	0,535/0,874	0,093	0,640/0,789	0,150/0,102
Стадијум	I	31	15/8/8	22/6/3	20/6/5	29/2	17/11/3	22/7/2
	II	60	23/16/21	43/10/7	38/14/8	46/14	34/14/12	42/10/8
	III	11	2/3/6	10/1/0	10/1/0	11/0	5/4/2	8/3/0
	<i>p/p*</i>		0.420/0.223	0,679/0,489	0,443/0,378	0,035	0,580/0,452	0,568/0,296
Рецидиви	-	88	38/24/26	66/15/7	58/17/13	75/13	51/22/15	62/16/10
	+	14	2/3/9	9/2/3	10/4/0	11/3	5/7/2	10/4/0
	<i>p/p*</i>		0.031/0.016	0,289/0,138	0,269/0,206	0,457	0,150/1	0,323/0,350

\*вредности значајности за комбиновани генотип изворног типа (wt) и хетерозигота (ht) vs. мутираног (mt) хомозиготног генотипа; Н – укупан број болесника

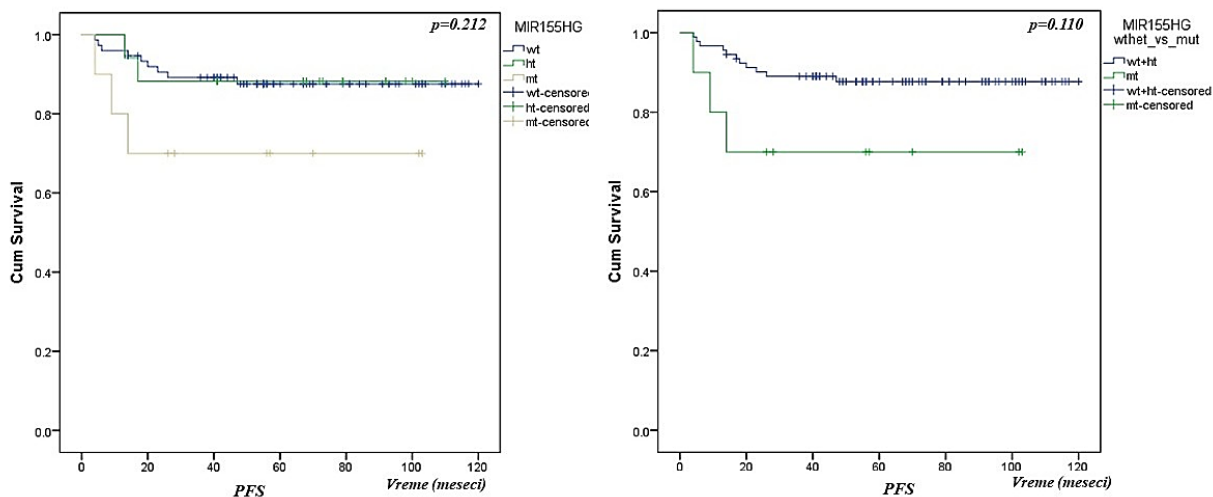
Осим тога, *PTC* болесници са ТТ генотипом *HOTAIR* rs920778 SNP имали су већу учесталост рецидива у поређењу са СС генотипом ( $p = 0,031$ ) и у поређењу са носиоцима С алела (комбиновани СС+СТ генотипови) ( $p = 0,016$ ), Табела 6. Поред тога, *HOTAIR* полиморфизам rs920778 је био повезан са васкуларном инвазијом ( $p = 0,024$ ) и калцификацијама ( $p = 0,045$ ), Табела 3. Такође је уочена повезаност између *MIR155HG* rs1893650 полиморфизма и мултифокалности ( $p = 0,030$ ) и између *miR-196a2* rs11614913 и АТА ризика ( $p = 0,012$ ). Полиморфизам *miR-155* rs767649 био је повезан са *PTC* стадијумом ( $p = 0,035$ ) и калцификацијама ( $p = 0,049$ ). Старост, пол, Хашимотов тироидитис, ЕТЕ и Т класификација тумора нису били повезани са истраживаним полиморфизмима.

Каплан-Мајерова метода је коришћена за процену преживљавања без прогресије болести код болесника са *PTC*. Поређење појединачних генотипова показало је да је полиморфизам *HOTAIR* rs920778 повезан са нижим PFS,  $p = 0,029$ , Слика 9. Варијантни ТТ генотип полиморфизма *HOTAIR* rs920778 имао је значајно нижи PFS у поређењу са комбинованим СС и СТ носиоцима,  $p = 0,010$ , Слика 9.



**Слика 9.** Каплан-Мајерове ове криве преживљавања без прогресије болести (PFS) болесника са *PTC* за полиморфизмом *HOTAIR* rs920778 (а) PFS криве за СС, СТ и ТТ генотипове *HOTAIR* rs920778 полиморфизма (б) PFS криве за носиоце С алела полиморфизма *HOTAIR* rs920778 (СС + СТ генотипови vs. ТТ генотип);  $p$  вредности су израчунате према *log-rank* тесту

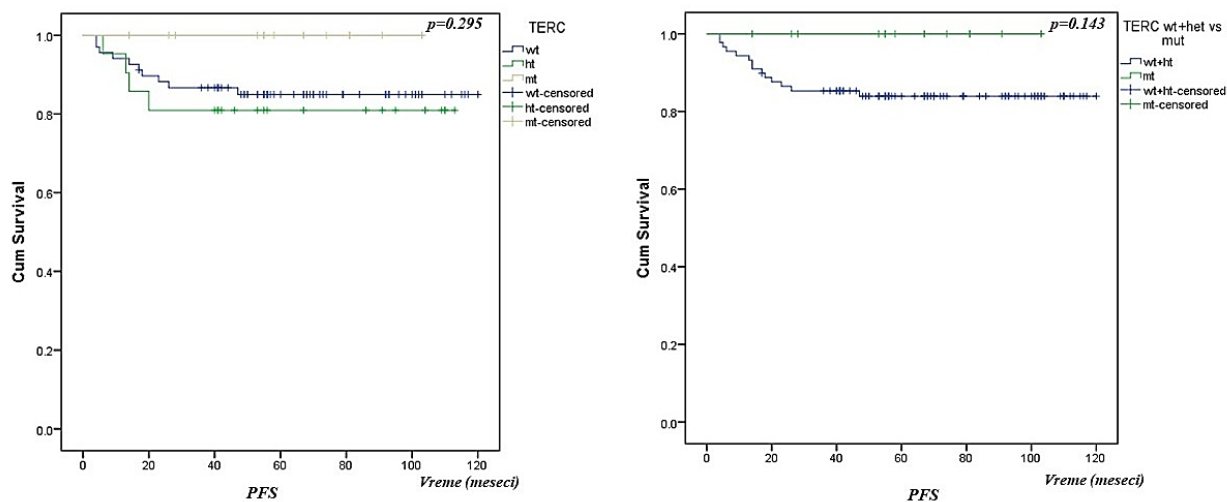
Каплан-Мајерова анализа за процену преживљавања без прогресије болести код болесника са *PTC* за за полиморфизам MIR155HG rs1893650 није показала значајну повезаност са PFS, Сlike 9.



**Слика 10.** Каплан-Мајерове криве преживљавања без прогресије болести (PFS) болесника са *PTC* за полиморфизам MIR155HG rs1893650 (а) PFS криве за wt, ht и mt генотипове полиморфизама (б) PFS криве за носиоце изворног алела (wt+ht) вс. мутирани генотип (mt). *p* вредности су израчунате према *log-rank* тесту

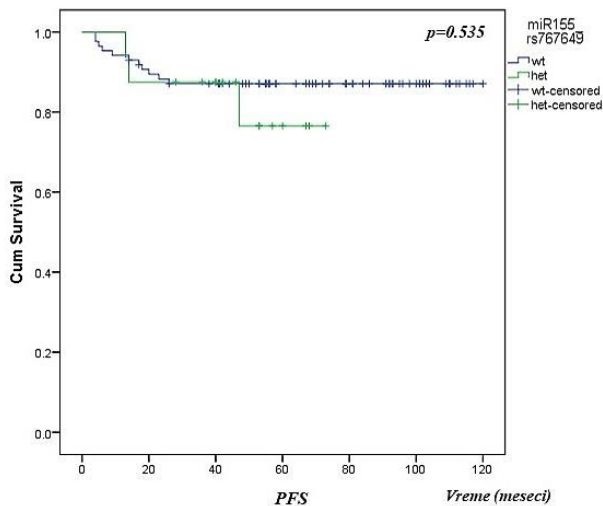
Каплан-Мајерова анализа за анализу преживљавања без прогресије болести код болесника са *PTC* за за полиморфизам TERC rs10936599 није показала значајну повезаност са PFS, Сlike 10.



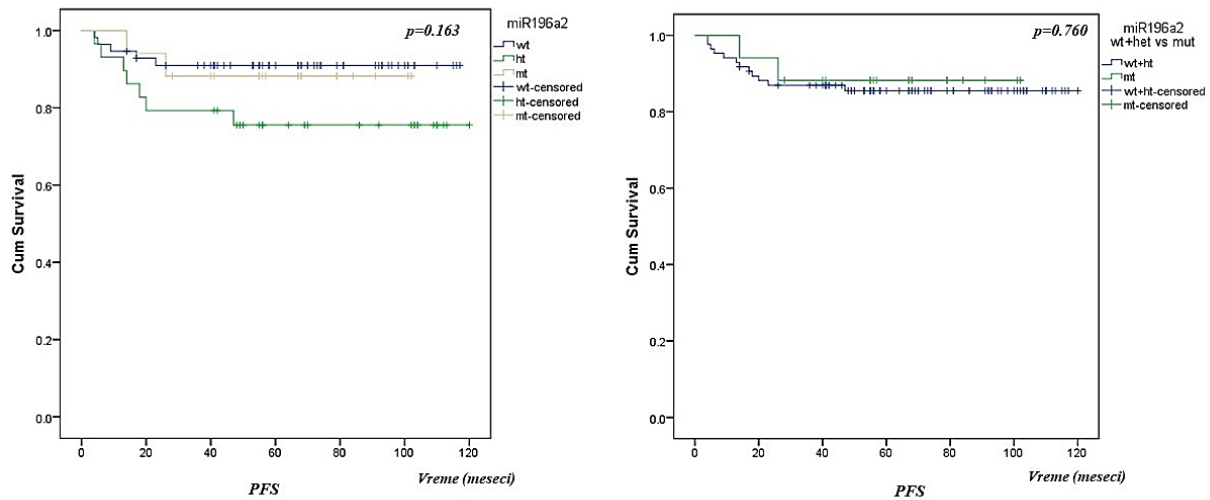


**Слика 11.** Каплан-Мајерове криве преживљавања без прогресије болести (PFS) болесника са *PTC* за полиморфизам *TERC* rs10936599 (а) PFS криве за wt, ht и mt генотипове полиморфизама (б) PFS криве за носиоце изворног алела (wt+ht) вс. мутирани генотип (mt). *p* вредности су израчунате према *log-rank* тесту

