



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**ВЕСНА ШКУЛЕТИЋ**

**УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ СОХ-2, Р27 И VEGF НА  
СТВАРАЊЕ НОВИХ КРВНИХ И ЛИМФНИХ СУДОВА У  
ТКИВУ КЛАСИЧНИХ И ФОЛИКУЛАРНИХ ВАРИЈАНТИ  
ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

Ментор: др сци. мед. Гордана Радосављевић, ванредни професор

**КРАГУЈЕВАЦ, 2017.**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Весна Шкулетић
Датум и место рођења: 30.04.1968. године, Сарајево
Садашње запослење: Специјалиста патологије, Начелник Одсека за цитологију Института за патологију и судску медицину ВМА, Београд
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај експресије СОХ-2, Р27 и VEGF на стварање нових крвних и лимфних судова у ткиву класичних и фоликуларних варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде
Број страница: 114
Број слика: 26
Број библиографских података: 234
Установа и место где је рад израђен: Центар за молекулску дијагностику и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и Институт за патологију и судску медицину ВМА у Београду
Научна област (УДК): Медицина, Патологија
Ментор: проф. др Гордана Радосављевић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 2012 године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 708/8 од 10.12.2012. године.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области <i>Микробиологија и имунологија; Онкологија</i>, председник.</li><li>2. Проф. др Снежана Церовић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област <i>Патологија</i>, члан.</li><li>3. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Патолошка физиологија</i>, члан.</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области <i>Микробиологија и имунологија; Онкологија</i>, председник.</li><li>2. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области <i>Микробиологија и имунологија; Онкологија</i>, члан.</li><li>3. Проф. др Снежана Церовић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област <i>Патологија</i>, члан.</li></ol>
Датум одбране дисертације: 21.09. 2017.

## **ABSTRACT**

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common type of thyroid malignancy, well-differentiated carcinoma with favorable prognostic outcome. It represents heterogenous entity which comprises wide spectar of histologically different variants. Angiogenesis and lymphangiogenesis are fundamental processes for tumor progression and frequently used methods for their quantifying are determining the microvascular density (MVD) and lymphatic vessel density (LVD).

The purpose of this study was to evaluate the angiogenic and lymphangiogenic phenotypes of PTC, with special focus on classical and follicular variant of PTC. The finding of significantly higher MVD in high risk patients as well as in patients with vascular and local extrathyroidal invasion indicates that the progression of PTC is an angiogenesis-dependent process. The presence of high sensitivity and specificity of MDV regarding vascular invasion suggests that MVD may serve as a valuable marker for the determination of vascular invasion in PTC. Significant associations between higher MVD and positive VEGF expression, but not with the COX-2 expression, suggest that angiogenesis in PTC is mostly VEGF-dependent. The present study demonstrates significant association between expression of VEGF and COX-2 and patient age and tumor size, as well as lymph vessel invasion. However, there were no significant associations between LVD and clinicopathological parameters of PTC. The present study provides evidence that LVD in FV-PTC was increased compared to MVD. Inversive expression, respectively, high frequency of COX-2 expression accompanied with lower frequency of p27 expression in FV-PTC is probably related with increased LVD. This hypothesis supports the findings that COX-2 induction results in increased production of prostaglandins, which further increases cell proliferation via blocking activity p27. Statistically significantly higher MVD in CV-PTC than in FVPTC is associated with higher percentage distribution of VEGF. Based on the results obtained, it can be concluded that lymphangiogenesis is a dominant process in FV-PTC, while the angiogenesis has crucial significance in CV-PTC.

Conclusion of the study is that classical and follicular variants of PTC show significant heterogeneity in regard to angiogenic and lymphangiogenic potential determined by the differencies within the pattern of expression of VEGF, COX-2 and p27. Quantification of the degree of angiogenesis, beside predictive significance in PTC, could well serve as the method for differentiation of classical from follicular variant, which could have clinical and potentially therapeutic implications.

**Key words:** Papillary thyroid carcinoma, angiogenesis, lymphangiogenesis

## САЖЕТАК

Папиларни карцином штитасте жлезде (енгл. *Papillary thyroid carcinoma*, PTC) је најчешћи малигни тумор штитасте жлезде, добро диферентован карцином са повољном прогнозом. Представља хетерогени ентитет који обухвата широк спектар хистолошки различитих варијанти. Ангиогенеза и лимфангиогенеза представљају фундаменталне процесе у прогресији тумора а најчешћи метод за њихову кватификацију је одређивање микроваскуларне густине (енгл. *Microvascular density*, MVD) и густине лимфних судова (енгл. *Lymphatic vessel density*, LVD).

Циљ студије је био процена значаја експресије VEGF, COX-2 и P27 на ангиогени и лимфангиогени профил папиларног карцинома штитасте жлезде, са посебним освртом на класичну и фоликуларну варијанту папиларног карцинома. Налаз значајно веће MVD код испитаника који су припадали групи високог ризика, са детектабилном васкуларном и локалном ектратироидном инвазијом, указује на то да прогресија PTC зависи од процеса ангиогенезе. Присутна висока специфичност и сензитивност MVD у односу на васкуларну инвазију упућују да MVD може да послужи као маркер за детерминацију васкуларне инвазије. Значајна повезаност повећане MVD са позитивном експресијом VEGF, али не и са експресијом COX-2, сугерише да процес ангиогенезе у PTC углавном зависи од експресије VEGF. Забележена је значајна повезаност експресије VEGF и COX-2 са старосном доби пацијената и величином тумора, као и са инвазијом туморских ћелија у лимфне судове. Упркос томе што није забележена статистички значајна повезаност LVD ни са једним од клиничких и патохистолошких параметара PTC. У фоликуларној варијанти PTC, LVD је значајно већа у односу на MVD, што није био случај код класичне варијанте PTC. Налаз инверзне експресије, тј. повећане експресије COX-2 и смањене експресије p27 у фоликуларној варијанти PTC је вероватно повезан са забележеним порастом LVD у овој хистолошкој варијанти. Ову претпоставку подржавају сазнања да COX-2 путем повећане продукције простагландина, блокира активност p27 и подстиче ћелијску пролиферацију. Статистички значајно виша MVD у класичној варијанти PTC него код фоликуларне варијанте PTC, праћена је и статистички значајно већом процентуалном заступљеношћу позитивне експресије VEGF у класичној у односу на фоликуларну варијанту PTC. На основу добијених резултата, може се констатовати је лимфангиогенеза доминантан процес у фоликуларној варијанти PTC, док је у класичној варијанти PTC кључан процес ангиогенеза.

Закључак студије је да класична и фоликуларна варијанта PTC показују значајну хетерогеност у ангиогеном и лимфангиогеном потенцијалу који је условљен разликама у обрасцу експресије VEGF, COX-2 и p27. Значај квантификације степена ангиогенезе у PTC поред предиктивног значаја може послужити и као метод за диференцирање класичне од фоликуларне варијанте, што би могло да има клиничке и потенцијално терапијске импликације.

**Кључне речи:** папиларни карцином штитасте жлезде, ангиогенеза, лимфангиогенеза.

## **Захвалност**

*Бескрајну захвалност дугујем проф.др Небојши Арсенијевићу што ми је пружио могућност да урадим докторску дисертацију, уз помоћ тима дивних и паметних људи, у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Захвална сам му на свој подршци, времену и пријатељству које ми је великодушно пружио и част ми је што сам сарађивала са човеком великог срца, широког ума и неочекиване и у исто време генијалне једноставности.*

*За највећу, несебичну помоћ у изради ове дисертације, проф.др Гордани Радосављевић дугујем велику захвалност, уз коју сам спознала да надахнуће радом испуњава човека и ма колико он био исцрпљујући исцртава нову животну димензију. Посебно ми је задовољство што сам иза те озбиљности и посвећености открила нежно срце и пријатељство за цео живот.*

*Проф. др Снежани Церовић, која је уз мене годинама, велико хвала за сву стручну и пријатељску подршку од времена специјализације па до овог крунисања нашег заједничког рада. Початкована сам што је све време веровала у мене и што ме је својом непресушном енергијом, брзким умом и разумевањем подстицала у раду.*

*Посебну захвалност дугујем свом пријатељу проф. др Горану Брајушковићу са Билошког факултета Универзитета у Београду на корисним сугестијама, несебичној помоћи и дивном дружењу током припреме материјала за тезу.*

*Свим колегама из Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на челу са проф. др Иваном Јовановићем, др Јелени Пантић и др Бојани Симовић Марковић као и др Божидару Ковачевићу, лаборантима и архиварима Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у Београду дугујем захвалност на помоћи током израде овог рада. На помоћи у припремним и завршним фазама рада велику захвалност дугујем колегама и пријатељима др Душици Петровић и др Милошу Милосављевићу из Службе за патолошку-анатомску дијагностику Клиничког центра у Крагујевцу.*

*Проф. др Жељки Татомировић и колегиницама из Одсека за цитологију дугујем посебну захвалност на моралној подршци, свакој врсти помоћи током дугогодишњег заједничког рада, узајамном поверењу и пријатељству.*

*Мајци Даници, оцу Радославу, ћерки Ањи и мом Срђану дугујем доживотну захвалност на љубави, доброту и вери у мене и на свој подршци и стрпљивости у животу и током израде докторске дисертације. Сестри Мирјани и њеној породици, као и драгим пријатељима који су увек уз мене захваљујем на свим лепим тренуцима у животу. Највернијој пријатељици Маши, која је провела дуге, непреспаване ноћи поред мене, захваљујем на свој љубави и оданости.*

*И на крају, ову докторску дисертацију посвећујем својим родитељима за све оно што су за мене учинили и захваљујем им на свему што су ме научили и чега су се одрицали да бих ја данас била добар човек и одговоран лекар. Уз велику љубав и сву моју безграничну поришку, поклањам овај свој рад Иви, Хани и мојој наследници Дуњи са жељом да једног дана ја будем у публици када оне буду износиле своја животна дела.*

## САДРЖАЈ

<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>САЖЕТАК</b> .....	4
<b>1. УВОД</b> .....	8
1.1. КАРЦИНОМИ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ .....	8
1.2. ХИСТОЛОШКЕ ВАРИЈАНТЕ ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ .....	14
1.3. ОНКОГЕНЕЗА И ПРОГРЕСИЈА ДИФЕРЕНТОВАНИХ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ .....	18
1.4. АНГИОГЕНЕЗА И ЛИМФАНГИОГЕНЕЗА У ТУМОРУ .....	22
1.4.1. Механизми неоангиогенезе .....	22
1.4.2. Улога VEGF и СОХ-2 у ангиогенези тумора .....	25
1.4.3. Механизми и медијатори неолимфангиогенезе .....	27
<b>2. ЦИЉ РАДА</b> .....	31
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	32
3.1. ИСПИТИВАНА ПОПУЛАЦИЈА .....	32
3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК .....	33
3.2.1. Бојење хематоксилином и еозином (Н&Е) .....	34
3.2.2. Имунохистохемијска анализа експресије VEGF, CD31, СОХ-2, D2-40 и P27 у ткиву штитасте жлезде .....	34
3.3. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА .....	37
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	38
4.1. КЛИНИЧКЕ И ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА ОБОЛЕЛИХ ОД ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ .....	38
4.2. МИКРОВАСКУЛАРНА ГУСТИНА У ЗАВИСНОСТИ ОД КЛИНИЧКИХ И ПАТОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА КАРЦИНОМА .....	40
4.3. ЕВАЛУАЦИЈА АНГИОГЕНОГ ФЕНОТИПА ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ НА ОСНОВУ ЕКСПРЕСИЈЕ VEGF И СОХ-2 .....	43
4.4. МИКРОВАСКУЛАРНА ГУСТИНА И ЕКСПРЕСИЈА VEGF И СОХ-2 У ЗАВИСНОСТИ ОД ИНТРАТУМОРСКЕ И ПЕРИТУМОРСКЕ ИНФИЛТРАЦИЈЕ ЛЕУКОЦИТА .....	50
4.5. ГУСТИНА ЛИМФНИХ СУДОВА У ЗАВИСНОСТИ ОД КЛИНИЧКИХ И ПАТОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА КАРЦИНОМА .....	53
4.6. ЕВАЛУАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ P27, РЕГУЛАТОРА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА У ПАПИЛАРНОМ КАРЦИНОМУ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ .....	55
4.7. РАЗЛИЧИТИ АНГИОГЕНИ И ЛИМФАНГИОГЕНИ ПРОФИЛ У ФОЛИКУЛАРНОЈ И У КЛАСИЧНОЈ ВАРИЈАНТИ ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ .....	58
4.8. МИКРОВАСКУЛАРНА ГУСТИНА И ЕКСПРЕСИОНИ ПРОФИЛ VEGF, p27 И СОХ-2 У НЕТУМОРСКОМ И ТУМОРСКОМ ТКИВУ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ .....	61
<b>5. ДИСКУСИЈА</b> .....	64
5.1. РАСТ И ЛОКАЛНО ШИРЕЊЕ ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ ЗАВИСИ ОД АНГИОГЕНЕЗЕ .....	65

5.2. ЕКСПРЕСИЈА VEGF ЈЕ ПОВЕЗАНА СА ПОРАСТОМ ГУСТИНЕ КРВНИХ СУДОВА И СА ИНТРАТУМОРСКОМ ИНФИЛТРАЦИЈОМ ЛЕУКОЦИТА У ПАПИЛАРНОМ КАРЦИНОМУ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ.....	67
5.3. ПОВЕЗАНОСТ ЛИМФАНГИОГЕНЕЗЕ И ЕКСПРЕСИЈЕ p27 СА КЛИНИЧКИМ И ПАТОХИСТОЛОШКИМ КАРАКТЕРИСТИКАМА ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА.....	72
5.4. РАЗЛИЧИТ ОБРАЗАЦ ЕКСПРЕСИЈЕ VEGF, p27 И СОХ-2 УТИЧЕ НА ХЕТЕРОГЕНОСТ АНГИОГЕНОГ И ЛИМФАНГИОГЕНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА У КЛАСИЧНОЈ И ФОЛИКУЛАРНОЈ ВАРИЈАНТИ ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА .....	75
<b>6. ЗАКЉУЧАК .....</b>	<b>80</b>
<b>7. СКРАЋЕНИЦЕ .....</b>	<b>81</b>
<b>8. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>84</b>
<b>9. ПРИЛОЗИ .....</b>	<b>102</b>

## 1. УВОД

Предмет овог истраживања је испитивање значаја експресије VEGF, COX-2 и p27 за ангиогени и лимфангиогени фенотип папиларног карцинома штитасте жлезде, са посебним освртом на његове хистолошке варијанте: фоликуларну и класичну варијанту папиларног карцинома. У уводном делу приказани су аспекти који су потенцијално важни за разматрање резултата актуелне студије: опште патолошке карактеристике карцинома штитасте жлезде и молекулски аспекти канцерогенезе диферентованих карцинома, као и главни механизми и медијатори укључени у стварање нових крвних и лимфних судова у тумору.

### 1.1. Карциноми штитасте жлезде

Карциноми штитасте жлезде чине око 1% свих малигних тумора. Међутим, у протеклих неколико деценија, инциденца карцинома штитасте жлезде је у сталном порасту (1). Ово повећање инциденце може се објаснити на неколико начина. Прво, унапређење дијагностичких процедура којима се ефикасно откривају тумори пречника до 2cm као и микрокарциноми који су мањи од 1cm. Друго, промене у индексу телесне тежине на нивоу опште популације, чешће конзумирање лекова који се користе у лечењу стерилитета као и промене у менструалном циклусу сматрају се одговорним за све чешћи настанак карцинома штитасте жлезде (2). Генерално, за оболеле од карцинома штитасте жлезде карактеристично је дуго преживљавање. Само код малог процента оболелих могућ је развој рецидива и метастаза што потенцијално води ка леталном исходу (3).

Познато је да су карциноми штитасте жлезде два до четири пута чешћи код жена (4). Присуство рецептора за естроген на фоликуларним ћелијама указује на значајну улогу естрогена у малигној трансформацији ћелија (5), као и у пролиферацији туморских ћелија у карциному штитасте жлезде (6). Три главна естрогена су естрон (E1), естрадиол (E2) и естриол (E3) који на више начина доприносе развоју тумора. Документовано је да E2 промовише пролиферацију, адхезију, инвазију и миграцију туморских ћелија тако што редукује експресију  $\beta$ -катенина (7). Уз наведено, E2 смањује експресију E-кадхерина и истовремено повећава експресију виментина и MMP-9 и на тај начин подстиче метастатску активност туморских ћелија карцинома штитасте



жлезде (8). Примећена је и веза између естрогенског и Wnt сигналног пута, а која се остварује функционалном интеракцијом  $\beta$ -катенина са рецептором за естроген ER- $\alpha$  (9).

Малигни тумори штитасте жлезде су хетерогена група тумора, а њихова разноврсност се огледа у ћелијском пореклу, биолошком понашању, хистолошким карактеристикама и ћудљивости клиничког тока малигнома. Тумори пореклом од епителних фоликуларних ћелија су најчешћи малигноми штитасте жлезде, који уједно представљају добро диферентоване карциноме, а то су папиларни (енгл. *Papillary thyroid carcinoma*, PTC) и фоликуларни карцином (енгл. *Follicular thyroid carcinoma*, FTC). Медуларни карцином је трећи по учесталости тумор штитасте жлезде, који води порекло од парафоликуларних C-ћелија. Као најагресивнија форма тумора издваја се слабо диферентовани, анапластични карцином штитасте жлезде (10).

**Медуларни карцином штитасте жлезде** (енгл. *Medullary thyroid carcinoma*, MTC) настаје малигном трансформацијом парафоликуларних C-ћелија које луче различите пептиде и хормоне, укључујући калцитонин. Ова врста карцинома се углавном јавља спорадично, а у око 20% случајева се наслеђује. У основи фамилијарне форме МТС је генетска мутација RET онкогена. Фамилијарна форма МТС се може јавити или изоловано или у склопу мултипле ендокрине неоплазије (енгл. *Multiple endocrine neoplasia*, MEN). Патохистолошко обележје МТС су плаже ситних малигнух ћелија са еозинофилном цитоплазмом, тамним једрима и умереним митотским индексом. Клинички ток медуларног карцинома варира од индолентне до агресивне варијанте са високом стопом смртности. Метастазира и лимфогеним и хематогеним путем.

**Анапластични карцином штитасте жлезде** (енгл. *Anaplastic thyroid cancer*, ATC) је редак, али екстремно смртоносан тумор. За оболеле од ове врсте карцинома карактеристично је кратко преживљавање, од пет месеци до годину дана (11). Грађен је од анапластичних, вретених, хиперхроматичних ћелија са израженим митотским индексом. Изузетно се брзо се шири у околно ткиво и метастазира како у лимфне жлезде тако и у удаљене органе. Претпоставља се да настаје дедиференцијацијом добро диферентованих карцинома. Чест је код старијих људи и обично се јавља на терену дугогодишње струме и највероватније непрепознатог добро диферентованог карцинома (12).

За разлику од претходно наведена два типа малигнома, добро диферентовани карциноми су најчешћи тумори штитасте жлезде. То су фоликуларни и папиларни карцином који, по правилу, имају добру прогнозу ако се примене сви ефикасни начини лечења.

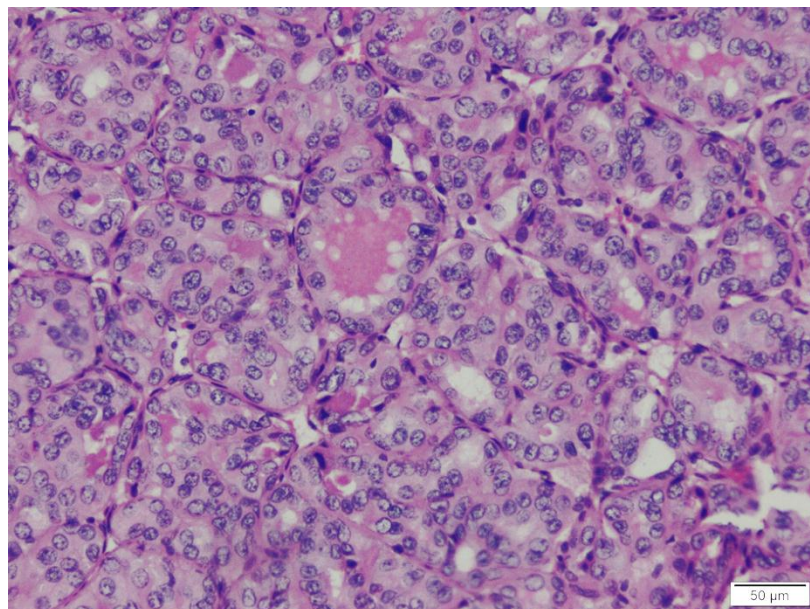
Главни проблем у диференцијалној дијагнози фоликуларних лезија је разликовање бенигнух од малигнух лезија, односно разликовање фоликуларног аденома и аденоматозних нодуса (са знацима атипичности) у мултинодозној струми од фоликуларног карцинома. Да би се фоликуларна лезија прогласила малигнуом неопходно је присуство капсуларне и/или васкуларне инвазије. Постављање патохистолошке дијагнозе **фоликуларног карцинома штитасте жлезде** се додатно компликује изгледом једара која могу подсећати на једра туморских ћелија РТС због чега РТС може погрешно да се интерпретира као фоликуларна варијанта папиларног карцинома (енгл. *Follicular variant of papillary thyroid carcinoma*, FV-РТС). Сем тога, присуство слабо диферентованих туморских подручја у РТС ствара проблеме у диференцијалној дијагнози РТС и слабо диферентованог карцинома штитасте жлезде (13).

Увођењем строжијих критеријума за препознавање капсуларне и/или васкуларне инвазије, као и поштовањем свих карактеристика "нуклеарног сета" број дијагностикованих FV-РТС је у порасту, док број РТС опада (14), (15). Смањеној инциденци РТС широм света, нарочито у последњој деценији, допринели су и спроведени пројекти за корекцију недостатка јода. Прогноза РТС зависи од неколико фактора, а то су старосна доб оболелих, величина тумора и стадијум болести, комплетност хируршке ресекције и одговор на терапију радиоактивним јодом. Сматра се да на исход болести утиче и степен инвазивности тумора (16). Иако је значај ћелијске диференцијације и даље контроверзан, опште је прихваћено да РТС грађени од онкоцитних ћелија или који показују солидни, трабекуларни или инсуларни начин раста, много слабије реагују на терапију радиоактивним јодом и имају лошију прогнозу (17), (18).