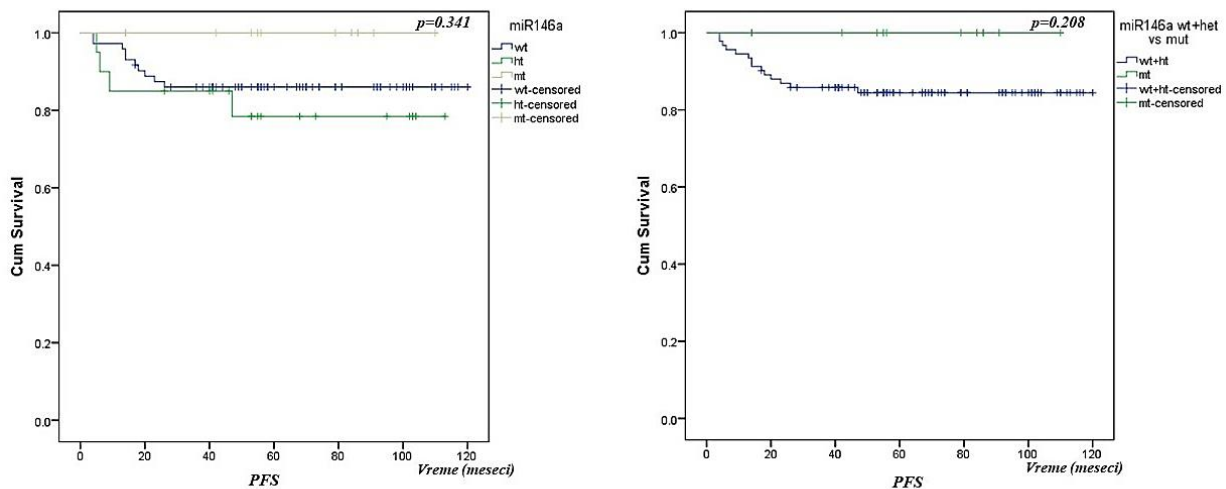
Каплан-Мајерове криве преживљавања без прогресије болести код болесника са *PTC* за за полиморфизме miR-155 rs767649, miR-196a2 rs11614913 и miR-146a rs2910164 нису показале значајну повезаност са PFS, Сlike 12-14.



**Слика 12.** Каплан-Мејрове криве преживљавања без прогресије болести (PFS) болесника са *PTC* за полиморфизам miR-155 rs767649. PFS криве за wt и ht генотипове полиморфизама. *p* вредности су израчунате према *log-rank* тесту



**Слика 13.** Каплан-Мајерове криве преживљавања без прогресије болести (PFS) болесника са *PTC* за полиморфизам miR-196a2 rs11614913 (а) PFS криве за wt, ht и mt генотипове полиморфизама (б) PFS криве за носиоце изворног алела (wt+ht) вс. мутирани генотип (mt).  $p$  вредности су израчунате према *log-rank* тесту



**Слика 14.** Каплан-Мајерове криве преживљавања без прогресије болести (PFS) болесника са *PTC* за полиморфизам miR-146a rs2910164 (а) PFS криве за wt, ht и mt генотипове полиморфизама (б) PFS криве за носиоце изворног алела (wt+ht) вс. мутирани генотип (mt).  $p$  вредности су израчунате према *log-rank* тесту

Релевантни прогностички фактори су испитани у Сох-овој логистичкој регресионој анализи као потенцијални предиктори преживљавања без прогресије болести (PFS) код болесника са *PTC*, Табела 7.

**Табела 7.** Анализа различитих прогностичких фактора у односу на преживљавање без прогресије (PFS), према Коксовој пропорционалној регресионој анализи односа опасности

Коксова регресиона анализа	Варијабле	<b>ПРЕЖИВЉАВАЊЕ БЕЗ ПРОГРЕСИЈЕ БОЛЕСТИ (PFS)</b>		
		<b>HR</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>P</b>
<b>УНИВАРИЈАНТНА АНАЛИЗА</b>	Године (55 год.)	1,068	[0,357-3,188]	0,907
	Пол	0,412	[0,144-1,175]	0,097
	Хашимотов тироидитис	0,466	[0,146-1,486]	0,197
	Мултифокалност	3,719	[0,486-28,427]	0,206
	ЕТЕ	4,099	[1,420-11,831]	<b>0,009</b>
	Васкуларна инвазија	1,768	[0,592-5,279]	0,308
	АТА ризик	11,994	[4,176-34,448]	<b>0,000004</b>
	T	1,482	[0,799-2,751]	0,212
	N	2,565	[1,107-5,941]	<b>0,028</b>
	Стадијум	2,405	[1,206-4,798]	<b>0,013</b>
	Калцификације	0,368	[0,082-1,644]	0,190
	NOTAIR rs920778	2,467	[1,195-5,094]	<b>0,015</b>
	TERC rs10936599	0,649	[0,263-1,601]	0,348
	MI155HG rs1893650	1,607	[0,794-3,253]	0,187
	miR-155 rs767649	1,474	[0,411-5,289]	0,552
	miR-196a2 rs11614913	1,286	[0,673-2,458]	0,446
miR-146a rs2910164	0,755	[0,305-1,873]	0,544	
<b>МУЛТИВАРИЈАНТНА АНАЛИЗА</b>	АТА ризик	14,210	[4,589-43,999]	<b>0,000004</b>
	NOTAIR rs920778	2,811	[1,275-6,197]	<b>0,010</b>

HR означава однос опасности (енгл. *hazard ratio*); CI, интервал поверења;  $p < 0,05$  су наглашене болдовањем

Сох-ова униваријантна логистичка регресиона анализа показала је значајну повезаност односа опасности (енгл. *hazard risk*, HR) са ETE (HR = 4,099,  $p = 0,009$ ), АТА ризиком (HR = 11,994,  $p = 0,000004$ ), појавом метастаза у лимфним чворовима (HR = 2,565,  $p = 0,028$ ), стадијумом тумора (HR = 2,405,  $p = 0,013$ ) и НОТАИР полиморфизмом rs920778 (HR = 2,467,  $p = 0,015$ ), који су се издвојили као значајни прогностички индикатори, Табела 7.

Варијабле за које је утврђено да су статистички значајне у униваријатној анализи, укључујући и оне са нивоом значајности мањим од 10%, су затим истовремено евалуиране у мултиваријантној анализи. Мултиваријантна Сох-ова регресиона анализа је показала да су се АТА ризик (HR = 14,210,  $p = 0,000004$ ) и НОТАИР полиморфизам rs920778 (HR = 2,811,  $p = 0,010$ ) издвојили као значајни и независни прогностички фактори за преживљавање без прогресије болести код болесника са *PTC*. Испитани полиморфизми у осталим генима нису имале статистички значајан утицај на ризик, Табела 7.

Однос ризика прилагођен старости и полу, могућим збуњујућим варијаблама, открио је да је НОТАИР rs920778 повезан са предиспозицијом појаве *PTC* у адитивном моделу, OR = 1,497,  $p = 0,021$ , Табела 8. Варијанта ТТ генотип НОТАИР rs920778 значајно повећава ризик од SNP-а *PTC* у поређењу са СС генотипом, OR = 2,466,  $p = 0,012$ . Уочен је повећан ризик за ТТ генотип НОТАИР rs920778 у рецесивном моделу у поређењу са комбинованим носиоцима С алела (комбиновани СС+СТ генотип), OR = 2.512,  $p = 0,006$ , Табела 8.

Полиморфизам MIR155HG rs1893650 био је значајно повезан са смањеним ризиком од *PTC* у адитивном моделу (OR=0,610,  $p=0,029$ ) и у прекомерно доминантном моделу (OR = 0,268,  $p = 0,00007$ ), што указује да је хетерозигот ТС генотип може утицати на смањење ризика од *PTC*. Полиморфизам гена TERC у испитиваној групи болесника са *PTC* нису показале корелацију са ризиком од појаве овог карцинома ни у једном моделу, Табела 8.

**Табела 8.** Повезаност анализираних полиморфизама у генима за некодирајуће РНК HOTAIR, MIR155HG и TERC са ризиком за појаву PTC

Ген/SNP	Генотип	Контроле		PTC		Прилагођен OR*, [95% CI]	p
		N=10 6	%	N=10 2	%		
HOTAIR rs920778	CC	51	48.11	40	39.22	1	Ref.
	CT	37	34,91	27	26,47	0,956 [0,499-1,832]	0.892
	TT	18	16,98	35	34,31	2,466 [1,219-4,990]	<b>0,012</b>
	Адитивни модел					1,497 [1,063-2,110]	<b>0,021</b>
	Рецесивни модел - mt vs. wt+ht (Ref.)					2,512 [1,306-4,829]	<b>0,006</b>
	Доминантни модел - wt vs. ht+mt (Ref.)					0,684 [0,393-1,190]	0,179
	Прекомерно доминантни модел - ht vs. wt+mt (Ref.)					0,693 [0,380-1,261]	0,230
MIR155HG rs1893650	TT	53	50,00	75	73,53	1	Ref.
	TC	46	43,40	17	16,67	0,268 [0,139-0,520]	<b>0,00009</b>
	CC	7	6,60	10	9,80	1,013 [0,361-2,846]	0.980
	Адитивни модел					0,610 [0,392-0,951]	<b>0,029</b>
	Рецесивни модел - mt vs. wt+ht (Ref.)					1,841 [0,639-5,304]	0,258
	Доминантни модел - wt vs. ht+mt (Ref.)					1,921 [0,665-5,546]	0,228
	Прекомерно доминантни модел - ht vs. wt+mt (Ref.)					0,268 [0,140-0,513]	<b>0,00007</b>
TERC rs10936599	CC	65	61,32	68	66,67	1	Ref.
	CT	33	31,13	21	20,59	0,586 [0,304-1,129]	0.110
	TT	8	7,55	13	12,75	1,666 [0,636-4,362]	0.299
	Адитивни модел					1,005 [0,670-1,510]	0,979
	Рецесивни модел - mt vs. wt+ht (Ref.)					1,345 [0,844-2,142]	0,212
	Доминантни модел - wt vs. ht+mt (Ref.)					1,234 [0,693-2,197]	0,476
	Прекомерно доминантни модел – ht vs. wt+mt (Ref.)					0,584 [0,308-1,108]	0,100

Испитиване варијанте полиморфизама гена miR-146a, miR-155 и miR-196a2 нису показале корелацију са ризиком од појеве *PTC* у генетичким моделима, Табела 9.

**Табела 9.** Повезаност анализираних полиморфизама у генима за микро РНК miR-155, miR-196a2 и miR-146a са ризиком за појаву *PTC*.