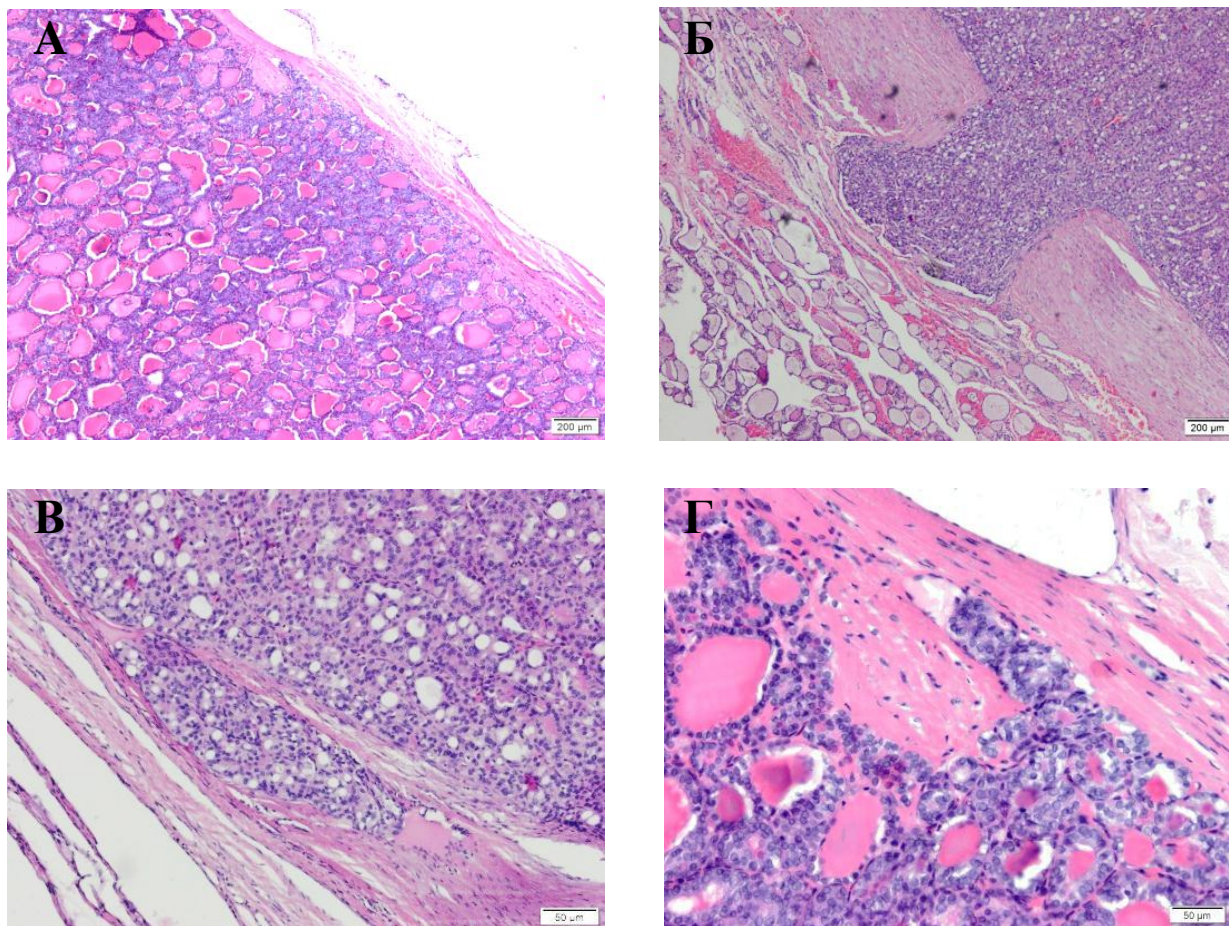
Хистолошки изглед РТС варира, од сета малих до средње великих фоликула, преко трабекуларних формација до солидних поља раста (Слика 1). Ако доминирају велики фоликули, са или без колоида, у том случају неопходно је да се пажљиво анализирају карактеристике једара како се не би превидела фоликуларна варијанта папиларног карцинома. Уз то, потребни су бројни ткивни пресеци да би се поставила

патохистолошка дијагноза како FTC са минималном инвазијом капсуле (генерално, са мање агресивним потенцијалом) (Слика 2А и 2Б) тако и ангиоинвазивног FTC (са агресивнијим потенцијалом) где је неопходна детекција бар једног крвног суда који је јасно инвадиран туморским ћелијама (Слика 2 В и 2Г).

**Папиларни карцином штитасте жлезде** је најчешћи тип добро диферентованог карцинома и чини више од 80% малигнома штитасте жлезде. Током протеклих деценија, број оболелих од РТС је у сталном порасту што је резултат деловања бројних утицаја из околине, као и генетских и хормонских фактора (19), (20). Обично се манифестује палпабилним нодусима у штитастој жлезди. На скинтиграфији радиоактивним јодом уочавају се "хладни" нодуси, а на ултразвучном прегледу штитасте жлезде региструју се или солидни, хипоехогени нодуси са добро и/или нејасно дефинисаним ивицама или цистичне формације (4). У 80% случајева присутни су фокуси тачкастих калцификација захваљујући којима се ултразвучно откривају микрокарциноми, нарочито код пацијената са непалпабилним нодусима и коегзистирајућом колоидном струмом (21). Код малог броја оболелих, лимфаденопатија на врату је први клинички знак постојања тумора у штитастој жлезди. Захватање Делфиановог нодуса, лоцираног преларингеално, представља лош прогностички знак и упућује на узнатредовалу форму болести (22).



**Слика 1. Фоликуларни карцином штитасте жлезде грађен од малих до средње великих фоликула, са или без колоида. Н&Е бојење ( оригинално увећање 200х)**



**Слика 2. Хистолошки изглед FTC са минималном капсуларном и васкуларном инвазијом. Н&Е бојење. А) Микрофоликуларни/солидни раст тумора са задебљаном капсулом (оригинално увећање 40х); Б) Фокална капсуларна инвазија (оригинално увећање 40х); В, Г) Васкуларна инвазија (оригинално увећање 200х).**

Упркос чињеници да је добро диферентован и углавном индолентан тумор, могуће је да папиларни карцином стекне инвазиван потенцијал и да се онда лако шири у друге органе. Сматра се да туморске ћелије РТС показују већу склоност да инвадирају у лимфне него у крвне судове. Микроскопске или окултне метастазе у лимфним жлездама се региструју у 50 до 60% оболелих од РТС. И поред овог високог процента окултних микрометастаза у регионалне лимфне жлезде, проценат клинички јасних метастаза је мањи од 15%. Присуство метастаза у регионалним лимфним жлездама код млађих пацијената готово да нема никакав утицај на прогнозу болести, док је код старијих повезано са лошом прогнозом болести (23).

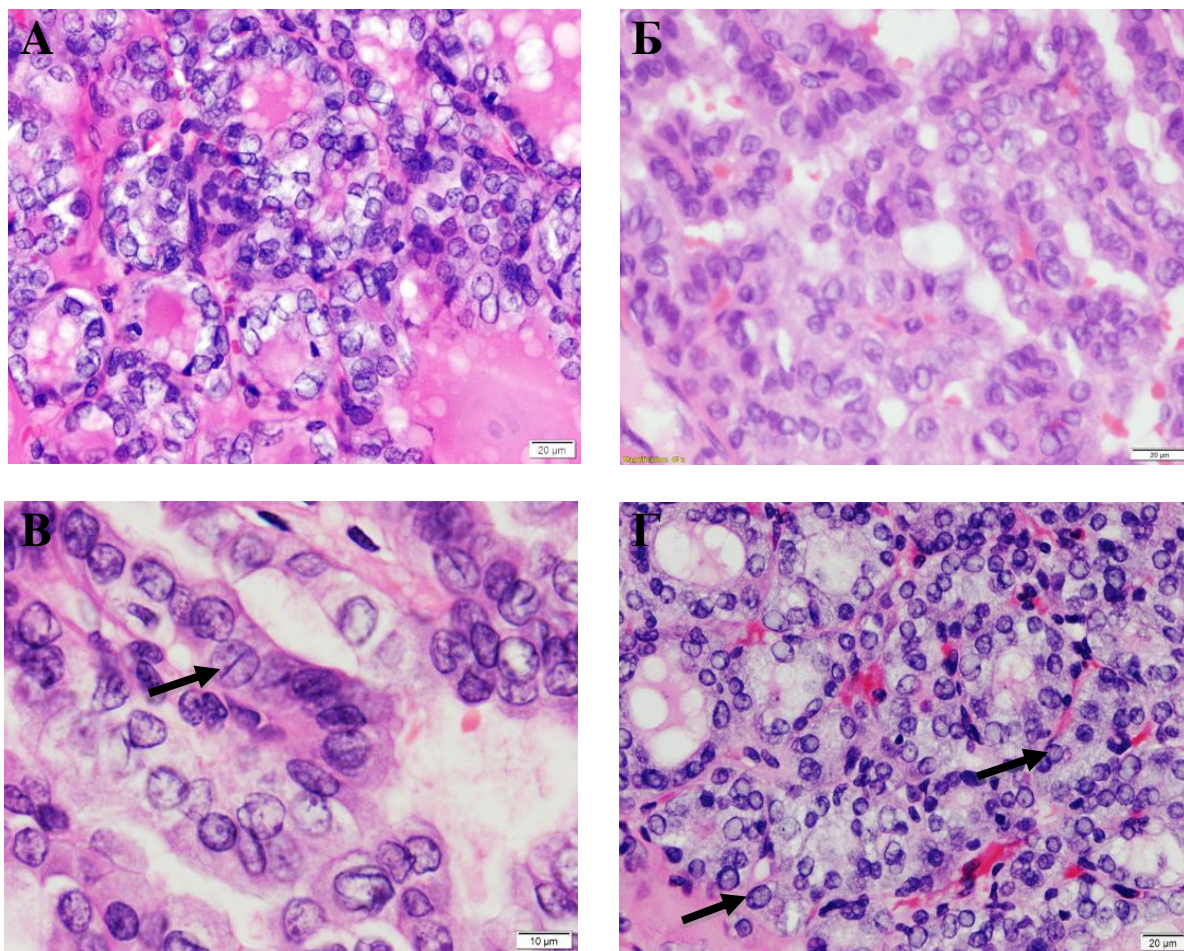
Као прогностички фактори за развој рецидива РТС наводе се капсуларна инфилтрација и екстратироидна инвазија (24), док је туморска инвазија у околне мишиће и мека ткива повезана како са повећаном инциденцом метастазирања у

удаљене органе тако и са већом стопом смртности (25). Потенцијал за дисеминацију у удаљене органе је знатно мањи код папиларног карцинома у односу на фоликуларни карцином (26). Најчешћа удаљена места хоминга метастатских ћелија РТС су плућа и медијастинални лимфни чворови (27).

Хистолошка структура папиларног карцинома је варијабилна, а за постављање дијагнозе неопходни су цитолошки критеријуми (4), познати као "нуклеарни сет":

- величина и облик једра- једра малигно трансформисаних ћелија су већа од једара неизмењених фоликуларних ћелија и имају тенденцију да се преклапају и нагомилавају. Изражена је изузетна морфолошка варијабилност: од издужених, округлих до "церебриформних" једара. Једарне овојнице могу да буду ирегуларне (Слика 3А).
- изглед хроматина- периферна кондензација хроматина уз једарну мембрану даје карактеристичан изглед једара, налик мутном стаклу ("*ground glass*"). Уочава се и присисутво једараца (Слика 3Б).
- налаз нуклеарних усека који су узоковани присуством ирегуларних једарних овојница, као и псеудоинклузија, односно инвагинација цитоплазме у једро ћелија (Слика 3В и 3Г).





**Слика 3. Патохистолошке карактеристике папиларног карцинома штитасте жлезде. Н&Е бојење.**  
 А) Једра су увећана, хипохроматична, ирегуларног облика и често се гомилају и преклапају (оригинално увећање 400x); Б) Кондезација хроматина уз једарну мембрану резултира карактеристичним изгледом једара која су или "празна" или имају изглед "мутног стакла" (оригинално увећање 400x); В) Неправилност једарних овојница резултује појавом једарних усека (оригинално увећање 1000x); Г) Уврати цитоплазме у једру у виду интрануклеарних псеудоинклузија (оригинално увећање 400x).

## 1.2. Хистолошке варијанте папиларног карцинома штитасте жлезде

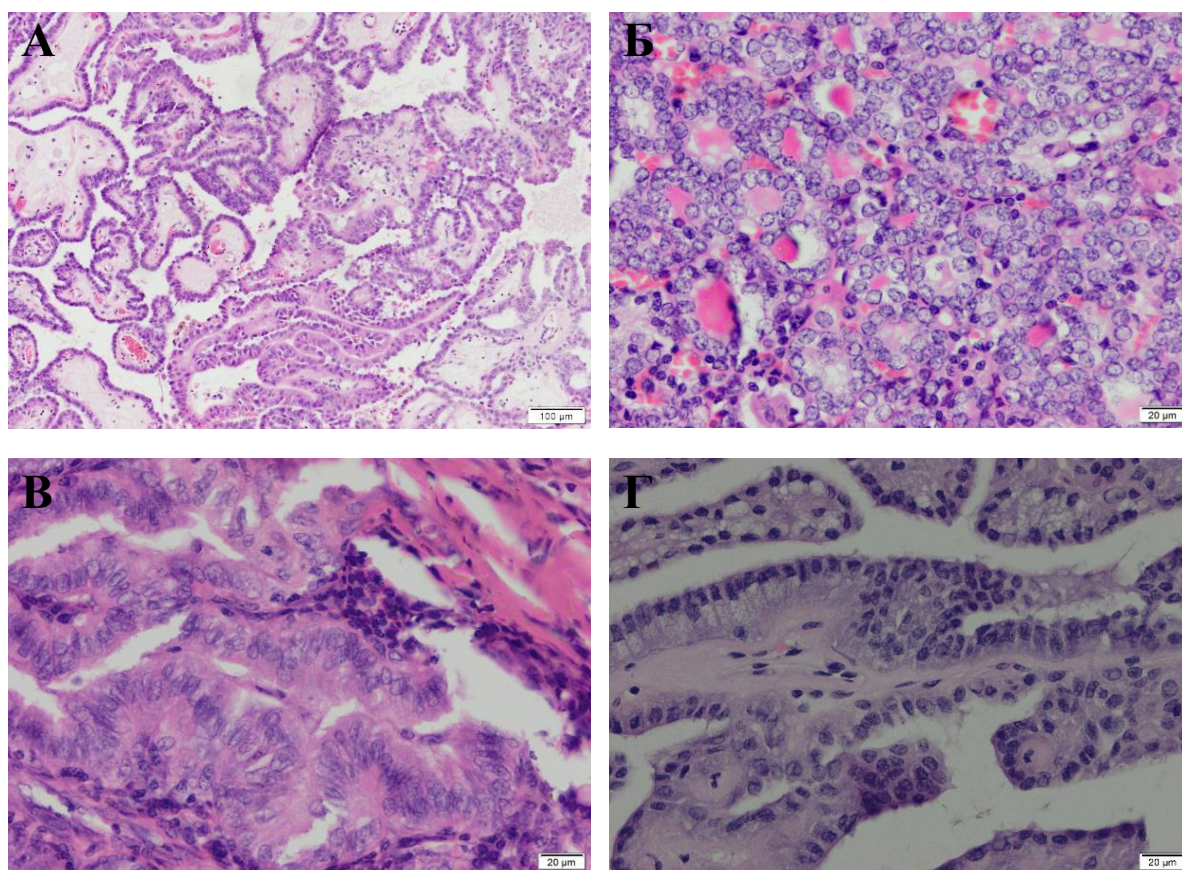
Папиларни карцином штитасте жлезде је хетероген ентитет који обухвата широк спектар хистолошки различитих варијанти: класична и фоликуларна варијанта, микрокарциноми, високоћелијска варијанта, цилиндричноћелијски тип, онкоцитни, дифузно склерозирајући, солидни, светлоћелијски, крибриформно моруларни, макрофоликуларни тип, РТС са "*fascitis-like*" стромом, РТС налик *Warthin*-овом тумору и мешовити папиларно-медуларни карцином, као и папиларни карцином код кога се региструје дедиференцијација у анапластични карцином (28). Претпоставља се да

варијације у молекулском профилу свих наведених хистолошких варијанти условавају различити исход болести због чега је неопходно прецизно дефинисање и препознавање морфолошких карактеристика хистолошких варијанти папиларног карцинома (29).

**Класична варијанта папиларног карцинома штитасте жлезде** (енгл. *Classical variant of papillary thyroid carcinoma, CV-PTC*) је најчешћа хистолошка варијанта коју карактеришу разгранате папиларне структуре. Папиле чине малигне ћелије са еозинofilном цитоплазмом, увећаним једром и са свим одликама карактеристичног "нуклеарног сета", које облажу фиброваскуларно језгро (Слика 4А). Поларитет ћелија је нарушен и често је присутна сквамозна метаплазија. Могу се наћи и "псамозна телашца", односно концентричне, ламеларне структуре које су делом сачињене од наталоженог тиреоглобулина. Уз наведено, могу се регистровати и мултиједарне циновске ћелије.

**Фоликуларна варијанта** (енгл. *Follicular variant of papillary thyroid carcinoma, FV-PTC*) чини 41% свих папиларних карцинома штитасте жлезде (30). Ова хистолошка варијанта сачињена је од епителних ћелија организованих у фоликуларне структуре, мале или средње величине, са једарним карактеристикама које одговарају PTC. Уз то, може се регистровати карактеристичан хипереозинofilни колоид са периферним "тестерастим" ивицама, као и мултиједарне циновске ћелије, а изузетно ретко могу да се нађу и псамозна телашца (Слика 4Б).



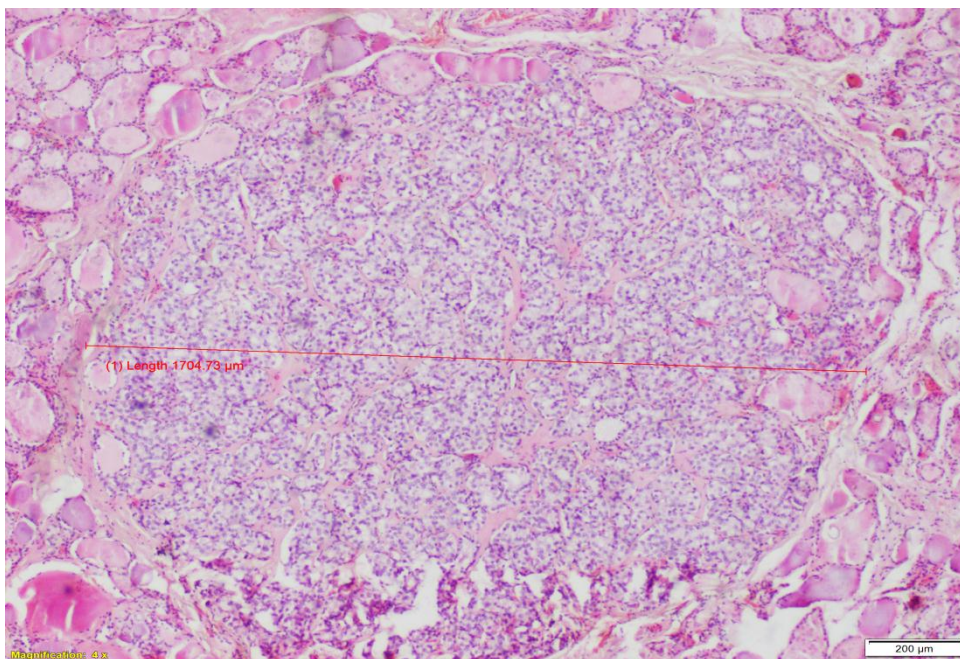


**Слика 4. Хистолошке варијанте папиларног карцинома. Н&Е бојење.** А) Класична хистолошка варијанта са папиларним структурама у чијем се средишту налази фиброваскуларно језгро, док су једра туморских ћелија увећана и хипохроматична (оригинално увећање 100x); Б) У фоликуларној варијанти РТС уочавају се мали и средње велики фоликули, хипохроматичних једара. Колоид је тамније боје и "тестерасто" на зубљених ивица (оригинално увећање 400x); В) Код високо ћелијске варијанте висина ћелија је два пута већа од ширине, док су једра туморских ћелија, хипохроматична, ексцентрично постављена уз базалну мембрану (оригинално увећање 400x); Г) Цилиндрично ћелијска варијанта са псеудоstrатификацијом ћелија, хиперхроматичним једрима и субнуклеарним вакуолама (оригинално увећање 400x).

**Високоћелијска хистолошка варијанта** обично има класичну архитектуру РТС са бројним издуженим папилама. Туморске ћелије имају најмање два пута већу висину од ширине, и у њима се уочавају оксифилна цитоплазма и једра која су локализована уз саму базалну мембрану (Слика 4В). Мада су *Hawk* и сарадници (31) још пре 40 година описали високоћелијску варијанту, дијагностиковање овог типа РТС и даље је праћено потешкоћама, а често бива и непрепознат. За постављање дијагнозе ове хистолошке варијанте неопходно је да се региструје више од 50% туморских ћелија изгледа "високих ћелија" (32). Слична њој, постоји цилиндричноћелијска хистолошка варијанта, која се карактерише високим ћелијама хиперхроматичних једра, субнуклеарним вакуолама и псеудоstrатификацијом ћелија (Слика 4Г).



**Папиларни микрокарцином** је дефинисан као карцином пречника од 1cm и мање (33), а илустрован је на Слици 5. Најчешће се случајно открива у току тироидектомије бенигних лезија или код пацијената са детектованим местастазама у регионалним лимфним жлездама или у удаљеним органима (34). Мада је у већини случајева индолентан, резултати неких истраживања указују на лошу прогнозу која је повезана са одређеним патохистолошким параметрима, као што су мултифокалност, екстратироидно ширење и метастазе у регионалним лимфним жлездама (35).



**Слика 5.** Папиларни микрокарцином са једрима карактеристичним за папиларни карцином штитасте жлезде. Н&Е бојење (оригинално увећање 40x).

Иако су CV-PTC и FV-PTC најчешће заступљене хистолошке варијанте, резултати досадашњих студија су опречни у погледу њиховог биолошког понашања, као и прогнозе болести. FV-PTC је први пут описана пре више деценија (36), међутим, још увек је нејасно када је биолошко понашање ове варијанте папиларног карцинома другачије и када захтева другачији протокол у лечењу у односу на CV-PTC. *Zidan* и сарадници (37) наводе да су обе хистолошке варијанте тумора, генерално, индолентне и да нема значајне разлике у преживљавању оболелих. Уз то, постоји низак ризик за развој рецидива, нарочито код пацијената млађих од 50 година. Није забележена разлика ни у метастатском потенцијалу, као ни у заступљености мултифокалних туморских лезија између FV-PTC и CV-PTC. У другој студији (38) је документовано да

је мултифокалност много чешћа у FV-PTC него у CV-PTC, али без обзира на то FV-PTC је мање агресиван што се огледа у ниској инциденци метастазирања како у регионалне лимфне жлезде тако и у удаљене органе. Међутим, када је реч о преживљавању, оно је или слично или чак дуже код оболелих од CV-PTC. Супротно томе, резултати појединих истраживања упућују да FV-PTC има агресивнији потенцијал и склоност да метастазира у плућа (39).

Фоликуларна хистолошка варијанта је чешће инкапсулирана у односу на класичну варијанту папиларног карцинома (40), а биолошко понашање ове инкапсулиране форме је слично фоликуларном аденому или карциному (41). Примећено је да је молекулски профил FV-PTC сличнији фоликуларном аденому и карциному него папиларном карциному штитасте жлезде (42). Праћењем инкапсулиране форме и у FV-PTC и у CV-PTC, закључено је да је ова форма код обе хистолошке варијанте папиларног карцинома индолентна и са ниском стопом смртности (43).

Оваква шареноликост података из литературе може бити одраз разноликости молекулског профила фоликуларне и класичне варијанте PTC, као и стадијума болести.

### **1.3. Онкогенеза и прогресија диферентованих карцинома штитасте жлезде**

Диферентовани карциноми штитасте жлезде у већини случајева су клинички индолентни и после примене радиоактивног јода и/или супресивне терапије тироидних хормона могу да се хируршки ефикасно лече. Међутим, код неких пацијената оболелих од ове врсте карцинома, поменута терапија је неефикасна у деструкцији туморских ћелија и инхибицији прогресије болести (44). У складу са тим, током последњих деценија, бројна истраживања су углавном фокусирана на идентификацију генетских промена, као и на разумевању молекулских догађаја укључених у генезу диферентованих карцинома штитасте жлезде, што може да омогући нови терапијски приступ у лечењу, нарочито код оболелих који су рефракторни на конвенционалну терапију.

Малигна трансформација фоликуларних ћелија штитасте жлезде је резултат каскадне акумулације генетских мутација. Ове мутације "погађају" гене чији су производи укључени како у ћелијску пролиферацију и диференцијацију тако и у ћелијску смрт, а то је мање-више заједничко за генезу свих тумора. Најранији догађај у

онкогенези укључује "непланску пролиферацију" фоликуларних ћелија која је индукована мутацијом онкогена. Коначна последица ове непланске пролиферације је настанак диферентованих карцинома штитасте жлезде: папиларног и фоликуларног карцинома. Већина мутација мења стабилност генома. Тиме се спречава поправка оштећених гена, што је један од најважнијих заштитних контролних механизма у очувању генске структуре. У каснијим фазама онкогенезе дешава се губитак и/или инактивација антионкогена, као и повећана активација додатних онкогена што све заједно за последицу има прогресију и дедиференцијацију добро диферентованих карцинома штитасте жлезде (45).

До сада је познато неколико сетова генетских промена, који углавном активирају специфичне сигналне путеве, укључујући MAPK, PI3K и  $\beta$ -catenin сигнални пут, значајних у иницијацији и прогресији карцинома штитасте жлезде (46). У папиларном карциному примећено је да генетске мутације (RET/PTC, BRAF, и RAS гена) најчешће стимулишу непрекидну активацију MAPK (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*) сигналног пута (47). Ова аберантна активација MAPK сигналне каскаде доприноси генези тумора тако што промовише ћелијски раст и пролиферацију (48). Када је реч о онкогенези фоликуларног карцинома, честа је повећана активност и MAPK и PI3K (енгл. *Phosphatidylinositol 3-kinase*) сигналног пута (49). Супротно њима, у анапластичном карциному штитасте жлезде уочене су мутације широког спектра гена чији су производи укључени у више сигналних путева, као што су MAPK, PI3K и  $\beta$ -catenin сигнални пут (50).

Мутације BRAF гена су најчешће генетске промене и присутне су у више од 60% PTC (51). Препоставља се да ова генетска мутација у класичној и високоћелијској варијанти PTC подстиче развој метастаза у лимфним жлездама и повећава ризик за настанак рецидива. Агресивнији потенцијал класичне и високоћелијске варијанте PTC са детектованом мутацијом BRAF гена се објашњава повећаном експресијом MMPs (енгл. *Matrix metalloproteinases*) укључених у инвазију малигних ћелија (52). Сем тога, за овакве хистолошке варијанте PTC карактеристична је рефрактарност на радиоактивни јод. Претпоставља се да је ова рефрактарност последица повећане активности MAPK сигналног пута индуковане мутацијом BRAF<sup>V600E</sup> онкопротеина што коначно резултује супресијом експресије гена укључених у инкорпорацију јода (53). Фоликуларни карцином и фоликуларна варијанта PTC су често удружени или са мутацијом RAS гена или са фузијом PAX8 и PPARG онкогена (49).

Један од важних догађаја у генези тумора, укључујући карцином штитасте жлезде је дисбаланс између ћелијског раста и смрти ћелија. Протеини који контролишу ћелијски циклус су кључни у регулацији ове равнотеже. Постоји неколико група различитих ефекторских молекула који стога регулишу специфичне фазе ћелијског циклуса, а то су: циклини, циклин-зависне киназе (енгл. *Cyclin-dependent kinases*, CDKs) и инхибитори CDKs. Тако, губитак експресије или функције инхибитора CDKs у G1-контролној тачки ћелијског циклуса, као што су p21 и p27, доприносе генези и прогресији различитих врста тумора. Сем тога, претпоставља се да је функционални губитак протеина p21 и p27 одговоран за резистенцију малигнућ ћелија на антитуморске лекове (54). Молекул p27 је члан Cip/Kip фамилије протеина који инхибицијом CDKs привремено зауставља ћелијски циклус у G1 фази (Схема 1). Мутација p27 гена, обично удружена са мутацијом других антионкогена, резултује дисрегулацијом ћелијског циклуса и акумулацијом генетских промена. Коначна последица акумулације генетских мутација је настанак и прогресија тумора (55). Значајна улога p27 у канцерогенези и прогресији тумора потврђена је и у експерименталном моделу папиларног карцинома штитасте жлезде заснованом на коришћењу мишева генски дефицијентних у експресији p27. Код ових мишева регистрована је већа инциденца развоја папиларног карцинома, краћи период латенције, као и повећани пролиферацијски индекс тумора у односу на мишове чије соматске ћелије исказују овај протеин (56).

Описане генетске промене, неопходне у настанку карцинома штитасте жлезде, саме по себи нису довољне за онкогенезу. Процеси онкогенезе укључују низ унутарћелијских догађаја које, најчешће у већ генетски измењеном миљеу, покрећу фактори спољашње средине. Добро је познато да јонизујуће зрачење значајно повећава ризик за развој папиларног карцинома. У папиларном карциному изазваном јонизујућим зрачењем примећена је повећана преваленца фузије онкогена која обично настаје интрахромозомским реаранжирањем гена. Најчешће се региструје аберантна активација RET онкогена, која настаје услед фузије овог протоонкогена са неким од конститутивно експримираних гена, што се вероватно дешава током оштећења ДНК изазваним јонизујућем зрачењем (57), (58).

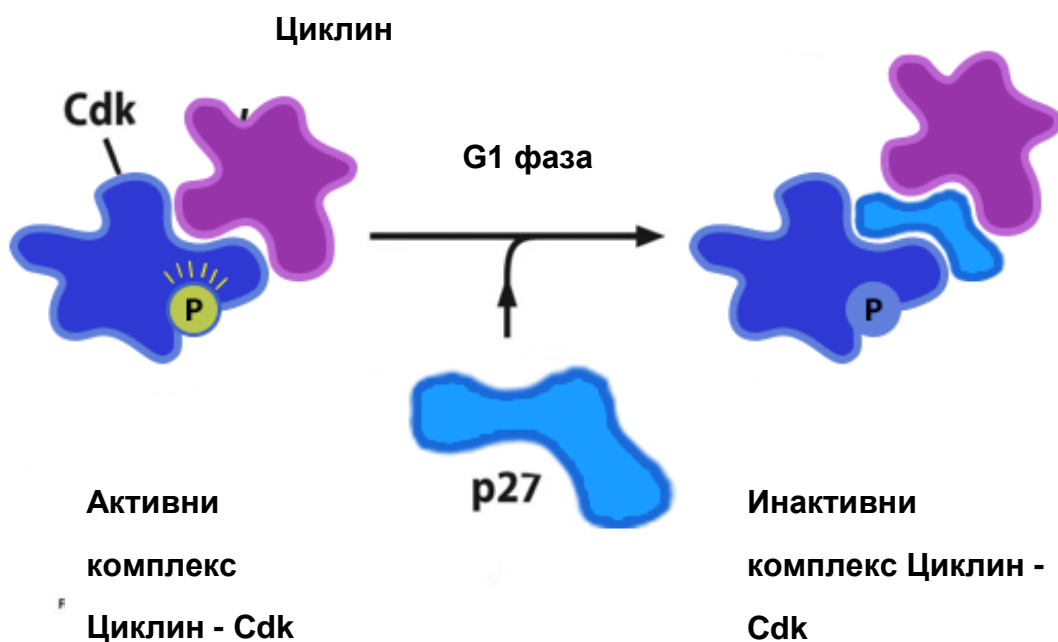


Схема 1. Биолошка улога протеина p27 у регулацији ћелијског циклуса

Ћелијска деоба диферентованих ћелија је предуслов за акумулацију мутација и/или генетских и епигенетских промена што резултује онкогенезом тумора. Међутим, претпоставља се и да су матичне и прогениторске ћелије алтернативни извор у генези тумора, укључујући карцином штитасте жлезде (59), (60). Матичне ћелије (енгл. *Cancer stem cells*, CSCs) су недиферентоване ћелије које имају способност самообнављања. Насељавају било који орган или ткиво, па су регистроване и у штитастој жлезди, укључујући ткиво струме и карцином штитасте жлезде (61). Пролиферација матичних ћелија строго је регулисана сигнаlima из ниша, смештених у локалној микросредини. Ови сигнали не дозвољавају матичним ћелијама да уђу у неконтролисану ћелијску деобу. Одређени услови, као што је интензивна стимулација хормонима и факторима раста, могу да савладају строге контролне механизме ниша што резултује пролиферацијом матичних ћелија. Због своје дуговечности, матичне ћелије су склоне стицању мутација и других молекулских аберација. У диферентованим и анапластичним карциномима штитасте жлезде регистрована је мала популација CSCs. Запажено је да ортотопска апликација малог броја тироидних CSCs резултује агресивнијим метастатским потенцијалом анапластичног карцинома штитасте жлезде (62).

## 1.4. Ангиогенеза и лимфангиогенеза у тумору

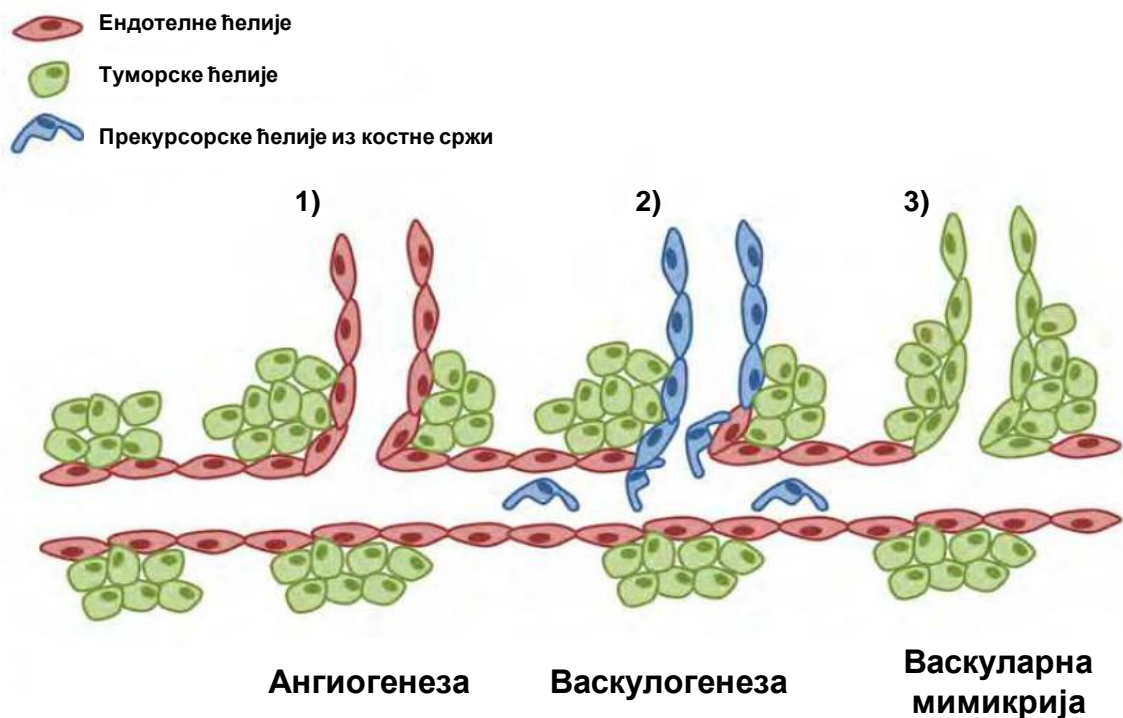
### 1.4.1. Механизми неоангиогенезе

Ангиогенеза је процес формирања нових из већ постојећих крвних судова и од суштинског је значаја за многе физиолошке процесе, укључујући ембрионални развој и зарастање ране (63), (64). Овај генетски програмиран и динамичан процес је под строгом контролом две врсте молекула, а то су са једне стране **проангиогени фактори** који стимулишу стварање нових крвних судова и са друге стране **антиангиогени фактори** који инхибирају ангиогенезу. Ангиогенеза се локално активира под утицајем стимулационих сигнала, а што каскадно покреће след кључних корака: 1) активацију ендотелних ћелија; 2) протеолитичку разградњу базалних мембрана посткапиларних венула и локалног ванћелијског матрикса; 3) пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија; 4) пупљење и раст ендотелних трака и формирање капиларних петљи; 5) матурацију и стабилизацију новонасталих крвних судова (65). Сви поменути кораци који се одигравају током физиолошке ангиогенезе су регулисани деликатном равнотежом између про- и анти-ангиогених фактора (66). Строго координисана и регулисана интеракција бројних ендогених про- и анти-ангиогених молекула резултује формирањем функционалног крвног суда. Међутим, дисбаланс, који се огледа у преваги проангиогених над антиангиогеним факторима, означен као "ангиогени свич", узрокује "непланску" ангиогенезу која значајно доприноси патогенези различитих болести (64).

**Неоангиогенеза (туморска ангиогенеза)** није тако "фино наштимован" процес као што је физиолошка ангиогенеза. У основи неоангиогенезе дешава се губитак како равнотеже тако и координисане интеракције молекула укључених у регулацију ангиогенезе што резултира прекомерним стварањем нових крвних судова у потки тумора, који су уз то фрагилни, повећано пропустљиви, неправилног изгледа и хаотичног распореда (67), (68). Мутације онкогена и/или антионкогена у туморским ћелијама су један од главних окидача за повећану и неконтролисану продукцију фактора раста крвних судова. На пример, познато је да генетске мутације *k-ras*, *raf* или *p53* резултују повећаном синтезом и секрецијом главног фактора раста васкуларног ендотела (енгл. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) (69) (70). Касније, у брзо растућим туморима, малигне ћелије су изложене различитим неповољним утицајима туморске микросредине, као што су хипоксија и метаболичка ацидоза.

Хипоксија је важно обележје микросредине многих солидних тумора која утиче на дисбаланс у продукцији про- и анти-ангиогених молекула што за последицу има повећано и брзо стварање нових крвних судова са хаотичним распоредом. Она је резултат структурних и функционалних абнормалности крвних судова, као и повећане потребе за кисеоником услед брзе пролиферације туморских ћелија (71), (72). У одсуству кисеоника, HIF-1 $\alpha$  (енгл. *Hypoxia inducible factor-1  $\alpha$* ) се стабилизује и транслоцира у једро туморских ћелија где се везује за HIF-1 $\beta$  (енгл. *Hypoxia inducible factor-1  $\beta$* ) са којим граде HIF комплекс. Овај комплекс функционише као транскрипциони фактор који повећава експресију гена за VEGF што последично подстиче неоангиогенезу (73), (74). На основу података из литературе може се закључити да је васкуларизација тумора најпре руковођена генетским мутацијама, а касније хипоксија и метаболичка ацидоза представљају важан стимулус за продукцију фактора раста крвних судова како у малигним ћелијама тако и у ћелијама туморске микросредине.

Тумори на више начина остварују сопствено снабдевање крвљу (Схема 2). Прво, туморске ћелије ослобађају факторе раста којима подстичу стварање нових крвних судова из постојећих капилара што је слично физиолошкој ангиогенези. Овакав начин снабдевања туморских ћелија кисеоником и хранљивим материјама је означен као **ангиогенеза- индукована тумором**. Друго, сматра се да тумор регрутује циркулишуће прекурсоре ендотелних ћелија из костне сржи које затим граде нове крвне судове у туморској потки. Овакав начин формирања нових крвних судова *de novo* означен је као **туморска васкулогенеза**. Треће, код неких врста тумора (нпр. меланома, глиобластома и саркома), малигне ћелије и макрофаги показују изражену пластичност односно способност да се трансдиферентују у ћелије сличне ендотелним ћелијама. На тај начин се формира сопствена васкуларна мрежа и овај феномен је познат као **васкуларна мимикрија** (75).



**Схема 2. Механизми којима се тумор снабдева крвљу** (кориговано према: *Burrell K. and Zadeh G. Chapter 1. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. In: Tumor Angiogenesis, Edited by Sophia Ran. InTech 2012.*).

Подаци из доступне литературе указују да специјална популација туморских ћелија, односно CSCs, такође промовишу васкуларизацију тумора. Наиме, показано је CSCs глиома пацова исказују VEGF и CXCL12 којима стимулишу регрутовање прекурсорских ендотелних ћелија из костне сржи у туморску микросредину (76). Сем тога, резултати неких студија сугеришу на то да су захваљујући трансдиференцијацији у ендотелне ћелије, CSCs важни учесници у васкуларној мимикрији у неким врстама тумора, укључујући глиом и лимфом (77), (78).

Добро је познато да је неоангиогенеза есенцијална у прогресији различитих врста тумора. Сем што допремањем кисеоника и хранљивих материја обезбеђују експанзиван раст солидних тумора, новоформиран крвни судови омогућују и хематогену дисеминацију туморских ћелија у удаљене органе.



#### 1.4.2. Улога VEGF и COX-2 у ангиогенези тумора

Идентификована је широка палета проангиогених фактора, укључујући факторе раста, адхезивне молекуле, ензиме ванћелијског матрикса, хемокине и цитокине који на директан и индиректан начин подстичу васкуларизацију тумора. Међу овим факторима, VEGF је главни учесник туморске ангиогенезе. Најпре је откривен као фактор васкуларне пропустљивости чији је ефекат на пропустљивост крвних судова чак 50 000 пута јачи у односу на хистамин, па се сматра одговорним не само за повећану пропустљивост туморских крвних судова, већ и за формирање асцитеса код пацијената са солидним туморима. VEGF, познат и као VEGF-A, је члан протеинске VEGF фамилије која обухвата: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и фактор раста плаценте (енгл. *Placental Growth Factor*, PlGF). VEGF је присутан у неколико изоформи које настају алтернативним сплајсингом РНК. Код људи најчешће изоформе су: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> и VEGF<sub>206</sub>. Кратке изоформе (VEGF<sub>121</sub> и VEGF<sub>165</sub>) су у циркулишућем облику и сматрају се главним медијаторима неоангиогенезе, док су дуге изоформе (VEGF<sub>189</sub> и VEGF<sub>206</sub>) везане или за површину ћелија или су секвестриране у ванћелијском матриксу и активирају се под утицајем протеаза ванћелијског матрикса (64). Овај фактор раста крвних судова продукују многе врсте ћелија, као што су туморске ћелије, макрофаги, глатко мишићне ћелије крвних судова и фибробласти. VEGF је повећано експримиран у многим карциномима код људи у односу на нормално ткиво.

VEGF је гликопротеин који је специфичан за ендотелне ћелије, а своје бројне ефекте на ове ћелије остварује везивањем за рецепторе VEGFR-1 (flt-1) или VEGFR-2 (flk-1) на њиховој површини. Рецептор VEGFR-2 је искључиво исказан на ендотелним ћелијама, док експресија VEGFR-1 није ограничена само на ендотелне ћелије, већ је исказан и на другим ћелијама: матичним и прекурсорским ћелијама костне сржи, ћелијама туморске строме, перицитима и глатко мишићним ћелијама, макрофагима и дендритским ћелијама (79). Везивањем за VEGFR-2 на ендотелним ћелијама, VEGF покреће бројне интрацелуларне сигналне путеве укључене у пролиферацију, преживљавање и миграцију ендотелних ћелија (80), (81). Сем што делује као хемоатрактант за ендотелне ћелије, VEGF стимулише миграцију прекурсорских ендотелних ћелија из костне сржи као и мононуклеарних и полимофонуклеарних леукоцита у туморску микросредину. У складу са тим, претпоставља се да доприноси миграцији и инвазији неких туморских ћелија (нпр. код карцинома дојке и леукемија)

(82), (83). Резултати неких истраживања показују да VEGF функционише као аутокрини фактор преживљавања туморских ћелија. Наиме, неутрализацијом овог фактора раста, односно давањем анти-VEGF антитела значајно је повећана апоптоза у линијама туморских ћелија мишићег и хуманог карцинома дојке (84). Сматра се да туморске ћелије, у неповољним условима као што су хипоксија и примена хемотерапије и радиотерапије, повећано секретују VEGF што их чини резистентним на ове неповољне утицаје (64).

*Beck* и сарадници (85) су показали да VEGF доприноси расту сквамозног карцинома коже тако што подстиче не само ангиогенезу већ и експанзију CSCs. Поред тога, примећено је да делеција гена за неуропилин-1 (енгл. *Neuropilin-1*, Nrp1), односно корцептора VEGF који промовише везивање VEGF за VEGFR-2, за последицу има губитак способности VEGF да промовише матичност и самообнављање CSCs коже. Овакав налаз расветљава двоструку улогу VEGF пореклом из туморских ћелија, који са једне стране паракрино подстиче ангиогенезу и на тај начин креира периваскуларну нишу за CSCs, док с друге стране директно делује на CSCs преко Nrp1 исказаног на њиховој површини чиме се успоставља аутокрини пут стимулације матичности и самообнаљања ових ћелија (85).