Ген/SNP	Генотип	Контроле		<i>PTC</i>		Прилагођен OR*, [95% CI]	<i>p</i>
		N=10 6	%	N=10 2	%		
miR-155 rs767649	ТТ	95	89,62	86	84,31	<i>I</i>	<i>Ref.</i>
	ТА	11	10,38	16	15,69	1,655 [0,718-3,813]	0,237
	Адитивни модел					1,578 [0,688-3,618]	0,282
miR-196a2 rs1161491 3	СС	55	51,89	56	54,90	<i>I</i>	<i>Ref.</i>
	СТ	41	38,68	29	28,43	0,760 [0,411-1,405]	0,381
	ТТ	10	9,43	17	16,67	1,663 [0,687-4,025]	0,260
	Адитивни модел					1,115 [0,756-1,645]	0,582
	Рецесивни модел - mt vs. wt+ht ( <i>Ref.</i> )					1,404 [0,923-2,137]	0,113
	Доминантни модел - wt vs. ht+mt ( <i>Ref.</i> )					1,845 [0,785-4,334]	0,160
	Прекомерно доминантни модел – ht vs. wt+mt ( <i>Ref.</i> )					0,646 [0,359-1,160]	0,143
miR-146a rs2910164	GG	72	67,92	72	70,59	<i>I</i>	<i>Ref.</i>
	GC	27	25,47	20	19,61	0,817 [0,415-1,609]	0,558
	CC	7	6,60	10	9,80	1,329 [0,471-3,747]	0,591
	Адитивни модел					1,001 [0,650-1,540]	0,997
	Рецесивни модел - mt vs. wt+ht <i>Ref.</i>					1,178 [0,649-2,137]	0,591
	Доминантни модел - wt vs. ht+mt ( <i>Ref.</i> )					1,391 [0,498-3,881]	0,529
	Прекомерно доминантни модел – ht vs. wt+mt ( <i>Ref.</i> )					0,664 [0,340-1,297]	0,231

Функционална анализа коришћењем *HaploReg v4.1*, платформе за проучавање стања хроматина и промена регулаторних мотива, открила је да истраживани полиморфизми могу довести до промена хистона који се доводе у везу са „појачивачима“ експресије или енхенсерима (енгл. *enhancer*), као и да доводе до промена мотива које могу довести до алел-специфичног везивања транскрипционих фактора. Тако HOTAIR rs920778 може довести до промене мотива за потенцијално везивање DMRT4, DMRT5, THAP1 транскрипционих

фактора, а MIR155HG rs1893650 може довести до промене мотива за потенцијално везивање AP-2, Rad21, SMC3, Табела 10.

**Табела 10.** Функционална анализа истраживаних полиморфизама коришћењем *HaploReg v4.1* платформе

Ген	rs број	Регион	HaploReg v4.2 предвиђање	
			Енхенсерски маркери хистона	Промене мотива
<b>HOTAIR</b>	<i>rs920778</i>	енхенсер у интрону	+	DMRT4, DMRT5, THAP1
<b>MIR155HG</b>	<i>rs1893650</i>	интрон	+	AP-2, Rad21, SMC3
<b>TERC</b>	<i>rs10936599</i>	интрон	-	Eomes, NRSF, Zfp691
<b>miR-155</b>	<i>rs767649</i>	промотор	+	Irf, Mrg1, Ноха9, PRDM1
<b>miR-196a2</b>	<i>rs11614913</i>	3' UTR	+	HMG-IY
<b>miR-146a</b>	<i>rs2910164</i>	промотор	+	-

Анализа података глобалне базе експресије тумора TCGA (енгл. *The Cancer Genome Atlas*) за некодирајућих РНК код карцинома штитасте жлезде преко TANRIC платформе је открила да је експресија HOTAIR повезана са стадијумом тумора ( $p = 0,019$ ) и преживљавањем ( $p = 0,028$ ). TANRIC анализа експресије MIR155HG је показала тренд ка повезаности са стадијумом болести ( $p = 0,081$ ), док експресија TERC није била повезана са клиничко-патолошким карактеристикама карцинома штитасте жлезде у подацима TCGA.

## ДИСКУСИЈА

Папиларни карцином штитасте жлезде је најчешћи тип ендокриног малигног тумора и карактерише га повољан прогностички исход. Међутим, последњих деценија примећен је значајан пораст инциденце овог карцинома (94), због чега је дијагностика и лечење *PTC* предмет интересовања научника различитих профила. Нажалост око 10% болесника са *PTC* има агресивну форму тумора са неповољним клиничким исходом (95). Управо агресивнији типови *PTC* захтевају боље разјашњење молекуларне основе ове болести. Резултати многих досадашњих студија показују повезаност појединих клиничко-патолошких фактора са појавом метастаза у ЛН и рецидивом *PTC*. Клиничко-патолошки фактори који утичу на појаву рецидива *PTC* су: мушки пол, старост (млађи од 45 година), агресивнија форма тумора, величина тумора (већи од 2 cm), ЕТЕ и удаљене метастазе. Због тога студије стратификације ризика биолошког понашања *PTC* имају за циљ да омогуће одговарајући тип хируршког и постоперативног лечења (96). На појаву рецидива *PTC* може утицати и неспровођење постоперативне терапије RAI. Високим процентом болесника који су примили RAI можемо објаснити релативно ниску стопу рецидива болести у нашој студији.

Биолошка специфичност тироцита се испољава кроз висок степен диференцијације и низак пролиферативни потенцијал. Ове ћелије показују највећу пролиферативну активност у периоду развоја штитасте жлезде који траје до адолесцентног доба. Највећи број мутација гена настаје у току деобе ћелије, а повећан број митоза у периоду раста и развоја штитасте жлезде, чиме се објашњавају чешће генетске модификације по типу тачкастих мутација у млађем живитном добу (97). Због тога и већина спорадичних *PTC* настаје у детињству и млађем добу, након чега је учесталост константна. У нашој студији је број оболелих од *PTC* млађих од 55 година скоро два пута већи у односу на старију популацију, што је у складу са резултатима других, раније рађених студија.



Без обзира што су аутоимунски тиреоидитис типа ХТ и *PTC* последњих деценија доста испитивани, још увек нема јсног патогенетског објашњења које би повезало ове две примарне болести ШЖ. Закључци већег броја студија су да постојање ХТ има протективан утицај на болеснике са *PTC*. Код ових болесника је инциденца ЕТЕ и метастаза у ЛН значајно мања, а и сами тумори су мањих диманзија (98). Неколико студија је истраживало патофизиолошку повезаност између ХТ и *PTC*. Раније је поменуто да је најчешћа мутација код *PTC* <sup>V600E</sup> BRAF муатција. Насупрот томе, уочено је да је код болесника са ХТ који имају *PTC* испољавање BRAF мутације ретко, што би могло да укаже на потенцијално протективну улогу ХТ (99). Без обзира на то што је у више студија потврђена мултифокалност *PTC* на терену ХТ, није доказано његово агресивно понашање, што упућује на одсуство улоге BRAF мутације у карциногенези ових тумора и протективну улогу ХТ (100). Могућ утицај на протективну улогу ХТ има и хронична инфламација и цитотоксичне Т-ћелије које секретују интерлеукин-1 који смањује величину *PTC* и спречава ширење у ЛН (101). Чешћа појава мултифокалног раста *PTC* у склопу већ постојећег ХТ је разлог због чега код ових болесника ипак треба разматрати тоталну тиреоидектомију као вид хируршког лечења. До сада је једна студија испитивала повезаност полиморфизма у гену за НОТАИР rs920778 са аутоимунским болестима штитасте жлезде ( ХТ и ГБ). Ова студија је показала да присуство полиморфизма у гену за НОТАИР rs920778 смањује ризик од ХТ (102). У нашој студији нисмо доказали повезаност ХТ за истраживаним генским полиморфизмима, као ни статистички значајну корелацију између ХТ и других клиничко-патолошких параметара. Релативно низак проценат болесника који је имао метастазе у ЛН је у складу са резултатима других студија.

Бројне студије су испитивале утицај мултифокалног испољавања *PTC* на исход болести. Без обзира што је мултифокалност *PTC* често присутна, повезаност са клиничко-патолошким факторима и њен прогностички значај још увек нису сасвим јасни, а резултати многих студија су контроверзни. Једна од скоријих ретроспективних студија је показала да *PTC* са микроскопским фокусима није фактор ризика за болеснике којима није урађена тотална тиреоидектомија уколико је *PTC* у категорији ниског ризика (103). Ипак, неке студије сматрају да је мултифокалан *PTC* повезан са већим ризиком од појаве рецидива у односу на унифокалне *PTC*, јер је чешће у узнатредовалом стадијуму болести са присутним метастазама у централне и латералне ЛН (104). Литературни подаци указују на широк

распон инциденце мултифокалности код *PTC* од 18-87% (105). Пораст инциденце мултифокалности последњих година може бити резултат морфолошких промена које се дешавају у самом *PTC*, али и значајног напретка у дијагностичком и терапијском приступу. У нашој групи болесника је скоро 3,5 пута више њих имало мултифокалну испољеност у односу на оне са унифокалним *PTC*, што је више у односу на многе друге студије. Овакав резултат можемо објаснити детаљном обрадом ткива и искуством патолога да детектује најмање туморске фокусе који су често субмилиметарских димензија.

Присуство калцификација у *PTC* није ретка појава. Значај калцификација као параметра агресивности тумора и присуства метастаза је испитиван у неколико студија, али без децидираног закључка (106). Међутим, постоје и студије које сугеришу да су метастазе у ЛН чешће код болесника са *PTC* и присутним калцификацијама, указујући и да је величина калцификата у позитивној корелацији са присутним метастазама у ЛН (107). У нашој студији је око 2,4 пута мање болесника имало присутне калцификације у *PTC*. Овакав налаз је у складу са резултатима осталих студијама.

Бројне студије су показале важну улогу некодирајућих РНК, посебно lncRNA и микро РНК, у настанку и развоју различитих тумора, укључујући и *PTC* (108). Некодирајуће РНК имају значајну улогу у различитим ћелијским процесима код карцинома, укључујући пролиферацију, апоптозу и метастазе (60). Истраживања о полиморфизмима гена ncRNA још се увек спроводе, тако да њихова повезаност са ризиком за настанак карцинома, прогнозом или клиничким исходима није у потпуности разјашњена. До сада је ограничен број студија испитивао полиморфизме lncRNA и микро РНК код болесника са *PTC* (88–91) док прикупљени докази о другим малигнитетима сугеришу да они могу бити потенцијални биомаркери за настанак болести, дијагнозе и прогнозе.