Циклооксигеназе катализују конверзију арахидонске киселине у простагландине. Најбоље проучене су две изоформе ензима: COX-1 (енгл. *Cyclooxygenase-1*) и COX-2 (енгл. *Cyclooxygenase-2*). COX-1 је конститутивно исказана на већини ћелија и експресија ове изоформе се повећава током малигне трансформације ћелије (68). "Housekeeping" функција COX-1 се огледа у њеном учешћу у продукцији мукуса и агрегацији тромбоцита (86). У физиолошким условима COX-2 није присутна у ћелијама, али се њена експресија рапидно повећава под утицајем фактора раста и медијатора запаљења (87), (88).

Резултати бројних истраживања показују да је повећана експресија COX-2 у већини тумора, укључујући карцином колона, простате, плућа, дојке, панкреаса и желуца, повезана са узнатредованим стадијумом и лошим исходом болести (89), (90), (91), (92). Многи аутори сматрају да је PGE2 (енгл. *Prostaglandin E2*) доминантан производ активности COX-2 у туморима (93). Резултати студија које се баве карциномом колона сугеришу на то да COX-2 и PGE2 редукују апоптозу туморских ћелија, као и да PGE2 позитивном повратном спрегом повећава експресију COX-2 у тумору (94).

Претпоставља се да COX-2 промовише ангиогенезу и да на тај начин подстиче малигни фенотип туморских ћелија (95). Регистровано је да експресија COX-2 корелира са повећаном микроваскуларном густином у експерименталном моделу карцинома колоне, плућа и желуца (96), (97). Уз наведено, уочено је да простагландини, а нарочито тромбоксан A2 и PGE2 повећавају неоангиогенезу (98). Изгледа да COX-2 пореклом из ендотелних ћелија и ћелија туморске строме модулира ангиогенезу. Регистрована је експресија овог ензима у туморским али не и у нормалним крвним судовима (96). *Murphy* и сарадници (99) су показали да инкубација ендотелних ћелија са рекомбинованим VEGF подстиче њихову пролиферацију и формирање капиларне цеви *in vitro*. Документовано је да VEGF овај ефекат остварује везивањем за VEGFR2 на ендотелним ћелијама што повећава експресију COX-2 и последично PGI2 у овим ћелијама. Коначан резултат ове координисане сарадње VEGF и COX-2 је пролиферација и миграција ендотелних ћелије и формирање нове капиларне цеви (99). Сличан је и налаз других студија које указују да VEGF индукујући формирање VEGFR1–VEGFR2 хетеродимера повећава продукцију PGI2, а активацијом PLC $\gamma$ -IP3/Ca<sup>2+</sup>-calcineurin–NFAT сигналног пута подстиче повећану експресију COX-2 (100), (101).

### 1.4.3. Механизми и медијатори неолимфангиогенезе

Лимфни судови представљају један од путева за дисеминацију туморских ћелија. Сматра се да туморске ћелије много лакше улазе у лимфне него у крвне судове што је условљено њиховим структурним разликама. У прилог томе је налаз дисконтинуиране и/или потпуно одсутне базалне мембране, као и одсуство перицита (потпорних ћелија) (102). На основу изнетог, спекулише се да лимфангиогенеза и ремоделовање постојећих лимфних судова су важни кораци у прогресији тумора (103).

Раније се сматрало да лимфни судови играју пасивну улогу у метастазирању тумора. Међутим, резултати експерименталних и клиничких истраживања указују да лимфни судови подлежу динамичним променама што истовремено олакшава метастазирање тумора. Ове промене подразумевају пораст броја новонасталих лимфних судова процесом **лимфангиогенезе** и **ремоделовање** односно **проширење постојећих лимфних судова** услед њихове хиперплазије (103). Претпоставља се да

поменути догађаји, који се дешавају како у примарном тумору тако и у сентинелним (стражарским) лимфним чворовима, фаворизују улазак туморских ћелија у мрежу лимфних судова што коначно олакшава успостављање метастаза у удаљеним органима (Схема 3) (104)

Слично ангиогенези, лимфангиогенеза је комплексан процес који подразумева координацију сложених целуларних догађаја, укључујући пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија и последично формирање капиларне цеви. Преживљавање, пролиферација и миграција ендотелних ћелија лимфних судова су централни догађаји у лимфангиогенези. Сматра се да су VEGF-C–VEGF-R3 и VEGF-D–VEGF-R3 сигнални путеви главни покретачи лимфангиогенезе. Наиме, VEGF-C и VEGF-D везујући се за рецептор VEGF-R3 на ендотелним ћелијама лимфних судова покрећу ERK-1 (енгл. *Extracellular Signal-regulated Kinase-1*) или ERK-2 (енгл. *Extracellular Signal-regulated Kinase-2*) сигналну каскаду зависну од протеин киназе-C, као и фосфорилацију Акт сигналног пута што резултује пролиферацијом, преживљавањем и миграцијом ендотелних ћелија лимфних судова (105), (106). Додатно, NRP-2 (енгл. *neuropilin- 2*), корецептор VEGF-R3, модулира све поменуте сигналне путеве у ендотелним ћелијама покренуте пролимафангиогеним факторима VEGF-C и VEGF-D (107), (108).

Познато је да туморске ћелије продукују читаву палету бројних фактора раста који директно или индиректно стимулишу лимфангиогенезу. Главни фактори који подстичу стварање нових лимфних судова су молекули VEGF-C и VEGF-D. Ови секретовани фактори раста, синтетисани су у форми пропептида које онда разграђују ензими ванћелијског матрикса и тако настају активне форме. Овако настале активне форме фактора раста се високим афинитетом везују за VEGF-R3 на површини ендотелних ћелија и на тај начин директно стимулишу лимфангиогенезу (109). Регистровано је да је експресија VEGF-C и VEGF-D често повећана у примарном тумору и његовој строми. Сем туморских ћелија, ове факторе раста лимфних судова секретују и канцер-асоцирани фибробласти (енгл. *Cancer associated fibroblasts, CAFs*), као и инфламацијске ћелије које инфилтришу туморску микросредину (110), (111).

У мишјем моделу карцинома коже где туморске ћелије повећано експримирају VEGF-C примећено је да повећан степен лимфангиогенезе, не само у туморском ткиву већ и у дренарајућим лимфним чворовима, позитивно корелира се лимфогеним метастазирањем тумора. Интересантно је и запажање да експанзија лимфних судова у сентинелним лимфним чворовима започиње пре него што туморске ћелије стигну до

њих. Претпоставља се да се VEGF-C из примарне туморске промене дренира у лимфне чворове где иницира лимфангиогенезу, а када стигну и туморске ћелије овај процес се додатно појачава (112). Сем тога, повећана експресија VEGF-C индукује и ремоделовање тумор-асоцираних лимфних судова што повећава проток лимфе и последично олакшава улазак туморских ћелија у лимфне судове (104). Показано је и да VEGF-C повећава пропустљивост лимфних судова што додатно фацилитира интравазацију и лимфогену дисеминацију туморских ћелија (113). Сличан налаз се описује и у другим мишијим моделима карцинома где повећана експресија VEGF-D у туморским ћелијама такође подстиче нелимфагангиогенезу и последично метастазирање туморских ћелија у лимфне чворове (114).

У складу са свим изнетим, може се закључити да лимфангиогенеза индукована тумором може да промовише дисеминацију туморских ћелија јер се са порастом броја новостворених лимфних судова повећава и вероватноћа уласка туморских ћелија у лимфни систем. Туморске ћелије користе исти образац за улазак у лимфни систем миграције као и активирани дендритске ћелије и наивни Т лимфоцити. Дакле овај улазак у лимфни чвор омогућује интеракција CCR-7 (енгл. *C-C chemokine receptor type-7*) са хемокином CCL21 (енгл. *chemokine C-C motif chemokine-21*) који је конститутивно експримиран како на ендотелу лимфних судова тако и у одређеном ћелијском одељку у лимфном чвору (115). Регистрована је повећана експресија хемокинског рецептора CCR7 у неколико линија туморских ћелија карцинома дојке и меланома. Примећено је да линија метастатских туморских ћелија меланома која експримира CCR7 стиче способност хемотаксе у правцу CCL21 *in vitro* и *in vivo* и то у правцу ендотелних ћелија лимфних судова које секретују CCL21 (116), (117). Тако на пример, повећана експресија CCR7 у B16 варијанти мишијег меланома промовише њено метастазирање у дренирајући лимфни чвор (118).

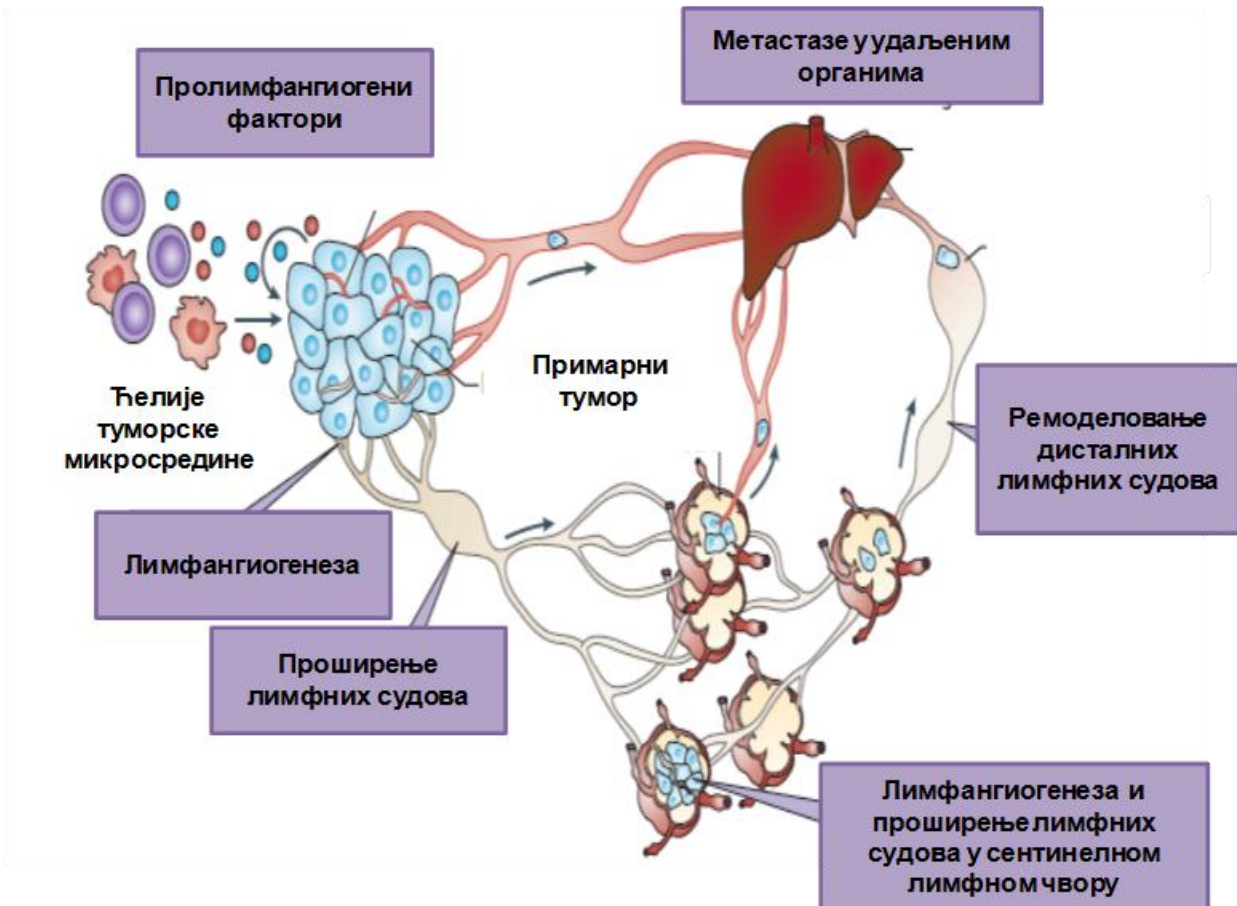


Схема 3. Промене у тумор-асоцираним лимфним судовима које олакшавају лимфогено метастазирање тумора (кориговано према: *Stacker SA, et al. Nat Rev Cancer 2014; 14(3):159-72.*)

Подаци из доступне литературе сугеришу да су простагландини укључени у неолимфангиогенезу тако што модулишу експресију VEGF-C. Туморске и имунске ћелије које исказују COX-2 и рецепторе за простагландине (нпр. EP2, EP3 и EP4) повећавају експресију VEGF-C у туморској микросредини и на тај начин подстичу лимфангиогенезу и лимфогено метастазирање *in vivo* (119), (120), (121). Друга студија описује још једну везу између простагландина и туморске лимфангиогенезе. Наиме, показано је да VEGF-D редукује експресију 15-PGDH (енгл. *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*), кључног ензима за деградацију простагландина. Услед пролонгираног излагања повећаној концентрацији простагландина, регулисано VEGF-D, дешава се проширење постојећих лимфних судова што све заједно утиче на пораст степена дисеминације туморских ћелија (122). Ефекат простагландина на лимфангиогенезу није специфичан само за тумор, већ ови продукти COX-2 могу да промовишу лимфангиогенезу и на терену инфламације (121).

## 2. ЦИЉ РАДА

Главни циљ истраживања је да се процени значај експресије VEGF, COX-2 и p27 за ангиогени и лимфангиогени профил папиларног карцинома штитасте жлезде, са посебним освртом на класичну и фоликуларну хистолошку варијанту папиларног карцинома.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. анализом експресије CD31, панмаркера ендотела крвних судова, одредити микроваскуларну густину и утврдити могућу везу са експресијом VEGF и COX-2 у папиларном карциному
2. анализом експресије D2-40, специфичног маркера ендотела лимфних судова, одредити густину лимфних судова и утврдити повезаност са експресијом COX-2
3. испитати повезаност густине крвних и лимфних судова, као и експресије VEGF и COX-2 са клиничким и патохистолошким параметрима папиларног карцинома
4. испитати значај експресије негативног регулатора ћелијског циклуса, p27, са клиничким и патохистолошким параметрима папиларног карцинома штитасте жлезде
5. одредити густину крвних и лимфних судова и испитати могућу везу између експресије VEGF и COX-2 и p27 у класичној и фоликуларној варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и на Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у Београду у периоду од 2009 до 2013. године, као и у периоду од 2016 до 2017. године.

Спровођење студије су одобрили Етички одбор Сектора за лечење Војномедицинске академије у Београду и Етички одбор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Пре започете студијске процедуре, испитаници су потписали образац сагласности за учешће у студији. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе.

#### 3.1. Испитивана популација

У студију је укључено 73 пацијента са папиларним карциномом штитасте жлезде који су оперативно лечени у Клиници за хирургију Војномедицинске академије у Београду, у периоду од 2009 до 2013. године, као и 11 пацијената са мултинодуларном струмом који су на истој клиници оперативно лечени у периоду од 2016. до 2017. године. Биолошки материјал добијен је приликом тоталне тиреоидектомије или лобектомије са или без учињене регионалне лимфаденоктомије. Оперативни материјал је након детаљног макроскопског описа обрађиван стандардном патохистолошком процедуром у Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у Београду.

Патохистолошка дијагноза и класификација тумора је учињена према морфолошким критеријумима Светске здравствене организације WHO (енгл. *World Health Organization*), а одређивање хистолошког субтипа папиларног карцинома и патолошког стадијума примарног тумора према TNM класификацији *American Joint Committee on Cancer and the International Union Against Cancer Committee, 7th edition*. У студију су укључени пацијенти са папиларним карциномом штитасте жлезде, који су на основу величине тумора класификовани у pT1, pT2 и pT3 стадијум.



Папиларни карциноми су даље на основу патохистолошких карактеристика (морфолошког изгледа и раста тумора) сврстани у четири хистолошке варијанте: класичну, фоликуларну, високоћелијску варијанту и микрокарцином.

Поред постављања дијагнозе помоћу микроскопског прегледа ткивних исечака обојених хематоксилином и еозином, анализирани су и други патохистолошки критеријуми тумора, као што су инвазија лимфних и крвних судова, леукоцитна инфилтрација, мултифокалност тумора, локална екстратироидна инвазија и дезмоплазија.

Смерница Јапанске институтске болнице за малигне болести (енгл. *The Cancer Institute Hospital of JRC, CIH*) сврстава пацијенте са РТС у две групе ризика. Групу високог ризика чине пацијенти са детектабилним удаљеним метастазама без обзира на године старости или пацијенти са 50 и више година код којих су присутни метастатски лимфни чворови величине  $\geq 3\text{cm}$  и/или екстратироидна инвазија тумора, док групу ниског ризика чине пацијенти који не испуњавају ни један од наведених критеријума (123). У овој студији није било испитаника са удаљеним метастазама и/или метастатским лимфним нодусима  $\geq 3\text{cm}$ , тако да су групу високог ризика чинили пацијенти са  $\geq 50$  година код којих је регистрована екстратироидна инвазија. Сви остали пацијенти сврстани су у групу ниског ризика.

Искључујући критеријуми за одабир испитаника су друге врсте тумора штитасте жлезде, као и оболели од папиларног карцинома развијеног на терену Хашимотовог тиреодитиса.

### **3.2. Истраживачки поступак**

За хистопатолошку и имунохистохемијску анализу ткиво штитасте жлезде је фиксирано 24 сата у 4% пуферисаном неутралном формалину, на собној температури. По завршеној фиксацији, исечци ткива су дехидрисани, просветљени и прожети парафином у апарату за аутоматску фиксацију ткивних узорака *Sacura V.I.P* и укалупљени у парафинске блокове. Парафински калупи су исечени на аутоматском, ротационом, микротому *Historange LKB* на резове дебљине  $4\mu\text{m}$ , а затим су потапани у воду на  $40^{\circ}\text{C}$  и на крају стављани на стаклене микроскопске плочице.

### 3.2.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Бојење парафинских ткивних пресека урађено је методом хематоксилин-еозин (*Hematoxylin-eosin*) по *Heidenhain*-у (124) и сагласно препорукама *Gurr*-а (125). Плочнице са ткивним пресецима пуферисане су у пуферу формалдехида 10 секунди, опране у текућој води, а затим су потопљене 2 минута у *Mayer*-ов хематоксилин (*Merck*). Потом су ткивни исечци испирани 1 минут у текућој води и најзад су бојени алкохолним еозином (*Merck*) у трајању од 1 минут. Након бојења уследила је дехидратација исечака како би се из њих уклонила вода. Другим речима, исечци су потапани у серију растућих концентрација етанола и то следећим редом: најпре 1 минут у 85% алкохолу, затим 2 пута по 50 секунди у 96% и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просветљавања када су исечци потопљени 50 секунди у мешавину ксилола и етанола у односу 1:1, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанета кап Канада балзама (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом након 24-часовног сушења.

### 3.2.2. Имунохистохемијска анализа експресије VEGF, CD31, COX-2, D2-40 и p27 у ткиву штитасте жлезде

За имунохистохемијску анализу, ткивни пресеци, претходно монтирани на адхерентне *SuperFrost*® плочице, су загрејани на температури од 56°C у трајању од 60 минута. У циљу депарафинизације и рехидратације плочице са ткивним пресецима су потапане најпре у ксилол, а затим у серију опадајућих концентрација етанола: два пута по 5 минута у апсолутном, а затим по 5 минута у 96%, 70% и на крају у 50% етанолу. У циљу демаскирања антигена, исечци ткива су грејани у микроталасној пећници и то у цитратном пуферу (pH= 6.0) у трајању од 21 минута. Након хлађења, препарати су интензивно испрани најпре у дестилованој, а затим су 3 пута по 10 минута инкубирани у PBS (енгл. *Phosphate Buffered Salline*). У циљу фиксације и пермеабилитације ткивних исечака, плочице са ткивним пресецима су потопљене у хладни ацетон на температури 4°C у трајању од 10 минута. Након истека инкубације, ткивни исечци су најпре испрани у PBS, а затим је у циљу да се блокира активност ендogene пероксидазе на њих стављено неколико капи *Hydrogen Peroxide Block*-а. Након инкубације од 10

минута на собној температури, препарати су два пута опрани у PBS, а онда је на њих додато неколико капи *Protein Block*-а који је после 10 минута инкубације испран једном у PBS. Након испирања, ткивни исечци су инкубирани са примарним антителима преко ноћи у влажној комори на температури од 4°C. Коришћена су одговарајућа мишја моноклонска и зечја поликлонска антитела која су у оптималном разблажењу (Табела 1) растворена у PBS-у са 1% BSA (енг. *Bovine serum albumin*).

Антитело	Порекло и врста	Произвођач	Каталогски број	Разблажење
D240	Mouse	Abcam	77854	1:200
VEGF	Mouse	Abcam	16883	1:200
COX-2	Rabbit	Abcam	15191	1:1000
p27	Rabbit	Abcam	7961	1:500
CD31	Rabbit	Abcam	28364	1:200

**Табела 1.** Основне карактеристике и разблажења коришћених примарних антитела

Након истека инкубације, ткивни исечци су испирани у PBS, а затим су за визуелизацију антигена коришћени одговарајући комерцијални детекциони китови: *Mouse specific HRP/DAB [ABC] Detection IHC Kit* (каталогски број ab64259; *Abcam*) и *Rabbit specific HRP-AEC Detection IHC Kit* (каталогски број ab94361; *Abcam*) у зависности од порекла примарног антитела.

За детекцију антигена које је засновано на примени моноклонских мишјих антитела, исечци ткива су инкубирани са одговарајућим секундарним антителом на собној температури и у влажној комори. Након инкубације, препарати су опрани у PBS, а онда је на ткивне исечке апликована *Streptavidin Peroxidase*-а. По истеку инкубације од 30 минута, уследило је троструко испирање, а затим је на ткивне исечке нанет DAB (енгл. *3,3'-diaminodbenzidine*) супстрат. Након развијања браон боје препарати су испрани три пута у дестилованој води и обојени хематоксилином по *Mayer*-у, а затим интензивно опрани текућом водом. Обојени исечци су покривени глицеролом и на крају покровном лъуспицом.

За детекцију антигена заснованог на примени зечјих поликлонских антитела коришћен је *Rabbit specific HRP-AEC Detection IHC Kit*. Најпре је на исечке ткива је нанета кап *Rabbit Specific HRP conjugate*. По истеку инкубације од 45 минута,

препарати су испрани у PBS, а затим је апликован *AEC Single Solution*. Након развијања црвене боје препарати су најпре испрани у дестилованој води, а затим обојени хематоксилином и интензивно опрани текућом водом. Обојени исечци су покривени глицеролом и покровном љуспицом. На крају, овако припремљени ткивни исечци су након 24-часовног сушења, анализирани светлосним микроскопом. Препарате су независно анализирала три истраживача.

***Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења.*** Сва имунохистохемијска бојења изведена су уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола, према стандардним пропозицијама UK NEQAS (енгл. *UK National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry*). Као позитивна контрола за тестирање специфичности примарних антитела коришћени су ткивни узорци за које се сигурно зна да исказују испитиване антигене: исечци ткива карцинома дебелог црева (за анти-VEGF и COX-2 антитела), коже (за анти-D2-40 и CD-31 антитела) и лимфног чвора (за анти- p27 антитело). Третирани су на исти начин као и испитивани узорци у овом истраживању. Као негативна контрола у току имунохистохемијског бојења послужили су узорци ткива третирани индиферентним пуфером који нема афинитет везивања за анализиране антигене.

***Евалуација експресије испитиваних белега у ткиву папиларног карцинома штитасте жлезде и мултинодуларне струме.*** Експресија VEGF, COX-2 и p27 у циљаним ткивима је анализирана коришћењем семиквантитативног скор система базираног на проценту обележених туморских ћелија. Поштујући критеријум за процену експресије протеина који је коришћен у студији Радосављевић и сарадника (126), скор експресије је оцењиван на основу процента обојених ћелија у односу на укупан број евалуираних ћелија. Експресија маркера је дефинисана као позитивна уколико је >10% ћелија било обележено и негативно ако је у лезијама било обележено ≤ 10% ћелија.

***Квантификација густине крвних и лимфних судова у ткиву штитасте жлезде и мултинодуларне струме.*** Микроваскуларна густина (енгл. *Microvascular vessel density*, MVD) је процењена анализом експресије панмаркера ендотелних ћелија крвних судова- CD31. Црвено обојене, појединачне или груписане ендотелне ћелије, јасно одвојене од суседних ћелија и ткивних елемената су дефинисане као крвни судови.

Коришћењем микроскопских увећања од 40x и 100x, у сваком исечку селектована су најпре по три "врућа жаришта" (енгл. *"hot spots"*) тј. поља са највећим бројем крвних судова. Затим су у тим жариштима, на увећању 200x, избројане како појединачне тако и груписане обојене ћелије. За сваког испитаника MVD је представљена као средња вредност избројаних крвних судова у три одабрана микроскопска фокуса (127).

Густина лимфних судова (енгл. *Lymphatic vessel density, LVD*) је одређена на основу експресије специфичног маркера ендотелних ћелија лимфних судова D2-40. Обележене појединачне ендотелне ћелије и груписане обојене ћелије које су јасно одвојене од суседних ћелија и ткивних елемената дефинисане су као лимфни судови. Слично као и приликом одређивања густине крвних судова, најпре су селектована три "врућа поља" на микроскопском увећању 40x и 100x, а затим су у овим изабраним фокусима, на увећању 200 x, избројане појединачне и груписане обојене ћелије. На крају је LVD представљена као средња вредност избројаних лимфних судова у три одабрана микроскопска фокуса за сваког испитаника (128).

### 3.3. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем софтверског пакета *IMB SPSS Statistics* верзија 20. Добијени резултати су груписани и приказани, табеларно и графички. За утврђивање мера централне тенденције и варијабилитета коришћене су методе дескриптивне статистике. Резултати су приказани као средње вредности (енгл. *mean*), минимум, максимум и проценти.

Пре статистичке обраде података, најпре је испитано да ли добијене вредности имају нормалну расподелу. Нормалност расподеле унутар група анализирана је *Kolmogorov-Smirnov*-им тестом. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је *Student's*-ов тест, док у случају да вредности нису имале нормалну расподелу, коришћен је непараметријски *Mann-Whitney* тест. За утврђивање зависности између варијабли коришћен је *Rank Sum*-ов тест и  $\chi^2$  тест. Могућност да нека променљива буде маркер испитивана је помоћу криве оперативне карактеристике примаоца (енгл. *Receiver operating characteristic curve, ROC curve*), при чему су, за погодно утврђен *cut-off*, одређивани сензитивност и специфичност. Статистичке анализе су урађене са интервалом поверења од 95%. За статистички значајну разлику у добијеним вредностима сматра се када је  $p < 0.05$ , док је статистички веома значајна разлика када је  $p < 0.01$ .

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Клиничке и патолошке карактеристике испитаника оболелих од папиларног карцинома штитасте жлезде

У студију је било укључено 73 испитаника са папиларним карциномом штитасте жлезде (енгл. *Papillary thyroid carcinoma*, РТС), односно 59 (80.8%) пацијената женског и 14 (19.2%) мушког пола (Табела 1). Старосна доб је један од важних фактора ризика како за настанак тако и за прогресију и исход болести (129). Табела 1 приказује старосну структуру испитаника. Јасно се види да је већина испитаника укључених у ову студију, била стара 50 и више година.

Параметар	Испитаници		
	N=73	%	
Старост	<50 година	26	35.6
	≥50 година	47	64.4
Пол	Мушкарци	14	19.2
	Жене	59	80.8
Хистолошка варијанта карцинома	Класични	16	21.9
	Фоликуларни	43	58.9
	Високоћелијски	4	5.5
	Микрокарцином	10	13.7

**Табела 1.** Демографске и хистолошке карактеристике испитаника оболелих од папиларног карцинома штитасте жлезде

На основу класификације Светске здравствене организације WHO (енгл. *World Health Organisation*) (130) одређене су четири хистолошке варијанте папиларног карцинома штитасте жлезде (Табела 1). Све хистолошке варијанте папиларног карцинома имају исти карактеристичан “нуклеарни сет“ који укључује светло једро изгледа “мутног стакла“ са нуклеарним усецима и инклузијама, док се међусобно разликују по начину раста и морфологији тумора (130). Па се тако, у класичном типу папиларног карцинома штитасте жлезде (енгл. *Classic variant of papillary thyroid carcinoma*, CV-РТС) региструју разгранате папиларне структуре са једним редом туморских ћелија и централном фиброваскуларном стромом, док се у фоликуларној варијанти РТС (енгл. *Follicular variant of papillary thyroid carcinoma*, FV-РТС) туморске ћелије организују у мање и веће фоликуларне структуре. Високоћелијски тип РТС

карактерише присуство туморских ћелија чија је висина најмање два пута већа од ширине. Папиларни микрокарцином (енгл. *Papillary microcarcinoma*, PCM) је дефинисан као карцином величине  $\leq 1$  cm (130).

Мултифокалност РТС се дефинише присуством два или више фокуса малигно измењеног ткива унутар штитасте жлезде. Дезмопластична реакција (дезмоплазија) представља реактивну туморску строму коју чине: измењени канцер-асоцирани фибробласти који личе на миофибробласте, крвни судови, инфламацијске ћелије и компоненте екстрацелуларног матрикса. Протокол CAP (енгл. *College of American Pathologist, AJCC/UICC TNM, 7th edition*) одређује клиничке и патолошке параметре, као могуће али не и апсолутне предикторе прогресије болести и лошег исхода. То су: инвазија лимфних и крвних судова, мултифокалност, локална екстратироидна инвазија, дезмоплазија и одређивање степена ризика (131), (123).

Сви до сада поменути патохистолошки и клинички параметри папиларног карцинома приказани су у Табели 2.

Параметар	Испитаници	
	N=73	%
Ризик <sup>а</sup>	<i>Низак</i>	65 89.0
	<i>Висок</i>	8 11.0
Васкуларна инвазија	<i>Одсутна</i>	61 83.6
	<i>Присутна</i>	12 16.4
Инвазија лимфних судова	<i>Одсутна</i>	16 21.9
	<i>Присутна</i>	57 78.1
Локална екстратироидна инвазија	<i>Одсутна</i>	64 87.7
	<i>Присутна</i>	9 12.3
Мултифокалност	<i>Одсутна</i>	31 42.5
	<i>Присутна</i>	42 57.5
Дезмопластична реакција	<i>Оскудна</i>	35 48.0
	<i>Умерена</i>	20 27.4
	<i>Наглашена</i>	18 24.6

<sup>а</sup> У овој студији групу високог ризика су чинили пацијенти са  $\geq 50$  година код којих је детектована екстратироидна инвазија. Сви остали пацијенти сврстани су у групу ниског ризика

**Табела 2.** Клинички и патохистолошки профил папиларног карцинома штитасте жлезде.

## 4.2. Микроваскуларна густина у зависности од клиничких и патолошких карактеристика карцинома

Неоангиогенеза је битан процес за прогресију већине солидних тумора. Стога, циљ студије је био да се испита степен ангиогенезе у папиларном карциному штитасте жлезде. Најчешћи метод за семиквантитативну процену ангиогенезе је одређивање микроваскуларне густине (енгл. *Microvessel density*, MVD).

Запажено је да су новонастали крвни судови доминантно локализовани у туморском ткиву. У Табели 3 приказане су вредности MVD у зависности од клиничких и патохистолошких карактеристика РТС. Према студији *Sugitani* и сарадника (123), а поштујући критеријуме СИН, испитаници су сврстани у групу са ниским и са високим ризиком.

Параметар	N	MVD	
		Просечан бр. крвних судова $\pm$ SD	
Степен ризика	<i>Низак</i>	65	2.84 $\pm$ 3.56
	<i>Висок</i>	8	7.75 $\pm$ 7.52
Инвазија крвних судова	<i>Одсутна</i>	61	3.03 $\pm$ 4.35
	<i>Присутна</i>	12	5.08 $\pm$ 3.57
Локална екстратироидна инвазија	<i>Одсутна</i>	64	2.88 $\pm$ 3.60
	<i>Присутна</i>	9	6.83 $\pm$ 6.85
Мултифокалност	<i>Одсутна</i>	31	2.41 $\pm$ 2.84
	<i>Присутна</i>	42	4.08 $\pm$ 5.00
Дезмопластична реакција	<i>Оскудна</i>	35	1.83 $\pm$ 2.55
	<i>Умерена</i>	20	5.46 $\pm$ 6.20
	<i>Наглашена</i>	18	4.04 $\pm$ 3.31

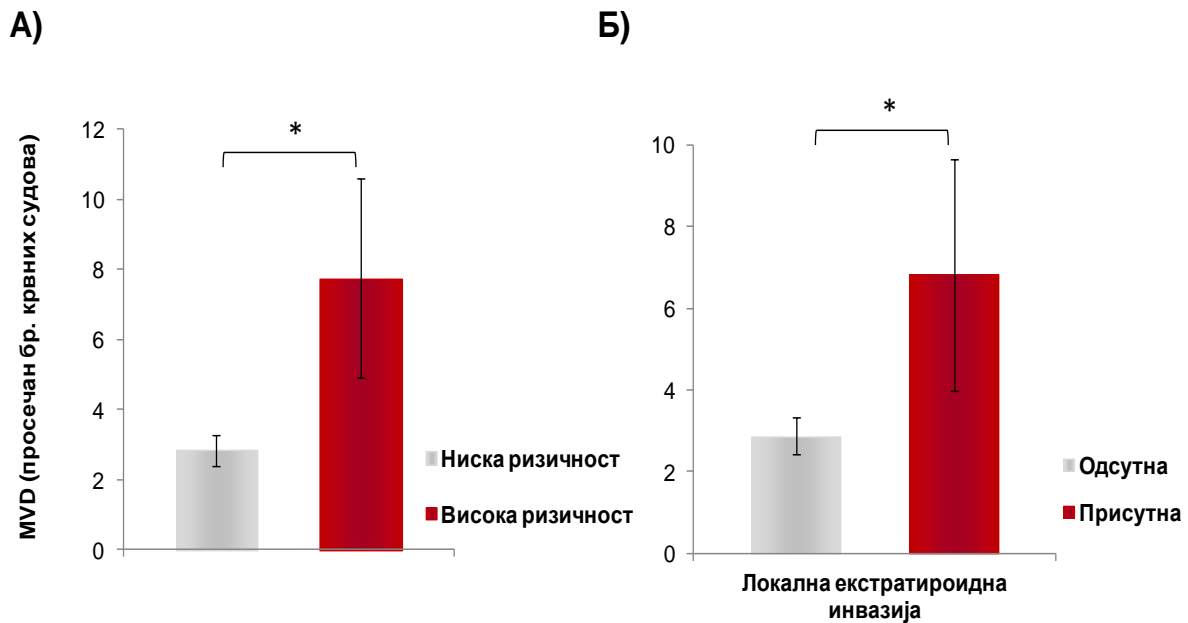
Код 73 испитаника са РТС анализирана је микроваскуларна густина у односу на клиничке и патолошке параметре карцинома

**Табела 3.** Густина крвних судова у зависности од клиничких и патолошких карактеристика карцинома.

С обзиром на то да испитаници нису имали удаљене метастазе нити метастатске лимфне жлезде једнаке и веће од 3 cm, групу високог ризика чинили су пацијенти са 50 година и старији, код којих је регистрована локална екстратироидна инвазија, док су испитаници млађи од 50 година са/или без локалне екстратироидне инвазије сврстани у



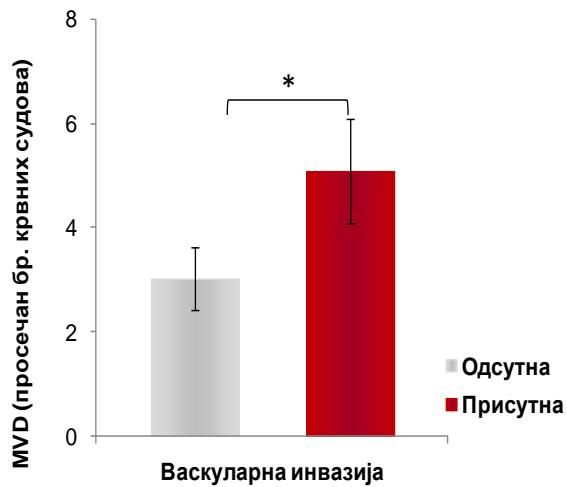
групу ниског ризика. Резултати јасно показују да је MVD значајно већа у групи високог ризика ( $p < 0.05$ ; Графикон 1А). Додатно, забележена је статистички значајно већа MVD код пацијената са присутном локалном екстратироидном инвазијом у поређењу са пацијентима код којих није регистрована локална екстратироидна инвазија РТС ( $p < 0.05$ ; Графикон 1Б).



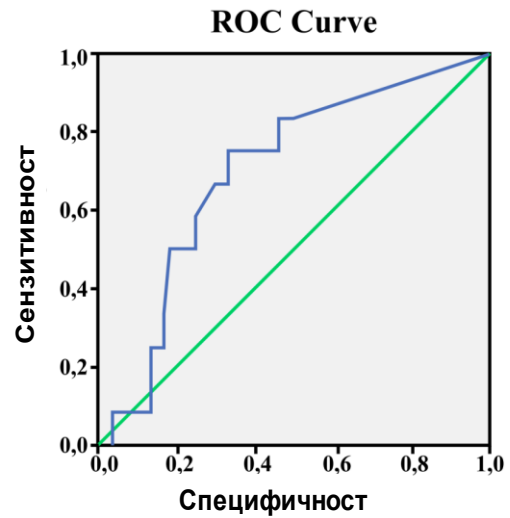
**Графикон 1. MVD као фактор повећаног ризика за локално ширење и потенцијалну прогресију карцинома.** А) Повећана микроваскуларна густина забележена је код оболелих од РТС са високим ризиком (*Student's t* тест,  $p=0.037$ ); Б) Истовремено, микроваскуларна густина је статистички значајно већа у групи пацијената са присутном локалном екстратироидном инвазијом (*Student-ов t* тест,  $p=0.033$ ). Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

Даљом анализом повезаности MVD са инвазијом туморских ћелија у локалне крвне судове, примећено је да је MVD значајно већа у карциномима са детектабилном васкуларном инвазијом у поређењу са карциномима у којима микроскопском анализом није регистрована инвазија туморских ћелија у крвне судове ( $p < 0.05$ ; Графикон 2А). Уз то, добијени резултати упућују да MVD може да послужи као маркер за детерминацију васкуларне инвазије што је приказано ROC кривом (сензитивност 75%, специфичност 67.2%, *cut -off* 3.88; Графикон 2Б)

А)



Б)

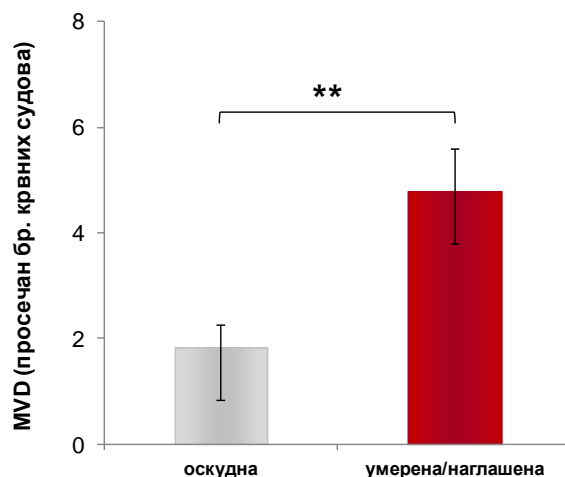


**Графикон 2. Веза MVD са васкуларном инвазијом РТС.** А) Микроваскуларна густина је статистички значајно већа у карциномима код којих је регистрована инвазија туморских ћелија у крвне судове у поређењу са карциномима без детектоване васкуларне инвазије (*Student*-ов *t* тест,  $p=0.022$ ). На графикону је приказана средња вредност  $\pm$  стандардна грешка; Б) На ROC криви региструје се умерена сензитивност (75%) и специфичност (67.2%) са *cut off* 3.88, што указује на значај MVD као могућег предиктивног маркера за васкуларну инвазију.

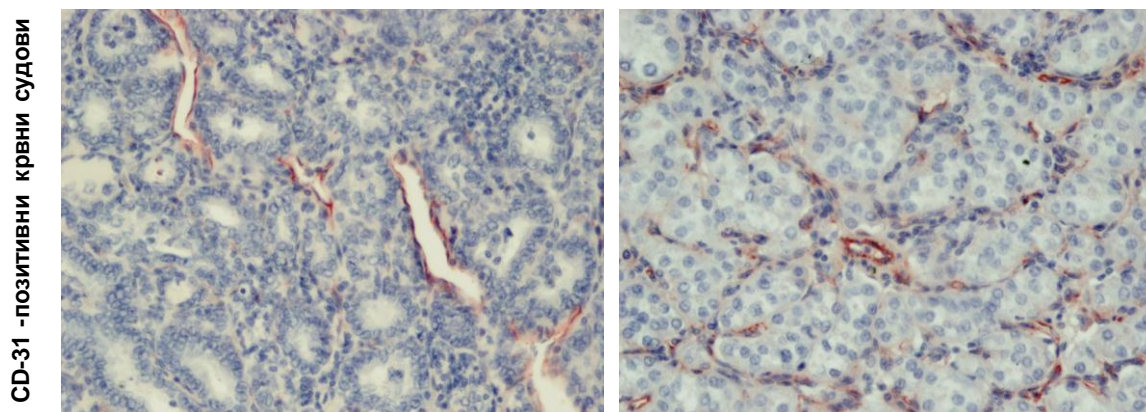
Уочава се и да је у папиларном карциному штитасте жлезде са умереном и наглашеном дезмопластичном реакцијом, просечан број крвних судова статистички значајно већи у односу на карцином са оскудном дезмоплазијом (Графикон 3А).

На основу налаза повећане MVD у групи испитаника са високим ризиком, као и у групи РТС са васкуларном и локалном екстратироидном инвазијом, очигледно је да локално ширење, а потенцијално и прогресија папиларног карцинома штитасте жлезде зависе од процеса ангиогенезе.

А)



Б)



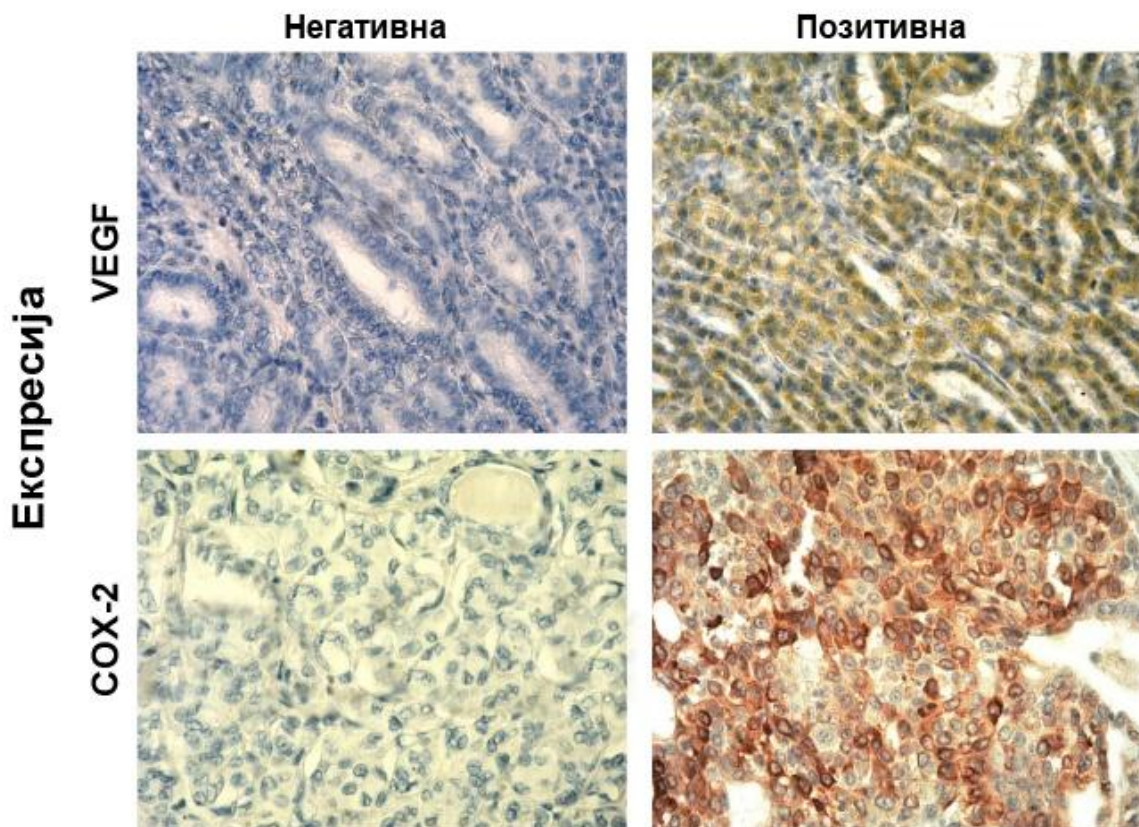
Дезмопластична реакција

Графикон 3. Веза MVD са дезмоплазијом РТС. А) Микроваскуларна густина је статистички значајно већа у папиларном карциному штитасте жлезде са умереном или наглашеном дезмопластичном реакцијом у односу на карцином са детектабилном оскудном дезмоплазијом (*Student*-ов t тест,  $p=0.003$ ). На графикону је представљена средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Б) Имунохистохемијска процена MVD. За сваког пацијента микроваскуларна густина је представљена као средња вредност избројаних крвних судова у три одабрана микроскопска фокуса (енгл. "hot spots"). Након израчунавања медијане, испитаници су подељени у групе са мањом (лево) и већом (десно) MVD (оригинално увећање 200x).