Наша студија је показала да НОТАИР rs920778 полиморфизам значајно доприноси повећању предиспозиције за *PTC*. С тим у вези, приметили смо значајну повезаност алела Т-варијанте НОТАИР rs920778 са метастазама у лимфним чворовима, рецидивом тумора и преживљавањем без прогресије. Мултиваријантна Коксова регресиона анализа је показала да почетна АТА класификација ризика и НОТАИР rs920778 полиморфизам независно предвиђају рецидив *PTC*. Осим тога, открили смо нову асоцијацију полиморфизма rs1893650 у гену lncRNA MIR155HG са смањеним *PTC* ризиком и показали да овај

полиморфизам смањује ризик од *PTC* под прекомерно доминантним моделом, што указује да би ТС носиоци као хетерозиготи могли да буду заштићени од *PTC*.

Наши резултати сугеришу да је ТТ генотип полиморфизма HOTAIR rs920778 предиспонирајући фактор за *PTC*, што је у складу са претходним истраживањима за *PTC* у кинеској популацији Хан (91). Поред тога, алел HOTAIR rs920778 Т-доприноси повећаном ризику од карцинома главе и врата езофагеалног порекла (90), карцинома дојке у кинеској (109) и иранској популацији (110), као и карцинома желуца (111) и колоректалног карцинома (112). Такође је неколико мета-анализа показало да варијанта HOTAIR rs920778 повећава укупан ризик од карцинома (113,114).

Резултати нашег рада показују да носиоци HOTAIR rs920778 ТТ генотипа имају већу инциденцу метастаза у лимфним чворовима, веће стопе рецидива тумора и ниже преживљавање без прогресије и у складу су са претходним студијама које повезују овај полиморфизам са прогресијом вишеструких карцинома. ТТ генотип HOTAIR rs920778 и носиоци варијанте Т-алела су значајно повезани са узнапредовалим стадијумом тумора, метастазама у лимфним чворовима и ниском стопом преживљавања код карцинома јажника (115). Исти полиморфизам је повезан са агресивнијом патохистолошком сликом, величином тумора, узнапредовалим стадијумом и удаљеним метастазама код карцинома дојке (116). Такође, полиморфизам HOTAIR rs920778 је повезан са краћим преживљавањем без прогресије код болесника са поменутиим карциномом као и морталитетом од колоректалног карцинома (112). У релевантним истраживањима Занга и сарадника (*Zhang et al.*) наилазимо на објашњење овог полиморфизма којим је показано да се HOTAIR rs920778 налази у појачивачу интрона 2 и да алел Т-варијанте повећава експресију HOTAIR. (90)

Функционална релевантност и онкогени потенцијал HOTAIR rs920778 полиморфизма су демонстрирани и *in vivo* и *in vitro* у *PTC*. Генетска варијанта rs920778 има алел-специфичан ефекат на експресију, при чему особе са СТ или ТТ генотипом rs920778 имају значајно већу експресију HOTAIR у нормалним и *PTC* ткивима у односу на особе са *divљим* типом СС генотипова (91). Поред тога, наша анализа *HaploReg v4.1* потврдила је да је HOTAIR rs920778 повезан са појачивачима хистонских ознака и такође је предвидела промене мотива које би потенцијално могле да утичу на везивање транскрипционог фактора ТНР1 (енгл. *Thanatos associated protein 1*) претходно повезан са *PTC* (117). Поред мотива

везивања и промена појачивача, полиморфизми у гену HOTAIR могу потенцијално довести до промена у секундарној структури и конформацији ове lncRNA које утичу на њену алостеријску интеракцију са различитим протеинима.

Онкогени потенцијал HOTAIR у различитим процесима повезаним са тумором лежи у његовој јединственој улози епигенетског главног регулатора, који делује на транскрипциону и посттранскрипциону регулацију експресије циљног гена, утичући на пролиферацију, миграцију, ЕМТ, и инвазија ћелија карцинома (62). HOTAIR обезбеђује различита места везивања за састављање ензима за модификацију хистона, са 5' доменом HOTAIR (1–300 нт) везујући PRC2 док 3' домен (150 0 до 2146 нт) везује LCD1. Делујући као молекуларна „скела”, HOTAIR премошћује PRC2 и LCD1/CoREST/REST комплексе и регрутује их у промоторске регионе удаљених гена супресора тумора и супресора метастаза (64). Осим тога, HOTAIR служи као конкурентска ендогена РНК неутралишући микро РНК као молекуларни „сунђер“ (118,119), модулирајући на тај начин дерепресију микро РНК циљева и обезбеђујући сложену унакрсну интеракцију између појачано регулисаних HOTAIR-а и различитих микро РНК. Висока експресија HOTAIR промовише регрутовање макрофага и мијелоидних супресорских ћелија у туморско микроокружење кроз лучење цитокина и/или хемокина од стране хепатоцелуларних туморских ћелија (49,120).

Поред тога, HOTAIR стимулише лучење егзозома (121), екстрацелуларних везикула који делују као паракрини ефектори и посредују у комуникацији између ћелија транспортом активних биомолекула као што су протеини, липиди и ncРНК. Показало се да егзосомални HOTAIR индукује поларизацију макрофага M2 кроз активацију PI3K/AKT сигналног пута, чиме се промовише ЕМТ и метастазе ћелија карцинома ларинкса (122). Убедљиви докази сугеришу да аберантно изражен HOTAIR игра улогу у прогресији карцинома штитасте жлезде. Неколико недавних студија анализе генома (енгл. *Genome-Wide Association, GWAS*) и ddPCR (енгл. *Droplet Digital PCR Applications Guide*) показује да је аберантна експресија HOTAIR повезана са клиничко-патолошким карактеристикама *PTC* као што су метастазе у лимфним чворовима, стадијум тумора и одговор на терапију. (61,123) Висока експресија HOTAIR је повезана са ниском стопом преживљавања болесника са *PTC* у клиничким узорцима и подацима TCGA (124,125), што указује на потенцијалну онкогену улогу ове lncРНК у *PTC* и повезаност са прогресијом самог карцинома. Експресија HOTAIR је значајно већа у серуму болесника са *PTC* који имају метастазе у лимфним чворовима врата

него код болесника без присутних секундарних депозита (63). У комбинацији са галектином-3 (енгл. *Galectin-3*), висока серумска експресија HOTAIR указује на *PTC* у вишем сстадијуму болести (59). HOTAIR је такође прекомерно изражен у ткиву *PTC* у поређењу са узорцима штитасте жлезде без карцинома (91,123), на основу чега се могу разликовати бенигне тироидне промене од *PTC* (58,59,61,126). Прекомерна експресија HOTAIR индукује пролиферацију, инвазију и миграцију *PTC* ћелија неутралишући miR-488 као молекуларни „сунђер“ (119). HOTAIR доводи до пролиферације туморских ћелија *PTC* и инхибиције апоптозе у њима (HTh-7, CAL-62, VCAP) утишавањем експресије протеин фосфатазне метилестеразе 1 (PPME1) путрм инхибиције miR-761, где HOTAIR има улогу конкурентске ендogene РНК (118). Експерименти *in vivo* са *PTC* ћелијама открили су да HOTAIR промовише ЕМТ, који је кључан за миграцију, инвазију и потенцијал матичних ћелија у ћелијама тумора *PTC* кроз модулацију *Wnt/catenin* сигналног пута (63). Прекомерна експресија HOTAIR-а утиче на преживљавање *in vivo* у моделу тумора ксенографта са HTh7 ћелијама карцинома штитасте жлезде код *nude* мишева (118). Ова сазнања указују на онкогену улогу HOTAIR у кључним сигналним путевима неопходним за неопластичну трансформацију, као и у одређивању патохистолошких карактеристика *PTC*.

До сада је само неколико студија потврдило повезаност полиморфизама MIR155HG са ризиком од *PTC* и његовом прогнозом. Колико је нама познато, наша студија пружа први извештај о томе да полиморфизам MIR155HG rs1893650 може бити протективни фактор у *PTC*. Раније је утврђено да MIR155HG rs1893650 значајно смањује ризик од карцинома јетре у рецесивном моделу (127), али и да повећава ризик од карцинома желуца (128) и колоректалног карцинома (129). Ипак, све претходне студије су спроведене на кинеској популацији Хан, која има значајну популацијску и генетску различитост у поређењу са нашом популацијом.

Полиморфизам MIR155HG rs1893650 налази се у интрону MIR155HG локуса и његов функционални значај још увек није утврђен. Због двоструке функције локуса MIR155HG који кодира и miR-155 и lncRNA MIR155HG, генетска варијација гена MIR155HG може потенцијално имати утицај на транскрипцију обе ncРНК. Генетске варијације у мотивима везивања и HOTAIR и MIR155HG, који функционишу као молекуларни матрикс могу ометати њихову интеракцију са протеинима који мењају стање хроматина или контролишу транскрипцију. Да бисмо ово истражили, проценили смо

*HaploReg v4.1* (130), који је предвидео да је MIR155HG rs1893650 повезан са појачивачима енхенсерима хистонских ознака и променама мотива које би потенцијално могле да утичу на везивање фактора транскрипције и протеина који су претходно били повезани са *PTC*, као што је AP-2 (131,132). И док су основна улога MIR155HG и његова експресија у *PTC* и даље нејасни, недавне студије показују да MIR155HG делује као онкоген у неколико типова карцинома (67–69). Подаци о експресији гена TCGA и GTEx показали су да је MIR155HG прекомерно експримиран у различитим туморима, као и да је висока експресија MIR155HG снажно повезана са бољим преживљавањем код холангиокарцинома, аденокарцинома плућа и меланома коже, док је његова прекомерна експресија повезана са ниском стопом преживљавања код глиобластома и увеалног меланом (68). MIR155HG је такође повезан са лошом прогнозом и прогресијом глиома (69) и карцинома панкреаса (133). Нижа експресија MIR155HG у туморском ткиву колоректалног карцинома је у корелацији са краћим укупним преживљавањем и преживљавањем без болести (134). Прекомерна експресија MIR155HG је присутна и у карциному ларинкса и повезана је са метастазама у лимфним чворовима и унапредовалим стадијумом тумора (67).

Транскрипција MIR155HG је регулисана вишеструким факторима транскрипције, укључујући NF- $\kappa$ B. MIR155HG је директан циљни ген NF- $\kappa$ B, чија индукција повећава експресију miR-155 код хематопоетских малигитета (70). Прекомерна експресија MIR155HG услољава пролиферацију карцинома желуца, миграцију и хеморезистенцију преко NF- $\kappa$ B и JAK/STAT3 (енгл. *The Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) (*претварач сигнала и активатор транскрипције 3*) сигналних путева (135). Поред тога MIR155HG и miR-155-5p се појачавају индукцијом трансформишућег фактора раста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), чиме се подстиче прогресију и ЕМТ карцинома сквамозних ћелија ларинкса (67).

Могући молекуларни механизми деловања MIR155HG који би могли бити под утицајем генетских полиморфизама укључују и инхибицију преко компетитивног везивања за микро РНК (енгл. *sponging*). MIR155HG је укључен у снижавање miR-155 преко компетитивног везивања за њу, што утиче на пролиферацију ЕМТ и инвазију глиома (69) и карцинома јајника (136). MIR155HG индукује пролиферацију, миграцију и инвазију у карциному плућа смањујући експресију p53 преко miR-155 (137). Смањење експресије

MIR155HG значајно инхибира раст и условљава апоптозу у ћелијама карцинома панкреаса кроз неутралишући miR-802 као молекуларни „сунђер“ (133).