#### 4.3. Евалуација ангиогеног фенотипа папиларног карцинома штитасте жлезде на основу експресије VEGF и COX-2

Да би се боље разумели потенцијални механизми ангиогенезе у папиларном карциному штитасте жлезде, следећи корак у истраживању је био да се анализира повезаност микроваскуларне густине са експресијом проангиогених фактора: VEGF и COX-2. Експресија VEGF и COX-2 у циљаном ткиву је анализирана имунохистохемијском методом, при чему је коришћен семиквантитативни скор систем базиран на проценту обележених туморских ћелија. Поштујући критеријум за процену

експресије протеина (126), папиларни карциноми штитасте жлезде су класификовани у групу са позитивном (>10% обележених туморских ћелија) и групу са негативном експресијом анализираних проангиогених фактора ( $\leq 10\%$  обележених туморских ћелија). Експресија протеина VEGF и COX-2 у циљаном ткиву је илустрована на Сlici 1. Није забележена статистички значајна разлика у експресији ових проангиогених фактора између туморске микросредине и њене околине (податак није приказан).



**Слика 1. Експресија VEGF и COX-2 у папиларном карциному штитасте жлезде.** У горњем панелу слике приказан је РТС са негативном и позитивном експресијом VEGF, док је у доњем панелу илустрован карцином са негативном и позитивном експресијом COX-2. У десном панелу уочава се изражена цитоплазматска и мембранска експресија VEGF и COX-2 у туморским ћелијама (оригинално увећање 200x).

Након добијених података о броју крвних судова за сваког испитаника, израчуната је и медијана. Медијана крвних судова код оболелих од РТС је износила 3.00, са опсегом интерквартила од 0 до 5.58. Поштујући овај критеријум, сви испитаници су категорисани у две групе: групу испитаника са већом микроваскуларном густином (број крвних судова већи од вредности медијане) и групу испитаника са мањом микроваскуларном густином (број крвних судова мањи или једнак вредности медијане) (132). Репрезентативни пресеци туморског ткива са мањом (леви панел) и већом (десни панел) густином крвних судова приказани су на Графикону 3Б.

Као што се види у Табели 4, већа MVD је значајно повезана са позитивном експресијом VEGF ( $p=0.007$ ), али не и са експресијом COX-2 ( $p>0.05$ ). Ова статистичка значајност тестирана је  $\chi^2$  тестом.

Анализирана је и повезаност експресије VEGF и COX-2 истовремено како са старосном доби пацијената према претходно поменутиим смерницама *СИH*, тако и са величином тумора према критеријуму pT класификације (*AJCC/UICC TNM, 7th edition*). Дистрибуција испитаника у зависности од величине тумора и старосне доби приказана је у Табели 5.

Маркер		Испитаници (N)	MVD		P-вредност
			Мања	Већа	
VEGF (експресија)	Негативна	53	33	20	0.007 <sup>a</sup>
	Позитивна	18	5	13	
COX-2 (експресија)	Негативна	33	19	14	НС
	Позитивна	36	17	19	

<sup>a</sup> Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом

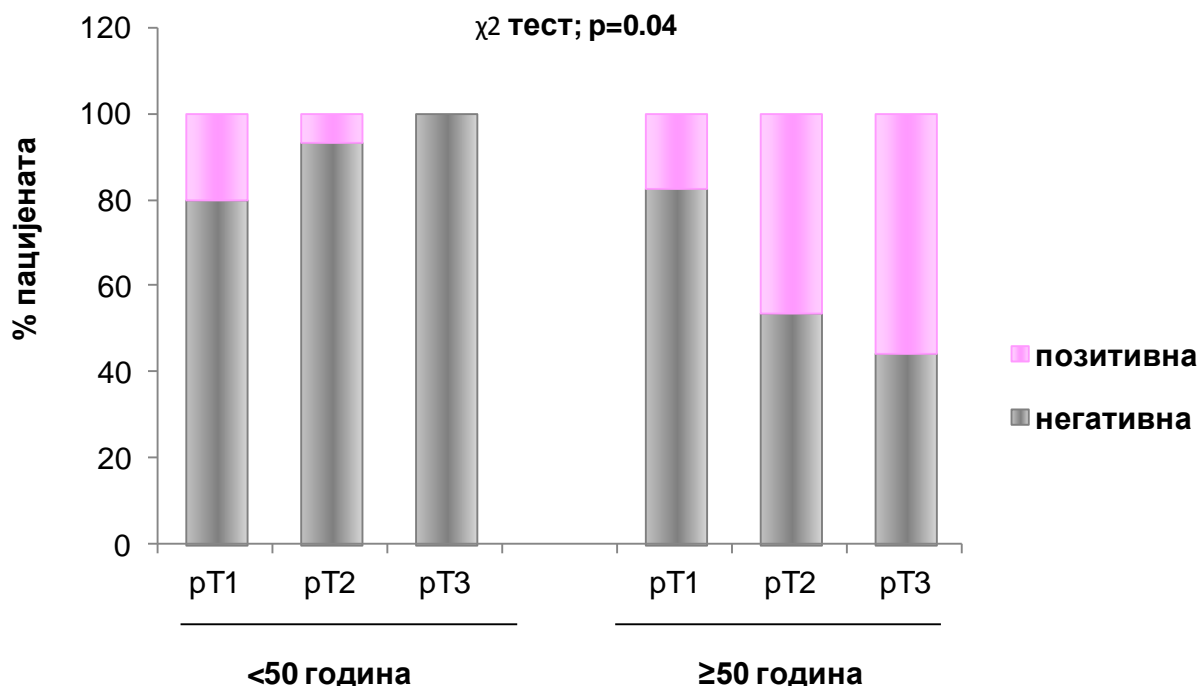
Табела 4. Однос MVD и експресије VEGF и COX-2.

Параметар		Испитаници	
		N=73	%
Величина тумора (pT)	<b>≤2cm (pT1)</b>	<b>34</b>	<b>46.6</b>
	<50 година	10	13.7
	≥50 година	24	32.9
	<b>2-4cm (pT2)</b>	<b>29</b>	<b>39.7</b>
	<50 година	15	20.5
	≥50 година	14	19.2
	<b>&gt;4cm (pT3)</b>	<b>10</b>	<b>13.7</b>
	<50 година	1	1.4
	≥50 година	9	12.3

Табела 5. Дистрибуција испитаника у зависности од величине тумора и година старости.

Уочена је значајно повећана фреквенца позитивне експресије VEGF међу испитаницима са 50 и више година старости са пречником тумора већим од 2cm и 4cm (у pT2 и pT3 стадијуму) (Графикон 4).

## Експресија VEGF

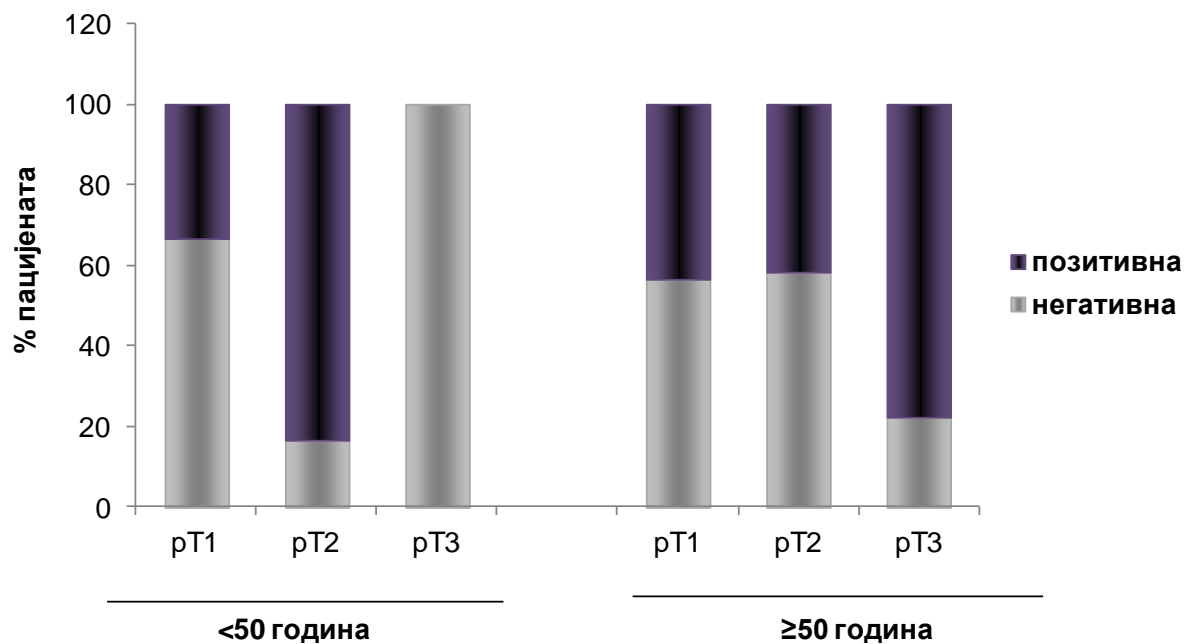


**Графикон 4. Експресиони профил VEGF у зависности од старосне доби испитаника и величине тумора.** На основу семиквантитативног скор система базираног на проценту обележених туморских ћелија, сви pTc су категорисани у групу карцинома са позитивном експресијом VEGF (>10% позитивних ћелија) и у групу са негативном експресијом VEGF (≤10% позитивних ћелија). Постоји статистички значајно повећана фреквенца позитивне експресије VEGF међу пацијентима са ≥50 година код којих пречник тумора већи од 2 cm и 4cm (са pT2 и pT3 стадијумом) ( $p=0.04$ ). Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом.

Примећена је и статистички значајна повезаност експресије COX-2 са старосном доби и величином тумора. Другим речима, забележена је повећана фреквенца позитивне експресије COX-2 међу испитаницима са 50 и више година старости код којих је пречник тумора био већи од 4cm (у pT3 стадијуму). Ако се пореди група испитаника у pT2 стадијуму папиларног карцинома, уочава се повећана фреквенца позитивне експресије COX-2 међу млађима од 50 година, док је ова фреквенца смањена међу оболелима са 50 и више година старости (Графикон 5).

## Експресија СОХ-2

$\chi^2$  тест;  $p=0.05$



**Графикон 5. Експресија СОХ-2 у зависности од старосне доби испитаника и величине карцинома штитасте жлезде.** На основу семиквантитативног скор система базираног на проценту обојених туморских ћелија, сви РТС су сврстани у групу са позитивном експресијом СОХ-2 (>10% позитивних ћелија) и у групу са негативном експресијом СОХ-2 ( $\leq$ 10% позитивних ћелија). Постоји статистички значајна повезаност експресије СОХ-2 са старосном доби и величином тумора. Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом.

У овој студији није забележена статистичка значајна повезаност експресије VEGF и СОХ-2 са осталим клиничким и патолошким карактеристикама папиларног карцинома штитасте жлезде (Табела 6).

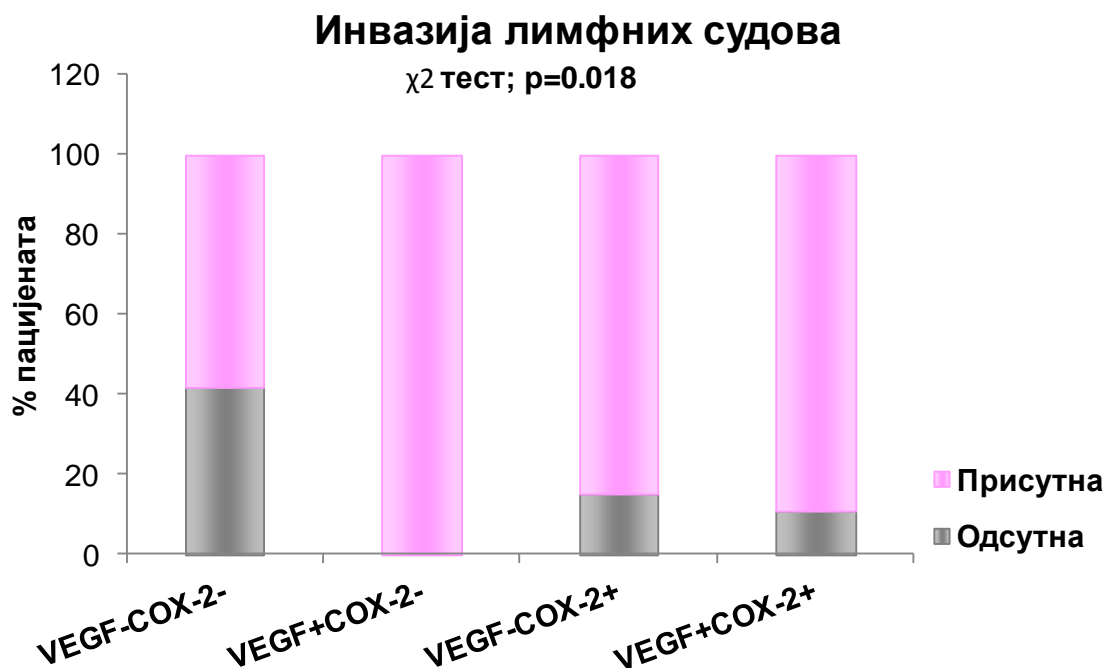


Параметар		Експресија VEGF (*N=71)		Експресија COX-2 (*N=69)		P вредност
		Негативна	Позитивна	Негативна	Позитивна	
Ризичност	<i>Ниска</i>	49	14	31	31	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Висока</i>	3	5	2	5	
Инвазија лимфних судова	<i>Одсутна</i>	14	1	11	5	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Присутна</i>	38	17	22	31	
Инвазија крвних судова	<i>Одсутна</i>	45	14	29	30	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Присутна</i>	8	4	4	6	
Локална екстратироидна инвазија	<i>Одсутна</i>	48	14	30	30	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Присутна</i>	5	4	3	6	
Мултифокалност	<i>Одсутна</i>	23	7	13	17	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Присутна</i>	30	11	20	19	
Дезмопластична реакција	<i>Оскудна</i>	29	6	19	14	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Умерена</i>	13	6	8	11	
	<i>Наглашена</i>	11	6	6	11	

\*При имунохистохемијском бојењу, због техничких разлога, из анализе су искључени пресеци ткивних исечака, два испитаника за VEGF и четири испитаника за COX-2. Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом.

**Табела 6.** Експресија VEGF и COX-2 у зависности од клиничких и патолошких карактеристика РТС.

Са циљем да се даље анализира значај експресије VEGF и COX-2 у папиларном карциному штитасте жлезде, испитаници су на основу истовремене експресије, VEGF и COX-2, сврстани у следеће групе: VEGF<sup>-</sup>COX-2<sup>-</sup>, VEGF<sup>+</sup>COX-2<sup>-</sup>, VEGF<sup>-</sup>COX-2<sup>+</sup> и VEGF<sup>+</sup>COX-2<sup>+</sup>. Резултати показују да је позитивна експресија, како VEGF тако и COX-2, значајно повезана са повећаним процентом пацијената код којих је регистрована инвазија туморских ћелија у лимфне судове (Графикон 6). Овакав налаз јасно указује на то да су VEGF и COX-2 заједно или самостално повезани са инвазивним потенцијалом папиларног карцинома штитасте жлезде.

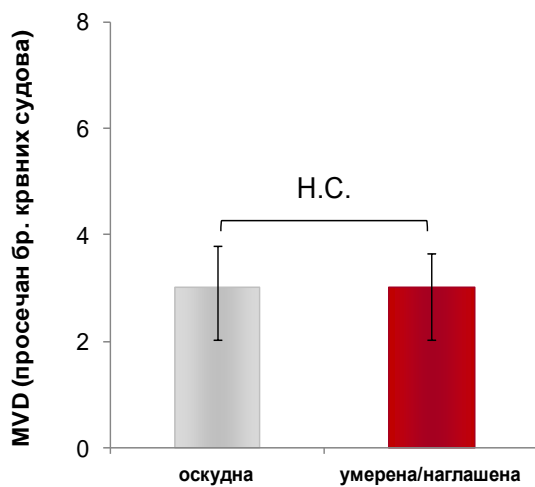


**Графикон 6. Повезаност експресије VEGF и COX-2 са инвазивношћу туморских ћелија у лимфне судове.** Према унапред утврђеним критеријумима верификована је експресија VEGF и COX-2. Затим су на основу истовремено позитивне или негативне експресије VEGF и COX-2 испитаници сврстани у следеће групе: VEGF<sup>-</sup>COX-2<sup>-</sup>, VEGF<sup>+</sup>COX-2<sup>-</sup>, VEGF<sup>-</sup>COX-2<sup>+</sup> и VEGF<sup>+</sup>COX-2<sup>+</sup>. Запажа се да је позитивна експресија, како VEGF тако и COX-2, значајно повезана са повећаним процентом пацијената код којих је регистрована инвазија туморских ћелија у лимфне судове ( $p=0.018$ ). Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом.

#### 4.4. Микроваскуларна густина и експресија VEGF и COX-2 у зависности од интратуморске и перитуморске инфилтрације леукоцита

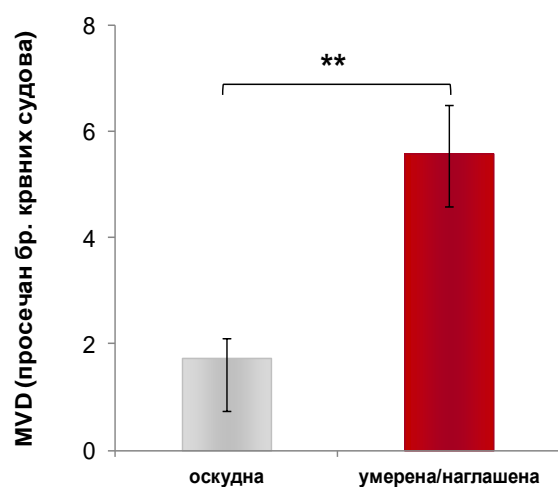
У даљем току истраживања анализирана је повезаност микроваскуларне густине са пери-туморском и интра-туморском леукоцитном инфилтрацијом. Није уочена статистички значајна разлика у MVD између групе РТС са оскудном и групе са умереном и наглашеном инфилтрацијом леукоцита у околини туморског ткива (Графикон 7А). Ако се пак пореди MVD код РТС са инфилтрацијом леукоцита у туморској микросредини, регистрована је значајно већа MVD у групи са умереном или наглашеном интратуморском инфилтрацијом леукоцита у поређењу са групом РТС код којих је детектована оскудна инфилтрација леукоцита у туморском ткиву (Графикон 7Б).

**А)**



**Перитуморска инфилтрација леукоцита**

**Б)**

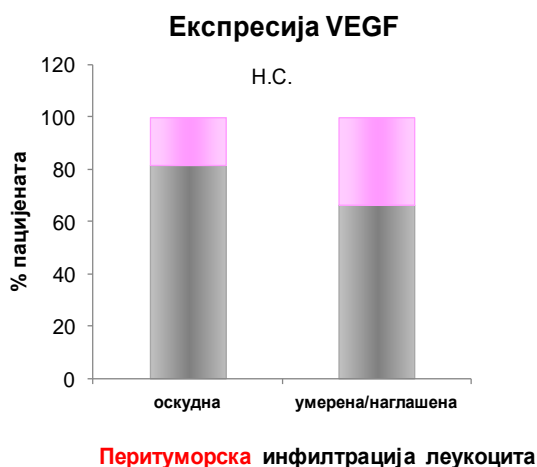


**Интратуморска инфилтрација леукоцита**

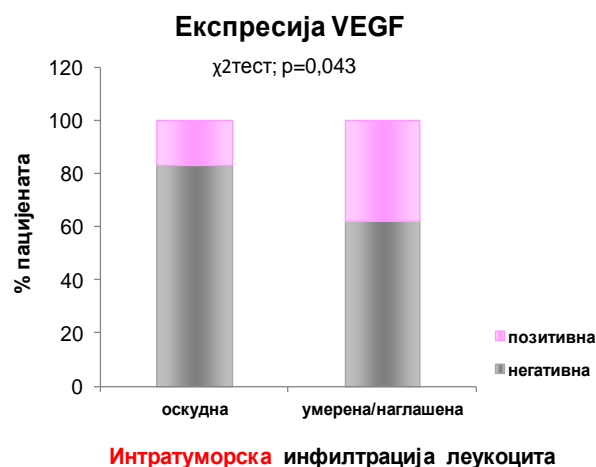
**Графикон 7. Однос MVD и перитуморске и интратуморске инфилтрације леукоцита.** Према унапред утврђеним критеријумима одређена је MVD. На основу интензитета леукоцитног инфилтрата у туморској микросредини и у њеној околини, РТС су сврстани у групу са оскудном и са умереном/наглашеном инфилтрацијом леукоцита; **А)** Густина крвних судова је приближно иста у обе испитиване групе ( $p > 0.05$  или скр. Н.С. - није сигнификантно); **Б)** Региструје се статистички значајно повећана MVD у РТС са умереном/наглашеном интратуморском инфилтрацијом (\*\* $p = 0.000$ ). На оба графика приказана је средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Статистичка значајност је одређена *Student*-овим t тестом.

Даља анализа експресије протеина VEGF у зависности од степена пери- и интра-туморске инфламације указала је да не постоји статистички значајна повезаност позитивне експресије VEGF са перитуморском инфилтрацијом (Графикон 8А). Међутим, забележено је да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF већа у групи РТС са умереном или наглашеном инфилтрацијом леукоцита у поређењу са групом код којих је присутна оскудна инфилтрација у туморском ткиву (Графикон 8Б).

А)



Б)

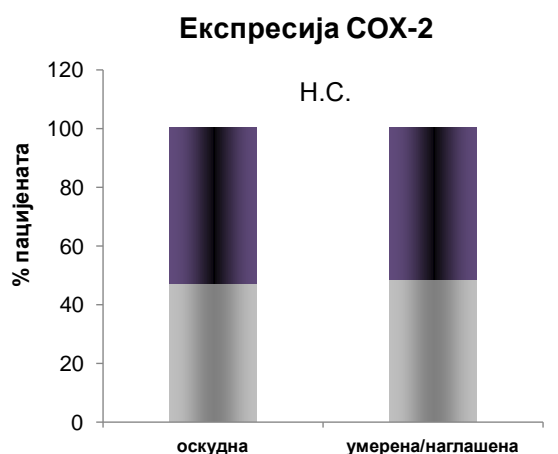


**Графикон 8. Процена експресије VEGF у односу на перитуморску и интратуморску инфилтрацију леукоцита.** Према унапред утврђеним критеријумима квантификована је експресија VEGF. На основу интензитета леукоцитног инфилтрата у туморској микросредини и у њеној околини, РТС су сврстани у групу са оскудном и са умереном/наглашеном инфилтрацијом леукоцита; **А)** Фреквенца позитивне експресије VEGF је већа у групи РТС са умереном/наглашеном перитуморском инфилтрацијом леукоцитима у односу на групу са оскудном инфилтрацијом, али овакав пораст није достигао ниво статистичке значајности ( $p > 0.05$  или скр. Н.С. - није сигнификантно); **Б)** Забележена је статистички значајна повезаност ( $p = 0.043$ ) позитивне експресије VEGF са умереном/наглашеном инфилтрацијом леукоцита у туморском ткиву. Статистичка значајност је тестирана применом  $\chi^2$  теста.

Налази сугеришу да је могуће да експресија VEGF повећава број новоформираних крвних судова што је вероватно последица пораста инфилтрације леукоцита у папиларном карциному штитасте жлезде.

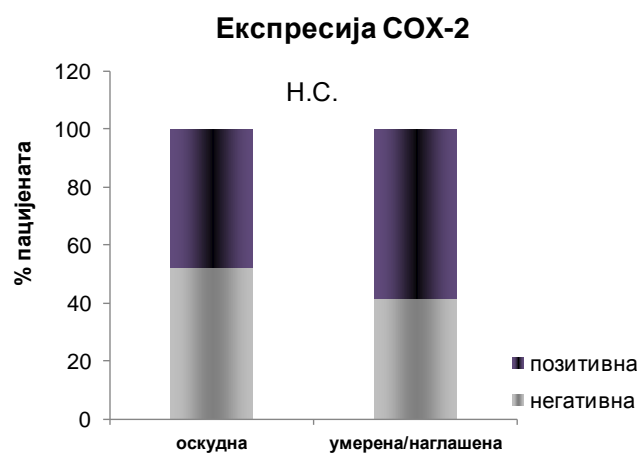
Процентуална заступљеност експресије COX-2 била је слична и у групи РТС са оскудном и у групи са умереном или наглашеном инфилтрацијом леукоцита, како у околини тако и у туморском ткиву, што се види на Графикону 9.

**A)**



**Перитуморска инфилтрација леукоцита**

**Б)**



**Интратуморска инфилтрација леукоцита**

**Графикон 9. Евалуација експресије COX-2 у зависности од перитуморске и интратуморске инфилтрације леукоцита.** Према унапред утврђеним критеријумима верификована је експресија COX-2. На основу интензитета леукоцитног инфилтрата у туморској микросредини и у њеној околини, РТС су сврстани у групу са оскудном и са умереном/наглашеном инфилтрацијом леукоцита; **А)** Не постоји статистички значајна повезаност експресије COX-2 са оскудном и умереном/наглашеном перитуморском инфилтрацијом леукоцита ( $p > 0.05$  или скр. Н.С. - није сигнификантно); **Б)** Уочава се да је процентуална заступљеност експресије COX-2 слична у групи РТС са оскудном и са умереном/и наглашеном интратуморском инфилтрацијом леукоцита ( $p > 0.05$  или скр. Н.С. - није сигнификантно). Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом.

#### **4.5. Густина лимфних судова у зависности од клиничких и патолошких карактеристика карцинома**

Претходно је јасно показано да је ангиогенеза значајна у расту и локалном ширењу тумора што представља један од најранијих знакова прогресије папиларног карцинома. Следећи корак у истраживању је био да се анализира и лимфангиогени фенотип овог типа карцинома штитасте жлезде. У складу са тим, густина лимфних судова (енгл. *Lymphatic vessel density*, LVD) је одређена на основу експресије специфичног маркера ендотелних ћелија лимфних судова, D2-40.

Није регистрована статистички значајна разлика у густини лимфних судова између пацијената сврстаних у одређене групе које су дефинисане на основу пола и старости као ни на основу клиничких и патохистолошких параметара: степена ризика,

инвазије лимфних судова и локалне екстратиرويدне инвазије, мултифокалности и дезмопластичне реакције (Табела 7).

Параметар	N	LVD		P-вредност
		Просечан бр. лимфних судова $\pm$ SD		
Ризичност	<i>Ниска</i>	65	10.93 $\pm$ 5.88	$p>0.05$
	<i>Висока</i>	8	7.33 $\pm$ 3.85	
Инвазија лимфних судова	<i>Одсутна</i>	16	11.01 $\pm$ 4.09	$p>0.05$
	<i>Присутна</i>	57	10.51 $\pm$ 6.18	
Локална екстратиرويدна инвазија	<i>Одсутна</i>	64	11.02 $\pm$ 5.82	$p>0.05$
	<i>Присутна</i>	9	7.87 $\pm$ 4.92	
Мултифокалност	<i>Одсутна</i>	31	9.32 $\pm$ 5.79	$p>0.05$
	<i>Присутна</i>	42	11.56 $\pm$ 5.65	
Дезмопластична реакција	<i>Оскудна</i>	35	11.61 $\pm$ 6.30	$p>0.05$
	<i>Умерена</i>	20	11.23 $\pm$ 5.38	
	<i>Наглашена</i>	18	8.11 $\pm$ 4.61	

Код 73 испитаника оболелих од РТС анализирана је густина лимфних судова у односу на клиничке и патохистолошке параметре карцинома. Није забележена статистички значајна разлика у густини лимфних судова између испитаника разврстаних у одређене групе на основу различитих параметара. Статистичка значајност је одређена *Student*-овим t тестом. SD-стандардна девијација

**Табела 7.** Густина лимфних судова у зависности од клиничких и патолошких карактеристика РТС

Узимајући у обзир потенцијалну улогу COX-2 у регулацији синтезе VEGF-C, главног фактора раста у лимфангиогенези, анализирана је и густина лимфних судова у зависности од експресије COX-2. Као што се види у Табели 8, не постоји значајна повезаност експресије COX-2 са LVD у папиларном карциному штитасте жлезде.

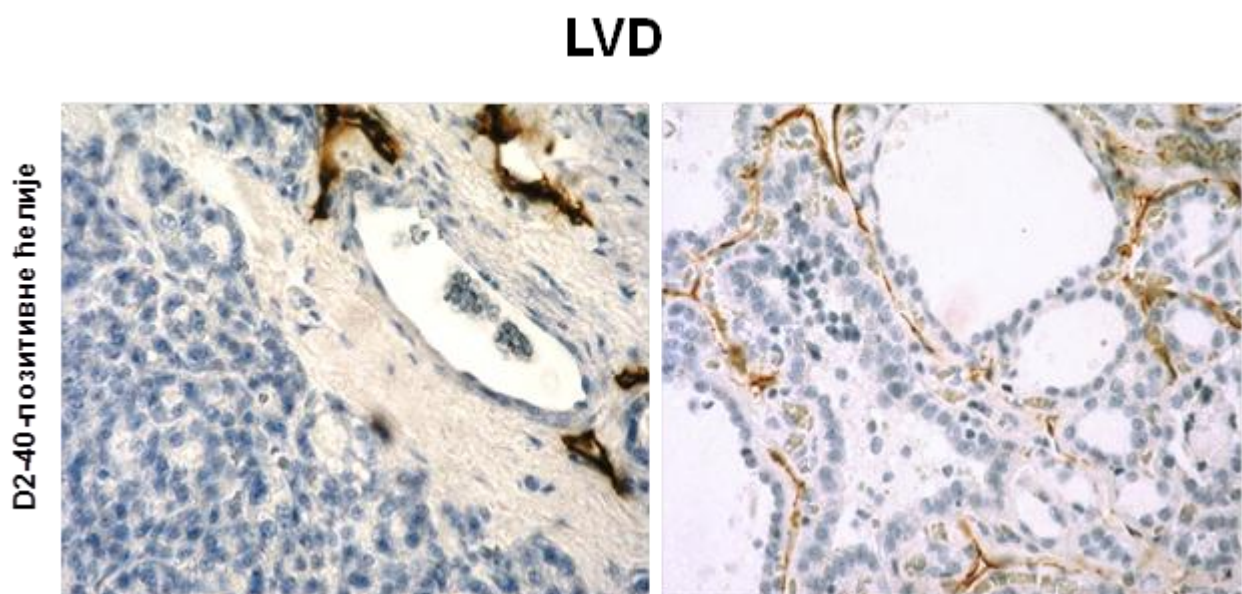
Визуелизација лимфних судова у папиларном карциному штитасте жлезде илустрована је на Слици 2. За разлику од крвних судова који су доминатно локализовани у туморској микросредини, лимфни судови су углавном дистрибуирани у околини тумора. Приказани су репрезентативни пресеци туморског ткива са мањом (лево) и већом (десно) густином лимфних судова (Слика 2).

Добијени резултати сугеришу да квантификација лимфне густине нема предиктивни значај у папиларном карциному штитасте жлезде и да није зависна од експресије COX-2.

Маркер	N	LVD		P-вредност
		Просечан бр. лимфних судова $\pm$ SD		
COX-2 (експресија)	Негативна	33	11.13 $\pm$ 4.42	p>0.05
	Позитивна	36	10.44 $\pm$ 6.91	

Статистичка значајност је одређена *Student*-овим t тестом. SD-стандардна девијација

Табела 8. Густина лимфних судова у зависности од експресије COX-2



Слика 2. Имунохистохемијска анализа D2-40 као специфичног маркера ендотелних ћелија лимфних судова у папиларном карциному штитасте жлезде. Представљени су исечци туморског ткива са мањом и већом густином лимфних судова (оригинално увећање 200x).

#### 4.6. Евалуација експресије p27, регулатора ћелијског циклуса, у папиларном карциному штитасте жлезде

Узимајући у обзир познату улогу p27 у негативној регулацији прогресије ћелијског циклуса коју овај молекул остварује инхибирајући циклин зависне киназе (133), имунохистохемијском методом испитивана је експресија протеина p27 у папиларном карциному штитасте жлезде. При томе коришћен је исти семиквантитативни скор систем као и за VEGF и COX-2, а који је базиран на проценту

обојених туморских ћелија. Тако су на основу експресије овог протеина сви папиларни карциноми сврстани у две групе: групу са позитивном (>10% обојених туморских ћелија) и групу са негативном експресијом p27 (≤10% обојених туморских ћелија). Очекивано, проценат испитаника са позитивном експресијом p27 у туморском ткиву РТС је био низак и износио је свега 22.2%. Међутим, у овом истраживању није забележена значајна повезаност експресије p27 ни са једним од клиничких и патохистолошких карактеристика РТС (Табела 9).

Параметар	Експресија p27 (*N=72 испитаника)		P-вредност	
	Негативна	Позитивна		
Ризичност	<i>Ниска</i>	50	15	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Висока</i>	6	1	
Инвазија лимфних судова	<i>Одсутна</i>	12	3	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Присутна</i>	44	13	
Локална екстратиرويدна инвазија	<i>Одсутна</i>	48	15	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Присутна</i>	8	1	
Мултифокалност	<i>Одсутна</i>	23	7	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Присутна</i>	33	9	
Дезмопластична реакција	<i>Оскудна</i>	26	8	<i>p&gt;0.05</i>
	<i>Умерена</i>	16	4	
	<i>Наглашена</i>	14	4	

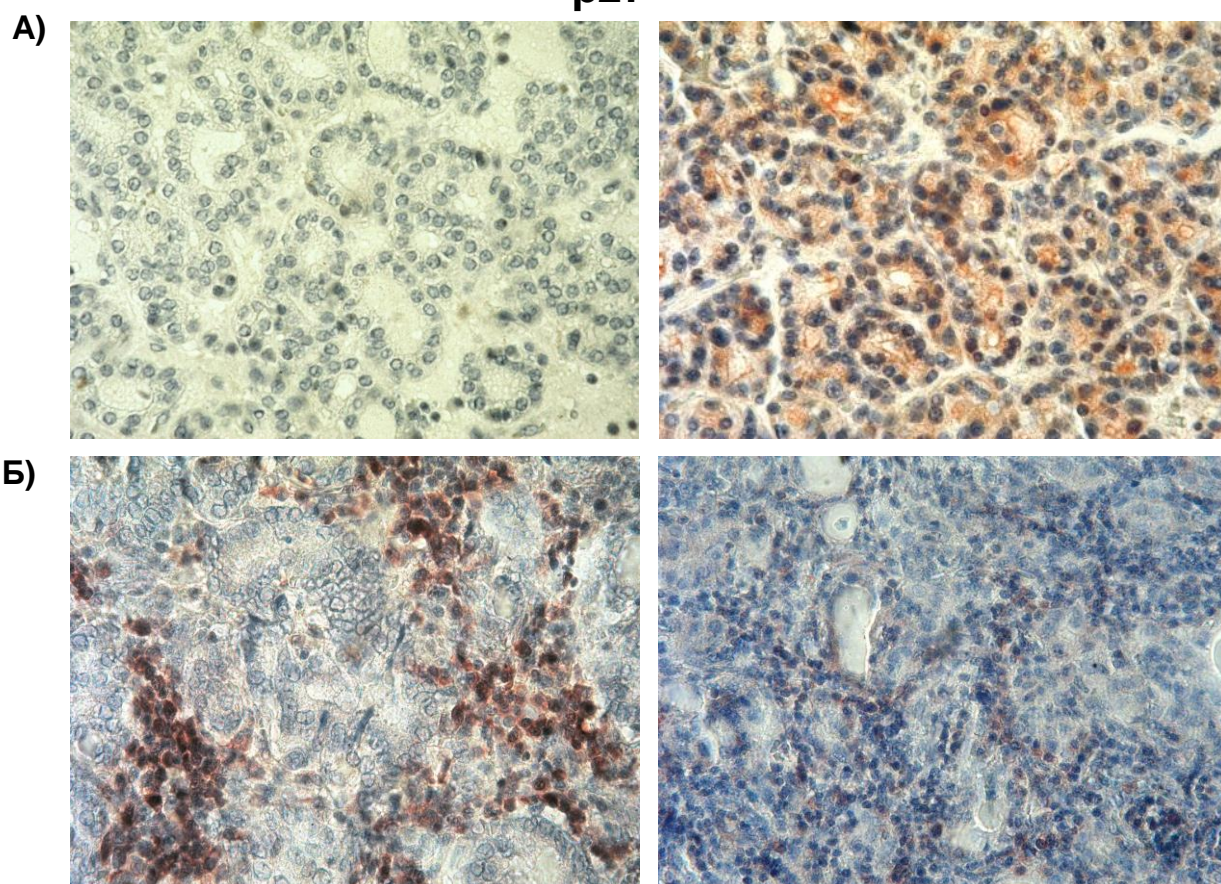
\*При имунохистохемијском бојењу p27 због техничких разлога, из анализе искључен је пресек ткивног исечка 1 испитаника. Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом

**Табела 9.** Експресија p27 у зависности од клиничких и патолошких карактеристика РТС

Експресија протеина p27 је документована на репрезентативној Слици 3. Иако у овој студији није забележена разлика у процентуалној заступљености позитивне експресије p27 између туморске микросредине и њене околине, интересантно је запажање да је p27 доминатно еспримиран у једрима ћелија туморске строме док је у туморским ћелијама изражена цитоплазматска експресија овог протеина (Слика 3Б).



## p27



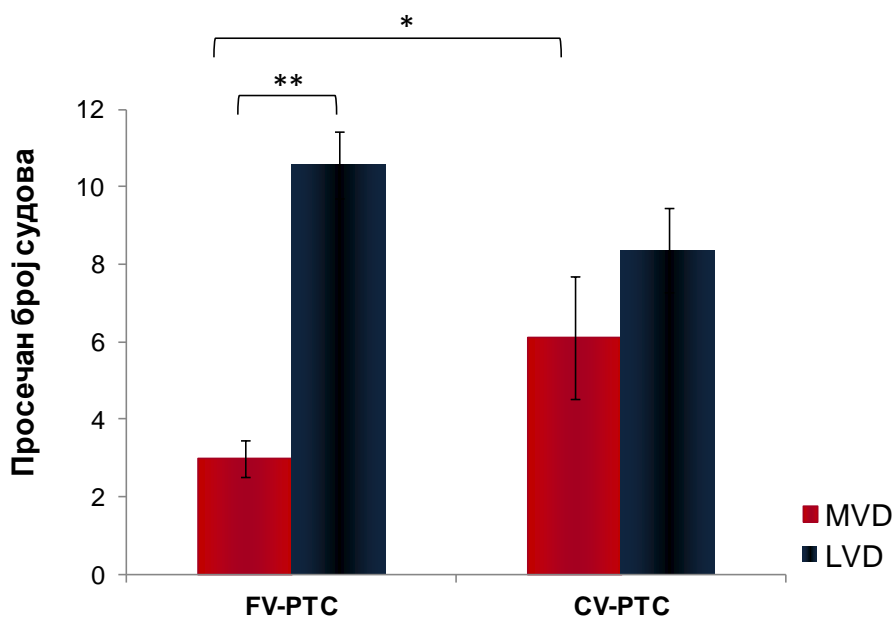
**Слика 3. Имунохистохемијска анализа експресије p27 у папиларном карциному штитасте жлезде.**

**А)** На левом панелу слике представљен је папиларни карцином штитасте жлезде са негативном, а на десном панелу са позитивном експресијом p27; **Б)** Уочава се да је p27 доминатно еспримиран у једрима ћелија туморске строме (лево), док је у туморским ћелијама израженија цитоплазматска експресија p27 (десно) (оригинално увећање 200x).

С обзиром на то да није забележена значајна повезаност експресије p27 ни са једним од клиничких и патохистолошких карактеристика РТС, овакав налаз упућује да имунохистохемијска квантификација експресије p27 протеина нема предиктивни значај у папиларном карциному штитасте жлезде. Међутим, у овој студији је забележено да се у туморским ћелијама дешава релокализација протеина p27 из једра у цитоплазму што сугерише на закључак да поред смањене експресије, малигне ћелије вероватно индукују и секвестрацију овог протеина у цитоплазми што представља још један начин којим малигне ћелије неутралишу функцију p27 у инхибицији ћелијске пролиферације.

#### 4.7. Различити ангиогени и лимфангиогени профил у фоликуларној и у класичној варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде

Следећи циљ овог истраживања је био да се испитају потенцијалне разлике између хистолошки различитих варијанти папиларног карцинома и то на основу њиховог ангиогеног и лимфангиогеног профила. Иако претходно није забележена статистички значајна повезаност LVD са неким од клиничких и патохистолошких параметара папиларног карцинома штитасте жлезде, у фоликуларној варијанти РТС вредност LVD ( $10.55 \pm 0.86$ ) је била значајно већа у односу на вредност MVD ( $2.99 \pm 0.48$ ), што није био случај код класичне варијанте овог карцинома. Ако се пореди густина крвних судова у ове две фоликуларне варијанте карцинома, уочава се да је MVD у FV-РТС статистички значајно нижа него код CV-РТС, што се види на Графикону 10.



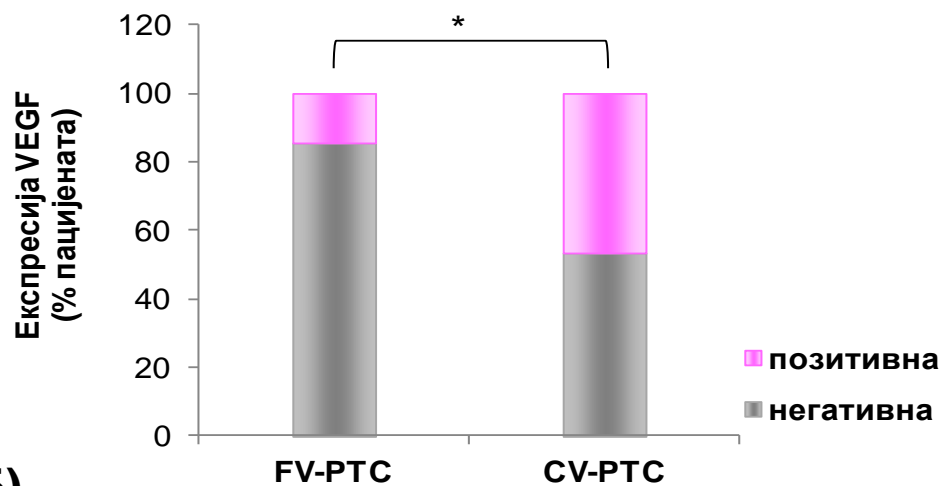
**Графикон 10.** Густина лимфних и крвних судова у хистолошким варијантама папиларног карцинома штитасте жлезде (FV-РТС и CV-РТС). За визуелизацију ендотелних ћелија лимфних и крвних судова коришћени су маркери D2-40 и CD31. Према унапред утврђеним критеријумима одређени су LVD и MVD. У FV-РТС LVD је значајно већа у поређењу са MVD (\*\*  $p=0.000$ ), али не и у CV-РТС. MVD у FV-РТС је статистички значајно нижа у односу на CV-РТС (\*  $p=0.014$ ). Статистичка значајност је одређена *Student*-овим *t* тестом.

На основу ових налаза може се закључити да се фоликуларна и класична варијанта папиларног карцинома разликују према ангиогеном и лимфангиогеном профили. С обзиром на то да је густина лимфних судова значајно већа у односу на микроваскуларну густину може се закључити да лимфангиогенеза доминира у фоликуларној варијанти папиларног карцинома. Повећана густина крвних судова у класичној у односу на фоликуларну варијанту папиларног карцинома сугерише да квантификација степена ангиогенезе може послужити као метод за разликовање ове две хистолошке варијанте.