MIR155HG има есенцијалну улогу у регулисању урођеног имунитета, која превазилази улогу прекурсора у синтези miR-155. На две групе *knockout* мишева, једној којој недостаје већина MIR155HG секвенци и другој без основне miRNA-155 секвенце доказано је да MIR155HG и miR-155 имају различите функције у имунском одговору, при чему MIR155HG делује кроз стимулисање IFN- $\gamma$ , а miR-155 делује кроз регулацију JAK/STAT1 сигналног пута (138). Док је MIR155HG директна мета NF- $\kappa$ B који промовише његову транскрипцију (70), у механизму позитивне повратне информације, MIR155HG/miR-155 осовина такође регулише активност NF- $\kappa$ B ометањем његових узводних елемената или сродних сигналних молекула и изазива инфламацију и ослобађање проинфламаторних цитокина (139).

MIR155HG има важну улогу у регулацији равнотеже M1/M2 макрофага и инфилтрације макрофага. MIR155HG условљава поларизацију M2 макрофага и прогресију тумора, а доводи и до резистенције на терапију оксалиплатином код колоректалног карцинома преко осовине miR-650/ANXA2 (140). Супротно томе, цитокини у хроничном опструктивном обољењу плућа MIR155HG стимулишу M1 поларизацију макрофага и ослобађање проинфламаторних цитокина, док *knockdown* MIR155HG стимулише M2 поларизацију макрофага (141), сугеришући на диференцијалну улогу MIR155HG у хроничној инфламацији и антитуморском имунском одговору. Поред тога, експресија MIR155HG значајно корелира са количином инфилтрирних имунских ћелија и нивоима молекула имунских контролних тачака као што су протеин програмиране ћелијске смрти 1 (PD-1), PD-1 лиганд 1 (PDL-1) и антиген 4 цитотоксични Т-лимфоцити повезани (STLA4) код различитих типова карцинома (68). MIR155HG би могао да утиче на молекуле имунских контролних тачака преко miR-155, који потискује PD-L1, ремети PD-L1/PD-1 осовину и одржава антитуморске одговоре Т-ћелија, потенцијално утичући на резистенцију на имунотерапију карцинома (77). Показано је да липополисахарид (LPS) олакшава избегавање имунског одговора у ћелијама хепатоцелуларног карцинома путем епигенеичке модификације MIR155HG како би се индуковала експресија PD-L1 (142). Стога, варијанте гена HOTAIR и MIR155HG могу утицати на њихову улогу у регулисању равнотеже

макрофага M1/M2, као и на инфилтрацију имунских ћелија у микроокружење тумора и експресију молекула имунских контролних тачака.

Према нашим сазнањима, полиморфизми у гену miR-155 нису претходно испитивани у *PTC*. Наши резултати показују повезаност полиморфизма miR-155 rs767649 са *PTC* стадијумом и сугеришу на потенцијалну онкогену улогу miR-155 у *PTC*. Наши налази су у складу са претходним студијама које повезују полиморфизам miR-155 rs767649 са повећаном осетљивошћу и лошом прогнозом код карцинома плућа (143) и хепатоцелуларног карцинома (144). Полиморфизам miR-155 rs767649 има функционални утицај, а алел T доприноси већој експресији miR-155 како у хепатоцелуларном карциному тако и у нетуморском ткиву (144). Међутим, резултати наше студије се могу тумачити као потенцијално пристрасни због мале величине узорка и/или ниске фреквенције алела варијанте miR-155 rs767649.

Наши резултати нису показали потенцијалну повезаност између полиморфизама miR-146a и miR-196a са *PTC* ризиком или клиничко-патолошким карактеристикама. Неколико претходних студија је показало да је варијантни алел полиморфизма гена rs2910164 miR-146a значајно повезан са ризиком од *PTC* (88,89). Међутим, у складу са нашим резултатима, две мета-анализе су откриле да генетска варијанта miR-146a rs2910164 није повезана са предиспозицијом за појаву *PTC* у групној анализи свих популација и/или у стратификованој анализи за кавказоиде или Азијате (88,145).

Потребне су даље веће и мултиетничке студије како би се у потпуности разјаснио потенцијални утицај полиморфизама HOTAIR и MIR155HG као нових биомаркера за процену ризика, раног откривања и прогнозу у *PTC*. Нови биомаркери су такође неопходни и за индивидуализован приступ у лечењу овог карцинома, као и за развој циљаних терапијских протокола за агресивније форме, али и да би се омогућио ефикаснији одабир болесника за хируршко лечење, као и тип операције, јер профилактичка дисекција вратних лимфних чворова није препоручљива и може довести до тешких компликација (146).

Полиморфизми и/или експресија некодирајућих РНК, као што су HOTAIR, MIR155HG и miR-155 би у будућности могли бити сурогат маркери за предвиђање ефикасности терапије блокарањем контролних тачака имунитета.



## ЗАКЉУЧЦИ

1. Наша студија приказује нове податке о генетичкој регулацији *PTC*, повезујући полиморфизме у lncRNA генима HOTAIR и MIR155HG са *PTC* ризиком и прогнозом.
2. Показано је да полиморфизам HOTAIR rs920778 значајно доприноси повећању предиспозиције за појаву *PTC*.
3. Полиморфизам HOTAIR rs920778 је повезан са појавом метастаза у лимфним чворовима, рецидивом тумора и преживљавањем без прогресије болести.
4. Коксова мултиваријантна регресиона анализа је открила да АТА систем стратификације ризика и полиморфизам HOTAIR rs920778 имају снажан прогностички утицај на прогресију *PTC*.
5. Наши резултати сугеришу на повезаност полиморфизма MIR155HG rs1893650, који је по први пут истраживан у *PTC*, са смањеним ризиком за појаву овог карцинома под прекомерно доминантним моделом, што указује на протективни ефекат хетерозиготног генотипа.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan;72(1):7–33.
2. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022 Mar;33(1):27–63.
3. Jung CK, Bychkov A, Kakudo K. Update from the 2022 World Health Organization Classification of Thyroid Tumors: A Standardized Diagnostic Approach. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2022 Oct;37(5):703–18.
4. Fugazzola L. Medullary thyroid cancer - An update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2023 Jan;37(1):101655.
5. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, editors. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2017. (World health organization classification of tumours).
6. Williams D. Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 2:S9-18.
7. Caudill CM, Zhu Z, Ciampi R, Stringer JR, Nikiforov YE. Dose-Dependent Generation of RET/PTC in Human Thyroid Cells after in Vitro Exposure to  $\gamma$ -Radiation: A Model of Carcinogenic Chromosomal Rearrangement Induced by Ionizing Radiation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2023 Nov 14];90(4):2364–9. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/90/4/2364/2836923>
8. Baker SR, Bhatti WA. The thyroid cancer epidemic: Is it the dark side of the CT revolution? *European Journal of Radiology* [Internet]. 2006 Oct [cited 2023 Nov 14];60(1):67–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0720048X06001963>
9. Hieu TT, Russell AW, Cuneo R, Clark J, Kron T, Hall P, et al. Cancer risk after medical exposure to radioactive iodine in benign thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocrine-Related Cancer* [Internet]. 2012 Oct [cited 2023 Nov 14];19(5):645–55. Available from: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/19/5/645.xml>
10. Guan H, Ji M, Bao R, Yu H, Wang Y, Hou P, et al. Association of High Iodine Intake with the T1799A BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2023 Nov 14];94(5):1612–7. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/94/5/1612/2598162>
11. O’Grady TJ, Kitahara CM, DiRienzo AG, Gates MA. The Association between Selenium and Other Micronutrients and Thyroid Cancer Incidence in the NIH-AARP Diet and Health Study. Castresana JS, editor. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Oct 20 [cited 2023 Nov 14];9(10):e110886. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0110886>
12. Kitahara CM, Platz EA, Freeman LEB, Hsing AW, Linet MS, Park Y, et al. Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Mar;20(3):464–72.
13. Rahman ST, Pandeya N, Neale RE, McLeod DSA, Bain CJ, Baade PD, et al. Obesity Is Associated with *BRAF*<sup>V600E</sup>-Mutated Thyroid Cancer. *Thyroid* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Nov 14];30(10):1518–27. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2019.0654>
14. Pazaitou-Panayiotou K, Polyzos SA, Mantzoros CS. Obesity and thyroid cancer: epidemiologic associations and underlying mechanisms. *Obesity Reviews* [Internet]. 2013 Dec [cited 2023 Nov 14];14(12):1006–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/obr.12070>

15. Schmidt JA, Allen NE, Almquist M, Franceschi S, Rinaldi S, Tipper SJ, et al. Insulin-like growth factor-i and risk of differentiated thyroid carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Jun;23(6):976–85.
16. Tseng CH. Metformin Reduces Thyroid Cancer Risk in Taiwanese Patients with Type 2 Diabetes. Akiba S, editor. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Oct 10 [cited 2023 Nov 14];9(10):e109852. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109852>
17. Luo J, Hendryx M, Manson JE, Liang X, Margolis KL. Hysterectomy, Oophorectomy, and Risk of Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2016 Oct [cited 2023 Nov 14];101(10):3812–9. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2016-2011>
18. Kitahara CM, Körmendiné Farkas D, Jørgensen JOL, Cronin-Fenton D, Sørensen HT. Benign Thyroid Diseases and Risk of Thyroid Cancer: A Nationwide Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2023 Nov 14];103(6):2216–24. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/103/6/2216/4951500>
19. Franceschi C. Inflammaging as a Major Characteristic of Old People: Can It Be Prevented or Cured? *Nutrition Reviews* [Internet]. 2007 [cited 2020 Mar 2];65(s3):S173–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00358.x>
20. Balasubramaniam S, Ron E, Gridley G, Schneider AB, Brenner AV. 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 & Metabolism* [Internet]. 2012 Aug [cited 2023 Nov 14];97(8):2661–9. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2011-2996>
21. Meinhold CL, Ron E, Schonfeld SJ, Alexander BH, Freedman DM, Linet MS, et al. Nonradiation Risk Factors for Thyroid Cancer in the US Radiologic Technologists Study. *American Journal of Epidemiology* [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2023 Nov 14];171(2):242–52. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwp354>
22. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, et al. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet* [Internet]. 2009 Apr [cited 2023 Nov 14];41(4):460–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng.339>
23. Russ G, Leboulleux S, Leenhardt L, Hegedüs L. Thyroid incidentalomas: epidemiology, risk stratification with ultrasound and workup. *Eur Thyroid J*. 2014 Sep;3(3):154–63.
24. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *JAMA* [Internet]. 2018 Mar 6 [cited 2023 Nov 14];319(9):914. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2018.0898>
25. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1–133.
26. Kim K, Kim JH, Park IS, Rho YS, Kwon GH, Lee DJ. The Updated AJCC/TNM Staging System for Papillary Thyroid Cancer (8th Edition): From the Perspective of Genomic Analysis. *World J Surg* [Internet]. 2018 Nov [cited 2023 Oct 2];42(11):3624–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-018-4662-2>
27. Takami H, Ito Y, Okamoto T, Onoda N, Noguchi H, Yoshida A. Revisiting the Guidelines Issued by the Japanese Society of Thyroid Surgeons and Japan Association of Endocrine Surgeons: A Gradual Move Towards Consensus Between Japanese and Western Practice in the Management of Thyroid Carcinoma. *World J Surg* [Internet]. 2014 Aug [cited 2023 Nov 14];38(8):2002–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-014-2498-y>

28. Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedus L, et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules - 2016 Update Appendix. *Endocrine Practice* [Internet]. 2016 May [cited 2023 Nov 14];22:1–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1530891X20429544>
29. Pacini F, Fuhrer D, Elisei R, Handkiewicz-Junak D, Leboulleux S, Luster M, et al. 2022 ETA Consensus Statement: What are the indications for post-surgical radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer? *Eur Thyroid J*. 2022 Jan 1;11(1):e210046.
30. Sak SD. Variants of papillary thyroid carcinoma: multiple faces of a familiar tumor. *TJPATH* [Internet]. 2015 [cited 2023 Nov 14]; Available from: <http://www.turkjpath.org/doi.php?doi=10.5146/tjpath.2015.01313>
31. Kovacevic B, Vucevic D, Cerovic S, Eloy C. Peripheral Versus Intraparenchymal Papillary Thyroid Microcarcinoma: Different Morphologies and PD-L1 Expression. *Head and Neck Pathol* [Internet]. 2022 Mar [cited 2023 Dec 5];16(1):200–12. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12105-021-01337-1>
32. Rezaei M, Khamaneh AM, Zarghami N, Vosoughi A, Hashemzadeh S. Evaluating pre- and post-operation plasma miRNAs of papillary thyroid carcinoma (PTC) patients in comparison to benign nodules. *BMC Cancer* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 2];19(1):690. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5849-0>
33. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Mar;13(3):184–99.
34. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 Dec 5];7(10):569–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2011.142>
35. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):676–90.
36. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS Mutations in Thyroid Cancer. *The Oncologist* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2023 Dec 5];18(8):926–32. Available from: <https://academic.oup.com/oncolo/article/18/8/926/6410278>
37. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Modern Pathology* [Internet]. 2008 May [cited 2023 Dec 5];21:S37–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0893395222023560>
38. Romei C, Elisei R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrin* [Internet]. 2012 [cited 2023 Dec 5];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2012.00054/abstract>
39. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simões M. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol*. 1998 May;185(1):71–8.
40. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes & Development* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2023 Dec 5];13(7):817–26. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.13.7.817>
41. Ting NSY. Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2005 Apr 11 [cited 2023 Dec 5];33(7):2090–8. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki342>
42. Dogan F, Forsyth NR. Telomerase Regulation: A Role for Epigenetics. *Cancers* [Internet]. 2021 Mar 10 [cited 2023 Dec 5];13(6):1213. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1213>

43. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2023 Dec 5];31(1):27–36. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgp220>
44. Jones PA, Laird PW. Cancer-epigenetics comes of age. *Nat Genet* [Internet]. 1999 Feb [cited 2023 Dec 5];21(2):163–7. Available from: [https://www.nature.com/articles/ng0299\\_163](https://www.nature.com/articles/ng0299_163)
45. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2014 Sep 9 [cited 2022 Jun 13];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2014.00049/abstract>
46. Šupić G. Epigenetika: od molekularnih mehanizama, osnovnih fizioloških procesa, do uloge u kanceru. 1. izd. Tom 2561. Beograd: Mediija centar “Odbrana”; 2023. 166 str.
47. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 Apr [cited 2022 Jun 13];8(4):a019521. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019521>
48. Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell*. 2013 Mar 14;152(6):1308–23.
49. Botti G, Scognamiglio G, Aquino G, Liguori G, Cantile M. LncRNA HOTAIR in Tumor Microenvironment: What Role? *IJMS* [Internet]. 2019 May 8 [cited 2023 Oct 2];20(9):2279. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2279>
50. Pan J, Wang R, Shang F, Ma R, Rong Y, Zhang Y. Functional Micropeptides Encoded by Long Non-Coding RNAs: A Comprehensive Review. *Front Mol Biosci*. 2022;9:817517.
51. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA Responses to Cellular Stress. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Nov 15 [cited 2022 Jun 13];66(22):10843–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-1894>
52. Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA, et al. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2022 Jun 13];717(1–2):77–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008>
53. Jovanovic MZ, Geller DA, Gajovic NM, Jurisevic MM, Arsenijevic NN, Jovanovic MM, et al. Dual blockage of PD-L/PD-1 and IL33/ST2 axes slows tumor growth and improves antitumor immunity by boosting NK cells. *Life Sci* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Jun 13];289:120214. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120214>
54. Supic G, Zeljic K, Rankov AD, Kozomara R, Nikolic A, Radojkovic D, et al. miR-183 and miR-21 expression as biomarkers of progression and survival in tongue carcinoma patients. *Clin Oral Investig*. 2018 Jan;22(1):401–9.
55. Bayraktar R, Van Roosbroeck K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2018 Mar [cited 2022 Jun 13];37(1):33–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-017-9724-7>
56. Supic G, Stefik D, Ivkovic N, Sami A, Zeljic K, Jovic S, et al. Prognostic impact of miR-34b/c DNA methylation, gene expression, and promoter polymorphism in HPV-negative oral squamous cell carcinomas. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Dec [cited 2022 Jun 13];12(1):1296. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-05399-1>
57. Hong DS, Kang YK, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY, et al. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2020 May;122(11):1630–7.

58. Kuo FC, Wang YT, Liu CH, Li YF, Lu CH, Su SC, et al. LncRNA HOTAIR impairs the prognosis of papillary thyroid cancer via regulating cellular malignancy and epigenetically suppressing DLX1. *Cancer Cell Int.* 2022 Dec 9;22(1):396.
59. Li L, Wang J, Li Z, Qiu S, Cao J, Zhao Y, et al. Diagnostic Value of Serum lncRNA HOTAIR Combined with Galectin-3 in Benign and Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2021;13:6517–25.
60. Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* [Internet]. 2016 Jan [cited 2023 Oct 2];1859(1):169–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939915001388>
61. Possieri C, Locantore P, Salis C, Bacci L, Aiello A, Fadda G, et al. Combined molecular and mathematical analysis of long noncoding RNAs expression in fine needle aspiration biopsies as novel tool for early diagnosis of thyroid cancer. *Endocrine* [Internet]. 2021 Jun [cited 2023 Oct 2];72(3):711–20. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12020-020-02508-w>
62. Tang Q, Hann SS. HOTAIR: An Oncogenic Long Non-Coding RNA in Human Cancer. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2018 [cited 2023 Oct 2];47(3):893–913. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/490131>
63. Wu L, Shi Y, Liu B, Zhao M. Expression of lncRNA-HOTAIR in the serum of patients with lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma and its impact. *Oncol Lett.* 2020 Jul;20(1):907–13.
64. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, et al. Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science* [Internet]. 2010 Aug 6 [cited 2023 Oct 2];329(5992):689–93. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1192002>
65. Wang KC, Chang HY. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* [Internet]. 2011 Sep [cited 2023 Oct 2];43(6):904–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276511006368>
66. Mahesh G, Biswas R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research* [Internet]. 2019 Jun [cited 2023 Oct 2];39(6):321–30. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2018.0155>
67. Cui W, Meng W, Zhao L, Cao H, Chi W, Wang B. TGF- $\beta$ -induced long non-coding RNA MIR155HG promotes the progression and EMT of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating the miR-155-5p/SOX10 axis. *Int J Oncol* [Internet]. 2019 Apr 12 [cited 2023 Oct 2]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2019.4784>
68. Peng L, Chen Z, Chen Y, Wang X, Tang N. *MIR155HG* is a prognostic biomarker and associated with immune infiltration and immune checkpoint molecules expression in multiple cancers. *Cancer Medicine* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 2];8(17):7161–73. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.2583>
69. Wu X, Wang Y, Yu T, Nie E, Hu Q, Wu W, et al. Blocking MIR155HG/miR-155 axis inhibits mesenchymal transition in glioma. *Neuro-Oncology* [Internet]. 2017 Sep [cited 2023 Oct 2];19(9):1195–205. Available from: <http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/9/1195/3084488/Blocking-MIR155HGmiR155-axis-inhibits-mesenchymal>
70. Thompson RC, Vardinogiannis I, Gilmore TD. Identification of an NF- $\kappa$ B p50/p65-responsive site in the human MIR155HG promoter. *BMC Molecular Biol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2023 Oct 2];14(1):24. Available from: <https://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2199-14-24>
71. Niu L, Lou F, Sun Y, Sun L, Cai X, Liu Z, et al. A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation. *Sci Adv* [Internet]. 2020 May 22 [cited 2023 Oct 2];6(21):eaaz2059. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aaz2059>

72. Liu H, Yang Y, Ge Y, Liu J, Zhao Y. TERC promotes cellular inflammatory response independent of telomerase. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2019 Sep 5 [cited 2023 Oct 2];47(15):8084–95. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/15/8084/5531183>
73. Gazzaniga FS, Blackburn EH. An antiapoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity. *Blood* [Internet]. 2014 Dec 11 [cited 2023 Oct 2];124(25):3675–84. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/124/25/3675/33611/An-antiapoptotic-role-for-telomerase-RNA-in-human>
74. Kedde M, Le Sage C, Duursma A, Zlotorynski E, Van Leeuwen B, Nijkamp W, et al. Telomerase-independent Regulation of ATR by Human Telomerase RNA. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2006 Dec [cited 2023 Oct 2];281(52):40503–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820768869>
75. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet* [Internet]. 2017 Mar [cited 2023 Oct 2];49(3):349–57. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng.3781>
76. Montero-Conde C, Leandro-García LJ, Martínez-Montes ÁM, Martínez P, Moya FJ, Letón R, et al. Comprehensive molecular analysis of immortalization hallmarks in thyroid cancer reveals new prognostic markers. *Clin Transl Med*. 2022 Aug;12(8):e1001.
77. Daveri E, Vergani E, Shahaj E, Bergamaschi L, La Magra S, Dosi M, et al. microRNAs Shape Myeloid Cell-Mediated Resistance to Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jul 22 [cited 2023 Oct 2];11:1214. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01214/full>
78. Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, Chavdoula E, HatziaPOSTOLOU M, PolyTARCHOU C, et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis. *Cell Oncol* [Internet]. 2017 Aug [cited 2023 Oct 2];40(4):303–39. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13402-017-0341-9>
79. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15;103(33):12481–6.
80. Papaioannou M, Chorti AG, Chatzikiyriakidou A, Giannoulis K, Bakkar S, Papavramidis TS. MicroRNAs in Papillary Thyroid Cancer: What Is New in Diagnosis and Treatment. *Front Oncol*. 2021;11:755097.
81. Sun M, Fang S, Li W, Li C, Wang L, Wang F, et al. Associations of miR-146a and miR-146b expression and clinical characteristics in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biomark*. 2015;15(1):33–40.
82. Lee YS, Lim YS, Lee JC, Wang SG, Park HY, Kim SY, et al. Differential expression levels of plasma-derived miR-146b and miR-155 in papillary thyroid cancer. *Oral Oncology* [Internet]. 2015 Jan [cited 2023 Oct 2];51(1):77–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837514003017>
83. Qiu Z, Li H, Wang J, Sun C. miR-146a and miR-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncology Reports* [Internet]. 2017 Nov [cited 2023 Oct 2];38(5):2735–40. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5994>
84. Zhu YZ, Zheng K, Zhang HH, Chen L, Wu KL, Ren CH, et al. [Expression of microRNA-155 in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2016 Oct 20;36(10):1364–8.
85. Fu YT, Zhang DQ, Zhou L, Li SJ, Sun H, Liu XL, et al. Has-MiR-196a-2 is up-regulated and acts as an independent unfavorable prognostic factor in thyroid carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 May;22(9):2707–14.

86. WANG X, ZHU Y, XU B, WANG J, LIU X. Identification of TLR2 and TLR4-induced microRNAs in human mesenchymal stem cells and their possible roles in regulating TLR signals. *Mol Med Rep* [Internet]. 2016 Jun [cited 2022 Dec 19];13(6):4969–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4878556/>
87. Xin H, Wang C, Liu Z. miR-196a-5p promotes metastasis of colorectal cancer via targeting IκBα. *BMC Cancer* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 2];19(1):30. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-5245-1>
88. Dong G, Zhang R, Xu J, Guo Y. Association between microRNA polymorphisms and papillary thyroid cancer susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13450–7.
89. Khan R, Abbasi SA, Mansoor Q, Ahmed MN, Mir KB, Baig RM. Analysis of Rare Alleles of miRNA-146a (rs2910164) and miRNA-34b/c (rs4938723) as a Prognostic Marker in Thyroid Cancer in Pakistani Population. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Oct 15;12(10):2495.
90. Zhang X, Zhou L, Fu G, Sun F, Shi J, Wei J, et al. The identification of an ESCC susceptibility SNP rs920778 that regulates the expression of lncRNA *HOTAIR* via a novel intronic enhancer. *CARCIN* [Internet]. 2014 Sep [cited 2023 Oct 2];35(9):2062–7. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgu103>
91. Zhu H, Lv Z, An C, Shi M, Pan W, Zhou L, et al. Onco-lncRNA *HOTAIR* and its functional genetic variants in papillary thyroid carcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2023 Oct 2];6(1):31969. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep31969>
92. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Jan 4 [cited 2023 Oct 2];44(D1):D877–81. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv1340>
93. Li J, Han L, Roebuck P, Diao L, Liu L, Yuan Y, et al. TANRIC: An Interactive Open Platform to Explore the Function of lncRNAs in Cancer. *Cancer Research* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2023 Oct 2];75(18):3728–37. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/75/18/3728/606420/TANRIC-An-Interactive-Open-Platform-to-Explore-the>
94. Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* [Internet]. 2019 Mar [cited 2023 Oct 2];48(1):23–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889852918305796>
95. Warda F, Ho S, Kuo E, Rao D, Jurado-Flores M. Aggressive Papillary Thyroid Carcinoma Presenting with Metastasis to the Pancreas. *Case Rep Endocrinol*. 2022;2022:5355419.
96. Guo K, Wang Z. Risk factors influencing the recurrence of papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):5393–403.
97. Williams D. Thyroid Growth and Cancer. *Eur Thyroid J* [Internet]. 2015 [cited 2023 Dec 5];4(3):164–73. Available from: <https://etj.bioscientifica.com/doi/10.1159/000437263>
98. Osborne D, Choudhary R, Vyas A, Kampa P, Abbas LF, Chigurupati HD, et al. Hashimoto's Thyroiditis Effects on Papillary Thyroid Carcinoma Outcomes: A Systematic Review. *Cureus*. 2022 Aug;14(8):e28054.
99. Kwak HY, Chae BJ, Eom YH, Hong YR, Seo JB, Lee SH, et al. Does papillary thyroid carcinoma have a better prognosis with or without Hashimoto thyroiditis? *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Jun [cited 2023 Dec 5];20(3):463–73. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10147-014-0754-7>
100. Lee I, Kim HK, Soh EY, Lee J. The Association Between Chronic Lymphocytic Thyroiditis and the Progress of Papillary Thyroid Cancer. *World J Surg* [Internet]. 2020 May [cited 2023 Dec 5];44(5):1506–13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-019-05337-9>



101. Zhang Y, Dai J, Wu T, Yang N, Yin Z. The study of the coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2023 Dec 5];140(6):1021–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00432-014-1629-z>
102. Beiramzadeh A, Heidari Z, Norouzi M, Saravani M. Association Between HOTAIR rs920778 and H19 rs3741219 Polymorphisms with Hashimoto's Thyroiditis (HT) and Graves' Disease (GD). *Rep Biochem Mol Biol*. 2022 Oct;11(3):377–85.
103. Omi Y, Haniu K, Kamio H, Fujimoto M, Yoshida Y, Horiuchi K, et al. Pathological multifocality is not a prognosis factor of papillary thyroid carcinoma: a single-center, retrospective study. *World J Surg Oncol*. 2022 Dec 12;20(1):394.
104. Zhang T, He L, Wang Z, Dong W, Sun W, Zhang P, et al. The Differences Between Multifocal and Unifocal Papillary Thyroid Carcinoma in Unilateral Lobe: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2021;11:657237.
105. Del Rio P, Loderer T, Giuffrida M, Cozzani F, Rossini M, Bonfili D, et al. Multifocality in patients treated for papillary Thyroid Carcinoma: a preliminary analysis of related risk factors. *Acta Biomed*. 2021 Nov 3;92(5):e2021017.
106. Ferreira LB, Gimba E, Vinagre J, Sobrinho-Simões M, Soares P. Molecular Aspects of Thyroid Calcification. *IJMS* [Internet]. 2020 Oct 19 [cited 2023 Dec 5];21(20):7718. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/20/7718>
107. Oh EM, Chung YS, Song WJ, Lee YD. The pattern and significance of the calcifications of papillary thyroid microcarcinoma presented in preoperative neck ultrasonography. *Ann Surg Treat Res* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 5];86(3):115. Available from: <https://astr.or.kr/DOIx.php?id=10.4174/astr.2014.86.3.115>
108. Peng X, Zhang K, Ma L, Xu J, Chang W. The Role of Long Non-Coding RNAs in Thyroid Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2023 Oct 2];10:941. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00941/full>
109. Yan R, Cao J, Song C, Chen Y, Wu Z, Wang K, et al. Polymorphisms in lncRNA HOTAIR and susceptibility to breast cancer in a Chinese population. *Cancer Epidemiology* [Internet]. 2015 Dec [cited 2023 Oct 2];39(6):978–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877782115002362>
110. Hassanzarei S, Hashemi M, Sattarifard H, Hashemi SM, Bahari G, Ghavami S. Genetic polymorphisms of HOTAIR gene are associated with the risk of breast cancer in a sample of southeast Iranian population. *Tumour Biol* [Internet]. 2017 Oct [cited 2023 Oct 2];39(10):101042831772753. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317727539>
111. Pan W, Liu L, Wei J, Ge Y, Zhang J, Chen H, et al. A functional lncRNA *HOTAIR* genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility: FUNCTIONAL POLYMORPHISMS OF lncRNA *HOTAIR* IN GASTRIC CANCER. *Mol Carcinog* [Internet]. 2016 Jan [cited 2023 Oct 2];55(1):90–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22261>
112. Kim JO, Jun HH, Kim EJ, Lee JY, Park HS, Ryu CS, et al. Genetic Variants of HOTAIR Associated With Colorectal Cancer Susceptibility and Mortality. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Feb 7 [cited 2023 Oct 2];10:72. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00072/full>
113. Chu H, Chen Y, Yuan Q, Hua Q, Zhang X, Wang M, et al. The HOTAIR, PRNCR1 and POLR2E polymorphisms are associated with cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):43271–83.
114. Ge Y, Jiang R, Zhang M, Wang H, Zhang L, Tang J, et al. Analyzing 37,900 Samples Shows Significant Association between Hotair Polymorphisms and Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Int J Biol Markers* [Internet]. 2017 Apr [cited 2023 Oct 2];32(2):231–42. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.5301/ijbm.5000235>

115. Qiu H, Wang X, Guo R, Liu Q, Wang Y, Yuan Z, et al. HOTAIR rs920778 polymorphism is associated with ovarian cancer susceptibility and poor prognosis in a Chinese population. *Future Oncology* [Internet]. 2017 Feb [cited 2023 Oct 2];13(4):347–55. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fo-2016-0290>
116. Bayram S, Sümbül AT, Batmacı CY, Genç A. Effect of HOTAIR rs920778 polymorphism on breast cancer susceptibility and clinicopathologic features in a Turkish population. *Tumor Biol* [Internet]. 2015 May [cited 2023 Oct 2];36(5):3863–70. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-014-3028-0>
117. Yang C, Wang Y. Identification of differentiated functional modules in papillary thyroid carcinoma by analyzing differential networks. *J Cancer Res Ther*. 2018 Dec;14(Supplement):S969–74.
118. Guo R, Ning Y, Ma Y, Lin Q, Shen N, Shi P. Long non-coding RNA HOTAIR / MICRORNA -761 sponge regulates PPME1 and further influences cell biological functions in thyroid carcinoma. *Laryngoscope Investig Oto* [Internet]. 2021 Jun [cited 2023 Oct 2];6(3):438–45. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lio2.593>
119. Xia F, Xia W, Yu X. LncRNA HOTAIR Influences the Growth, Migration, and Invasion of Papillary Thyroid Carcinoma via Affection on the miR-488-5p/NUP205 Axis. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Oct 2];19:153303382096212. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1533033820962125>
120. Fujisaka Y, Iwata T, Tamai K, Nakamura M, Mochizuki M, Shibuya R, et al. Long non-coding RNA HOTAIR up-regulates chemokine (C-C motif) ligand 2 and promotes proliferation of macrophages and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma cell lines. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Oct 2]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7322>
121. Yang L, Peng X, Li Y, Zhang X, Ma Y, Wu C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes exosome secretion by regulating RAB35 and SNAP23 in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 2];18(1):78. Available from: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-0990-6>
122. Wang J, Wang N, Zheng Z, Che Y, Suzuki M, Kano S, et al. Exosomal lncRNA HOTAIR induce macrophages to M2 polarization via PI3K/ p-AKT /AKT pathway and promote EMT and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2022 Nov 24;22(1):1208.
123. Islam F, Zhou Y, Lam AK. Long Non-Coding RNAs Profiling Using Microarray in Papillary Thyroid Carcinoma. *Methods Mol Biol*. 2022;2534:135–48.
124. Jiang Y, Wang J, Chen J, Wang J, Xu J. Construction and analysis of an aberrant lncRNA-miRNA-mRNA network associated with papillary thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Nov 6;99(45):e22705.
125. Li H mei, Yang H, Wen D yue, Luo Y huan, Liang C yan, Pan D hua, et al. Overexpression of LncRNA HOTAIR is Associated with Poor Prognosis in Thyroid Carcinoma: A Study Based on TCGA and GEO Data. *Horm Metab Res* [Internet]. 2017 Mar 28 [cited 2023 Oct 2];49(05):388–99. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0043-103346>
126. Mahmoud AA, Mohamed HO, Abdel Aal AM, Abdelghafour HS, Jabir MA. Long noncoding RNA HOTAIR and Midkine as biomarkers in thyroid cancer. *Egypt J Immunol*. 2023 Jan;30(1):96–104.
127. Chao X, Feng X, Wang X, Shi H, Li H, Wang Y, et al. MiRNA155HG polymorphisms influenced the risk of liver cancer among the Han Chinese population. *BMC Med Genet* [Internet]. 2020 Dec [cited 2023 Oct 2];21(1):134. Available from: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12881-020-01064-4>
128. Zou W, Li X, Li C, Liu D, Lv Y, Yang Y, et al. Analysis of the relationship between MIR155HG variants and gastric Cancer susceptibility. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2020 Dec [cited 2023 Oct 2];20(1):17. Available from: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-020-1169-8>

129. Wu H, He G, Han H, Xiong W, Song T, Chen H, et al. Analysis of *MIR155HG* variants and colorectal cancer susceptibility in Han Chinese population. *Molec Gen & Gen Med* [Internet]. 2019 Aug [cited 2023 Oct 2];7(8):e778. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.778>
130. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 Oct 2];40(D1):D930–4. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr917>
131. Subhi O, Schulten HJ, Bagatian N, Al-Dayini R, Karim S, Bakhshab S, et al. Genetic relationship between Hashimoto`s thyroiditis and papillary thyroid carcinoma with coexisting Hashimoto`s thyroiditis. Soares P, editor. *PLoS ONE* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2023 Oct 4];15(6):e0234566. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0234566>
132. Wu HR, Zhang J. AP-2 $\alpha$  expression in papillary thyroid carcinoma predicts tumor progression and poor prognosis. *CMAR* [Internet]. 2018 Aug [cited 2023 Oct 2];Volume 10:2615–25. Available from: <https://www.dovepress.com/ap-2alpha-expression-in-papillary-thyroid-carcinoma-predicts-tumor-pro-peer-reviewed-article-CMAR>
133. Qin Y, Liu X, Pan L, Zhou R, Zhang X. Long noncoding RNA *MIR155HG* facilitates pancreatic cancer progression through negative regulation of miR-802. *J of Cellular Biochemistry* [Internet]. 2019 Oct [cited 2023 Oct 2];120(10):17926–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.29060>
134. Thiele JA, Hosek P, Kralovcova E, Ostasov P, Liska V, Bruha J, et al. lncRNAs in Non-Malignant Tissue Have Prognostic Value in Colorectal Cancer. *IJMS* [Internet]. 2018 Sep 8 [cited 2023 Oct 2];19(9):2672. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2672>
135. Lin H, Ni R, Li D, Zhao M, Li Y, Li K, et al. lncRNA *MIR155HG* Overexpression Promotes Proliferation, Migration, and Chemoresistance in Gastric Cancer Cells. *Int J Med Sci*. 2023;20(7):933–42.
136. Wen A, Luo L, Du C, Luo X. Long non-coding RNA *miR155HG* silencing restrains ovarian cancer progression by targeting the microRNA-155-5p/tyrosinase-related protein 1 axis. *Exp Ther Med*. 2021 Nov;22(5):1237.
137. Ren XY, Han YD, Lin Q. Long non-coding RNA *MIR155HG* knockdown suppresses cell proliferation, migration and invasion in NSCLC by upregulating *TP53INP1* directly targeted by miR-155-3p and miR-155-5p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 May;24(9):4822–35.
138. Rai KR, Liao Y, Cai M, Qiu H, Wen F, Peng M, et al. *MIR155HG* Plays a Bivalent Role in Regulating Innate Antiviral Immunity by Encoding Long Noncoding RNA-155 and microRNA-155-5p. *mBio*. 2022 Dec 20;13(6):e0251022.
139. Zhao Q, Pang G, Yang L, Chen S, Xu R, Shao W. Long Noncoding RNAs Regulate the Inflammatory Responses of Macrophages. *Cells*. 2021 Dec 21;11(1):5.
140. Zhou L, Li J, Liao M, Zhang Q, Yang M. lncRNA *MIR155HG* induces M2 macrophage polarization and drug resistance of colorectal cancer cells by regulating *ANXA2*. *Cancer Immunol Immunother*. 2022 May;71(5):1075–91.
141. Li N, Liu Y, Cai J. lncRNA *MIR155HG* regulates M1/M2 macrophage polarization in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2019 Sep [cited 2023 Oct 2];117:109015. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332219313423>
142. Peng L, Pan B, Zhang X, Wang Z, Qiu J, Wang X, et al. Lipopolysaccharide facilitates immune escape of hepatocellular carcinoma cells via m6A modification of lncRNA *MIR155HG* to upregulate PD-L1 expression. *Cell Biol Toxicol*. 2022 Dec;38(6):1159–73.

143. Xie K, Ma H, Liang C, Wang C, Qin N, Shen W, et al. A functional variant in miR-155 regulation region contributes to lung cancer risk and survival. *Oncotarget*. 2015 Dec 15;6(40):42781–92.
144. Ji J, Xu M, Tu J, Zhao Z, Gao J, Chen M, et al. MiR-155 and its functional variant rs767649 contribute to the susceptibility and survival of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):60303–9.
145. Chen H, Zhang H, Liu Y, Chen Z, Gu J, Cui D, et al. miR-146a rs2910164 Polymorphism and Risk of Papillary Thyroid Carcinoma: A Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* [Internet]. 2018 Dec [cited 2023 Oct 2];22(12):674–9. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2018.0038>
146. Conzo G, Docimo G, Ruggiero R, Napolitano S, Palazzo A, Gambardella C, et al. Surgical treatment of papillary thyroid carcinoma without lymph nodal involvement. *G Chir*. 2012 Oct;33(10):339–42.

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Јелена Карајовић је рођена 16. јула 1970. год. у Лесковцу, Република Србија. Медицински факултет Универзитета у Београду завршила је 1996. године, са просечном оценом 8,57. Од 1998. године је запослена у ВМА, а од 2001. године на Клиници за ендокринологију ВМА. Специјализацију из интерне медицине завршила је 2001. године, а субспецијализацију из ендокринологије у ВМА УО у Београду 2007. године. Члан је Српског лекарског друштва, Лекарске коморе Србије и Европског друштва ендокринолога (European Society of Endocrinology).

Едукације: 2012 и 2015. год. завршила Курс добре клиничке праксе ( Good Clinical Practice-GCP) одобрен од стране Асоцијације професионалних клиничких истраживача (Association of Clinical Research Professionals)-српски органак

Кандидат, Јелена Карајовић, је коаутор 8 публикација, 1 у часопису категорије М21, 5 у часописима категорије М23, а 2 у категоријама М51.

1. Jelena Karajovic, Bozidar Kovacevic, Bojana Uzelac, Debora Stefik, Bojana Jovanovic, Petar Ristic, Snezana Cerovic Gordana Supic. Association of HOTAIR, MIR155HG, TERC, miR-155, -196a2 and -146a Genes Polymorphisms with Papillary Thyroid Cancer Susceptibility and Prognosis. *Cancers*, 15, x., 2023., doi.org/10.3390/xxxxx, IF=5.2, M21. *(Прихваћен рад са издатим сертификатом).*

2. Kikovic S, Marinkovic D, Ristic P, Karajovic J, Kuzmic-Jankovic S, Djuran Z, Cizmic M, Kovacevic B, Nenezic N, Hajdukovic Z. Role and importance of elastography in the diagnosis of differentiated thyroid carcinomas regarding the clinical, echosonographic, biohumoral and cytological examination and correlation of those results with definitive histopatological findings- A retrospective study. *Vojnosanit Pregl* 2021;78(6): 589-98. <https://doi.org/10.2298/vsp190704109k>. M23

3. Dragovic T, Mitrovic-Jovanovic V, Kikovic S, Kuzmic-Jankovic S, Ristic P, Karajovic J, Djuran Z, Marinkovic D, Hajdukovic Z. Clinical Presentation of incidentally discovered adrenal tumors-our experience. *Vojnosanit Pregl* 2021;78(1): 56-61. <https://doi.org/102298/vsp19020904id>. M23

4. Cizmic M, Ristic P, Djuran Z, Karajovic J, Zoranvic U, Nenezic N. Diabetes mellitus-factors that contribute to occurrence, diagnosis and management of the disease. *Vojnosanit Pregl* 2019;76(5):537-42. <https://doi.org/10.2298/vsp170620126c>. M23

5. Kikovic S, Tavcar I, Dragovic T, Ristic P, Karajovic J, Marinkovic D, Perisic N, Rusovic S, Hajdukovic Z. Insulinoma-how to localize tumor? *Vojnosanit Pregl* 2018;75(12):1172-7. <https://doi:102298/vsp160222049k>. M23

6. Tavcar I, Kikovic S, Bezmarevic M, Rusovic S, Perisic N, Mirkovic D, Kuzmic-Jankovic S, Dragovic T, Karajovic J, Sekulovic L, Hajdukovic Z. A 60-year experience in the treatment of pancreatic insulinoma in the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(3):293-7. doi: 10.2298/vsp130415048t. M23
7. Kovačević B, Eloy C, Karajović J, Kuzmić-Janković S, Soldatović I, Petrović M, Cerović S. Incidence and morphological features of thyroid papillary microcarcinoma in Graves' disease. *Srp Arh Celok Lek* 2017;145(9-10):457-62 doi: <https://doi.org/10.228/SARH161201092K>. M51
8. Dragovic T, Mijuskovic Z, Karajovic J, Andjelkovic Z. Effect of AT1 receptor blockers on plasma lipid profiles in type 1 diabetic patients with incipient diabetic nephropathy. *Jugoslav Med Biochem* 2005; 24 (1):21-6 doi:10.2298/JMH0501021D. M51