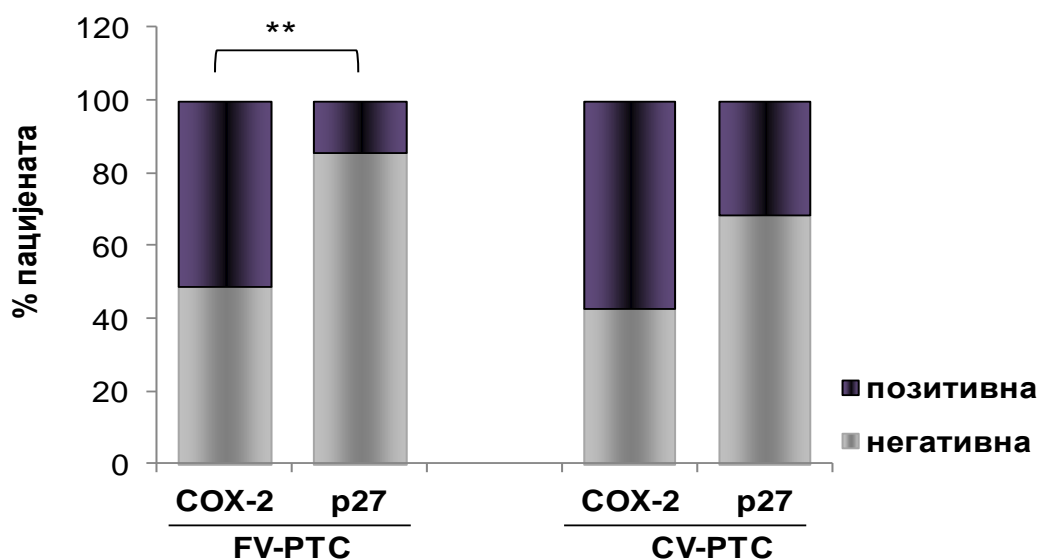
Даља анализа експресије VEGF, COX-2 и p27 у FV-PTC и CV-PTC, указала је да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF статистички значајно већа у CV-PTC (46.67%) у односу FV-PTC (14.29%) што је приказано на Графикону 11А. Овакав налаз упућује да је пораст густине крвних судова у CV-PTC вероватно последица повећане експресије VEGF. Такође, важно је истаћи да у FV-PTC постоји статистички значајна разлика између позитивне експресије COX-2 и p27 ( $\chi^2$ ,  $p=0.000$ ), што није био случај у класичној варијанти овог карцинома (Графикон 11Б). Другим речима, уз пораст позитивне експресије COX-2 забележена је смањена процентуална заступљеност позитивне експресије p27 што сугерише на могућност да је овакав образац експресије COX-2 и p27 повезан са забележеним порастом густине лимфних судова у FV-PTC. На основу овог налаза може се претпоставити да инверзна експресија COX-2 и p27 утиче на пролиферацију ендотелних ћелија што промовише лимфангиогенезу у Fv-PTC.

Добијени резултати сугеришу да су VEGF, COX-2 и p27 важни биолошки маркери који условавају разлике у ангиогеном и лимфангиогеном потенцијалу фоликуларне и класичне варијанте папиларног карцинома.

**A)**



**Б)**



**Графикон 11. Евалуација експресије VEGF, COX-2 и p27 у хистолошким варијантама РТС (FV-PTC и CV-PTC).** Према унапред утврђеним критеријумима верификована је експресија VEGF, COX-2 и p27. **А)** Процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је статистички значајно већа у CV-PTC у поређењу са FV-PTC (\* $p=0.016$ ). **Б)** Присутна је статистички значајна разлика између позитивне експресије COX-2 и p27 у фоликуларној, али не и у класичној варијанти РТС (\*\* $p=0.000$ ). Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом.

#### 4.8. Микроваскуларна густина и експресиони профил VEGF, p27 и COX-2 у нетуморском и у туморском ткиву штитасте жлезде

На крају истраживања, са циљем да се утврди да ли постоји разлика у MVD и LVD, као и разлика у експресији испитиваних маркера (VEGF, COX-2 и p27) у нетуморском и туморском ткиву штитасте жлезде, у студију је укључено и 11 пацијената са мултинодуларном струмом. Мултинодуларна струма (енгл. *Multinodular goiter*, MNG) је најчешће обољење штитасте жлезде које погађа чак половину одрасле популације (134). Мада је ризик за малигну трансформацију релативно мали, резултати неких студија импликују да се у 3 до 10% случајева може развити карцином штитасте жлезде (135) (136).

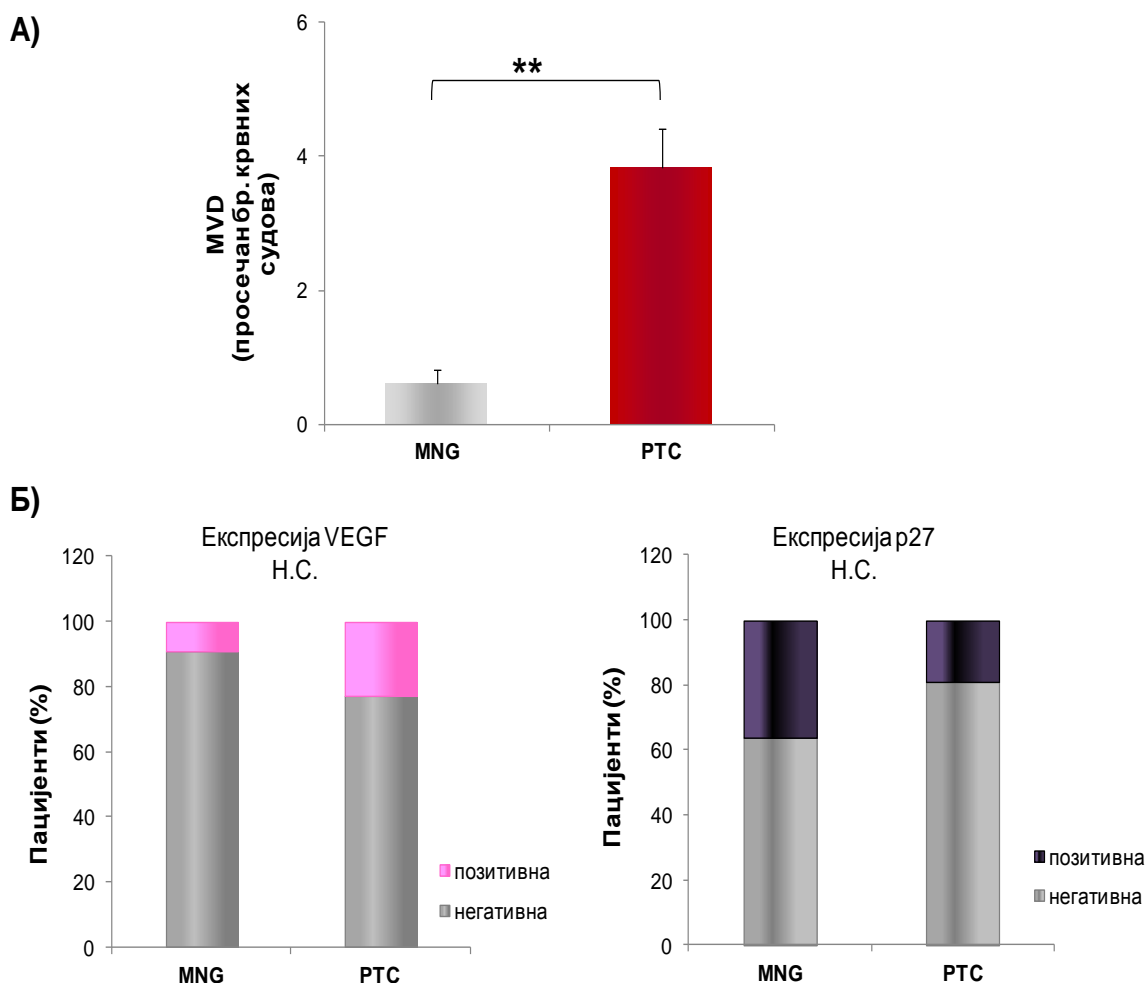
У наставку анализе густине крвних судова, уочена је статистички значајно мања MVD у нетуморском у поређењу са туморским ткивом штитасте жлезде (Графикон 12А). У складу са овим налазом, и процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је мања у групи пацијената са MNG у односу на групу пацијената са РТС, при чему ова разлика не досеже ниво статистичке значајности што је вероватно последица ограниченог броја испитаника са MNG (леви панел Графикана 12Б).

Очекивано, фреквенца позитивне експресије p27 је била већа међу испитаницима са MNG него код оболелих од РТС, мада није забележена статистички значајна разлика између испитиваних група, што је приказано на десном панелу Графикана 12Б.

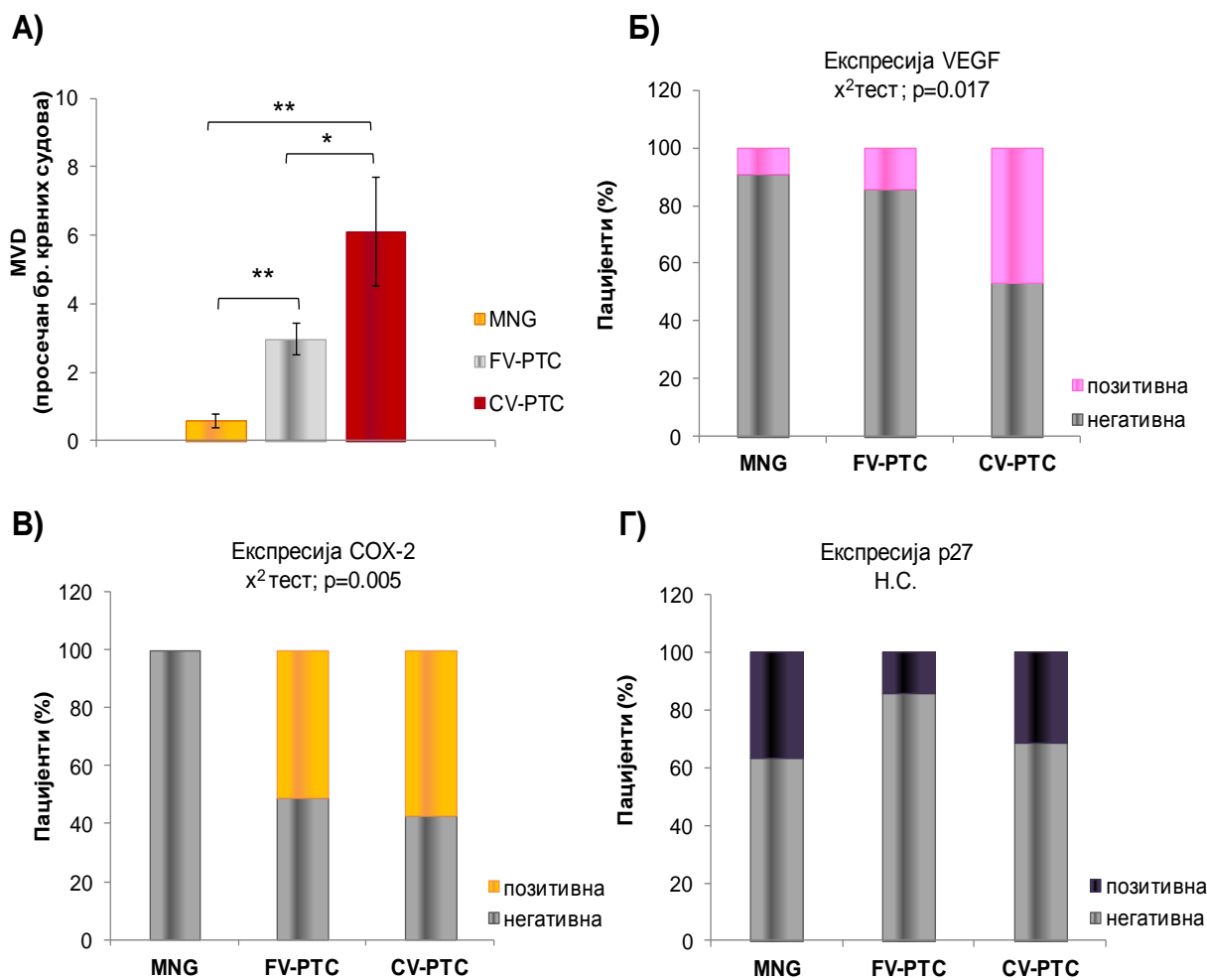
Међутим, експресија COX-2 као ни D2-40 није детектована код оболелих од MNG (подаци нису приказани). Добијени резултат потврђује претходни закључак да је забележени пораст микроваскуларне густине важна карактеристика папиларног карцинома штитасте жлезде. У овом истраживању није забележена статистички значајна разлика у експресији осталих испитиваних маркера између туморских и нетуморских лезија штитасте жлезде што је делимично последица тога да је већина укључених испитаника оболелих од РТС била у pT1 или pT2 стадијуму, а добрим делом и због чињенице да је у актуелној студији број испитаника са MNG био ограничен.

Поређењем густине крвних судова између MNG, CV-РТС и FV-РТС, забележена је значајно нижа MVD у MNG у односу на обе хистолошке варијанте РТС, а нарочито у односу на CV-РТС (Графикон 13А).

У наставку анализе експресије VEGF, COX-2 и p27 у циљаним ткивима, уочено је да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF био значајно нижа у групи пацијената са MNG (9.1%) него у групи са FV-PTC (14.29%), а нарочито у односу на групу са CV-PTC (46.67%) (Графикон 13Б). Експресија COX-2 није детектована код пацијената са MNG, док је позитивна експресија овог протеина регистрована у око половине пацијената са CV-PTC и FV-PTC (Графикон 13В). Није забележена значајна разлика у фреквенци позитивне експресије p27 између испитиваних група (Графикон 13Г).



**Графикон 12. Густина крвних судова и експресија VEGF и p27 у нетуморском и туморском ткиву штитасте жлезде.** За визуелизацију ендотелних ћелија крвних судова коришћен је маркер CD31. Према унапред утврђеним критеријумима анализирана је MVD, као и експресија испитиваних протеина у циљаним ткивима; А) MVD у PTC је значајно већа у поређењу са MVD у MNG (\*\* p=0.000). Статистичка значајност је одређена Student-овим t тестом; Б) Уочава се да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF била већа у групи испитаника са PTC, док је експресија p27 била израженија у групи оболелих од MNG, али ова разлика у експресији наведених маркера између нетуморских и туморских лезија у штитастој жлезди није статистички значајна (p>0.05 или скр. Н.С. - није сигнификантно). Статистичка значајност је одређена  $\chi^2$  тестом



**Графикон 13.** Густина крвних судова и експресија VEGF, COX-2 p27 у мултинодозној струми и у хистолошким варијантама папиларног карцинома штитасте жлезде (FV-PTC и CV-PTC). За визуелизацију ендотелних ћелија крвних судова коришћен је маркер CD31. Према унапред утврђеним критеријумима одређена је MVD и верификована експресија протеина; **А)** MVD је значајно већа у FV-PTC, а нарочито у CV-PTC у поређењу са MNG (\*\*p=0.000). Статистичка значајност је испитана Student-овим t тестом; **Б)** Процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је статистички значајно већа у CV-PTC у односу на MNG (p=0.017); **В)** Око половине испитаника са CV-PTC и FV-PTC присутна је позитивна експресија COX-2, док у групи са MNG није детектована експресија овог протеина (p=0.005); **Г)** Не постоји статистички значајна повезаност експресије p27 код испитиваних група (p>0.05 или скр. H.C. - није сигнификантно). Статистичка значајност је испитана  $\chi^2$  тестом.

## 5. ДИСКУСИЈА

Папиларни карцином је најчешћи тип карцинома штитасте жлезде (19). Генерално, РТС је добро диферентован тумор са високом стопом преживљавања. Процењује се да је код чак 98% оболелих, преживљавање око 10 година (137). Међутим, у случају прогресије РТС, преживљавање се значајно редукује (3). Упркос бројним сазнањима о РТС, клинички ток и исход хистолошки различитих варијанти РТС су комплексни и разнолики. Молекулски профил који детерминише потенцијално агресивнији фенотип класичне и фоликуларне варијанте РТС још увек није у потпуности разјашњен.

Ангиогенеза и лимфангиогенеза су фундаментални процеси у прогресији тумора и представљају важну карактеристику туморске микросредине (138). Док ангиогенеза промовише раст и хематогено метастазирање тумора (139), лимфангиогенеза обезбеђује алтернативни пут за дисеминацију туморских ћелија у лимфне жлезде (140). Најчешће коришћен метод за квантификацију ангиогенезе и лимфангиогенезе је процена густине крвних и лимфних судова.

Први део истраживања је усмерен на анализу густине крвних и лимфних судова у зависности од клиничких и патохистолошких параметара папиларног карцинома штитасте жлезде, као и њихову повезаност са експресијом VEGF и COX-2. Испитиван је и клинички значај експресије инхибитора ћелијског циклуса p27 код оболелих од ове врсте карцинома. Добијени подаци указују на то да је ангиогенеза, углавном зависна од експресије VEGF, значајна како за раст тако и за локално ширење тумора што представља један од најранијих знакова прогресије папиларног карцинома штитасте жлезде.

Други део истраживања усмерен је на утврђивање потенцијалне разлике између хистолошки различитих варијанти папиларног карцинома и то на основу анализе њиховог ангиогеног и лимфангиогеног профила. Добијени резултати сугеришу да су VEGF, COX-2 и p27 важни биолошки маркери који утичу на различити ангиогени и лимфангиогени потенцијал фоликуларне и класичне варијанте РТС.



## **5.1. Раст и локално ширење папиларног карцинома штитасте жлезде зависи од ангиогенезе**

Фундаментална улога ангиогенезе у малигним туморима огледа се кроз стимулацију раста и метастазирања тумора (141). Почетна истраживања прогностичког значаја туморске ангиогенезе, као и повезаност густине крвних судова са метастатским потенцијалом, издвојила су MVD као значајан и потенцијално независан прогностички параметар у различитим врстама тумора (142), (143), (144). Резултати новијих истраживања у којима је анализирана густина крвних судова у карциному простате (145) и дебелог црева (146), такође потврђују да је MVD један од важних прогностичких маркера за процену како ризика за прогресију тако и клиничког тока и исхода тумора.

Када је реч о карциному штитасте жлезде, циљ бројних истраживања је био да се испита веза између MVD и клиничких и патохистолошких параметара удружених са прогнозом болести, међутим, добијени резултати су контроверзни. У слабо диферентованим карциномима штитасте жлезде забележен је мали број крвних судова, док је у медуларним карциномима регистрована повећана MVD која је издвојена као значајан прогностички фактор у овој врсти тумора (147). С друге стране, у добро диферентованим карциномима, документована је већа густина крвних судова у односу на околно ткиво штитасте жлезде, али није нађена повезаност оваквог пораста MVD са лошим исходом болести (148). Значај MVD у папиларном карциному штитасте жлезде такође је комплексан и још увек није расветљен.

Поред неоангиогенезе, инвазија туморских ћелија у крвне судове је још једно од обележја агресивности тумора и представља рани корак у дисеминацији туморских ћелија у удаљене органе. У складу са тим, васкуларна инвазија се углавном издваја као важан прогностички фактор у карциному дојке (149), (150), или се пак повезује са слабијом диференцијацијом и унапредованим стадијумом карцинома бубрега (151). Претпоставља се да је васкуларна инвазија важан индикатор развоја локалних рецидива и успостављања удаљених метастазама у добро диферентованим карциномима штитасте жлезде, нарочито у папиларном карциному (152).

Екстратиroidно ширење примарног тумора у околна ткива је знак локалне инвазије карцинома штитасте жлезде (153) и сматра се још једним прогностичким параметром у папиларном карциному штитасте жлезде (154). Док неки аутори описују значајну повезаност екстратиroidне инвазије са високом стопом рецидива, као и са краћим преживљавањем (155), други нису регистровали значајну везу између екстратиroidне инвазије и преживљавања оболелих од папиларног или фоликуларног карцинома штитасте жлезде (156).

У актуелној студији, повећана MVD, као индикатор појачане ангиогенезе, регистрована је у групи испитаника високог ризика (Графикон 1А). Јасно је уочен и пораст MVD у папиларним карциномима са присутном локалном екстратиroidном инвазијом (Графикон 1Б), као и у карциномима са детектабилном васкуларном инвазијом (Графикон 2А). Уз наведено, добијени резултати упућују да MVD може да послужи као маркер за детерминацију васкуларне инвазије (сензитивност 75%, специфичност 67.2%, *cut -off* 3.88; Графикон 2Б).

Претпоставља се је дезмопластична, стромална реакција (дезмоплазија) важан играч у процесима инвазије тумора и често се описује у карциному дојке, панкреаса, колоректалном карциному, сквамoцелуларном карциному главе и врата, при чему интензитет реакције варира у различитим врстама тумора (157), (158). У медуларном карциному штитасте жлезде, дезмопластична реакција је повезана са повећаном инциденцом метастаза у лимфним жлездама (159). Подаци из литературе по питању дезмопластичне реакције у папиларном карциному су оскудни и своде се на свега пар студија. Тако, у папиларном микрокарциному регистрована је значајна повезаност дезмопластичне реакције са васкуларном инвазијом, перитуморском инфилтрацијом, пречником тумора и метастазама у лимфним жлездама (160). *Mai* и сарадници (161) су анализирали такозване "инфилтришуће" РТС, дефинисане на основу инфилтрације склерозне строме туморским ћелијама, и показали су да се овакви карциноми карактеришу већим метастатским потенцијалом.

Добро је познато да је хипоксија, карактеристична за брзо растуће туморе, важан стимулус за продукцију VEGF како у туморским ћелијама тако и у CAFs који су главна компонента дезмопластичне строме тумора (162). У актуелној студији анализирана је веза између интензитета дезмопластичне реакције и густине крвних судова у РТС. Јасно је уочена значајно већа MVD у РТС са умереном и наглашеном

дезмопластичном стромалном реакцијом, у односу на карциноме са оскудном дезмоплазијом (Графикон 3А), што је супротно налазу у медуларном карциномима штитасте жлезде где није забележена веза између MVD и интензитета дезмопластичне стромалне реакције (159). Добијени резултати подржавају претпоставку да компоненте дезмопластичне стоме, а нарочито CAFs, представљају важан извор VEGF, а вероватно и других проангиогених фактора, и да на тај начин доприносе порасту густине крвних судова у добро диферентованом РТС.

На основу претходно изнетих налаза студије може се закључити да су локално ширење папиларног карцинома штитасте жлезде, а потенцијално и прогресија тумора, зависни од процеса ангиогенезе што се огледа у повећаној густини крвних судова. У даљем току истраживања анализиран је значај експресије проангиогених фактора (VEGF и COX-2) за ангиогенезу папиларног карцинома штитасте жлезде.

## **5.2. Експресија VEGF је повезана са порастом густине крвних судова и са интратуморском инфилтрацијом леукоцита у папиларном карциному штитасте жлезде**

Фактори који промовишу формирање нових крвних судова као и њихова веза са клиничким и патохистолошким карактеристикама диферентованих карцинома штитасте жлезде су разнолики и недовољно расветљени. Иако је у карциному штитасте жлезде регистрована повећана експресија VEGF на нивоу протеина, није утврђена веза између експресије овог проангиогеног протеина и лоше прогнозе оболелих, величине тумора, мултифокалности и/или присутних метастаза у регионалним лимфним жлездама или удаљеним органима (3). Када је реч о папиларном карциному штитасте жлезде, експресија VEGF корелира са повећаним ризиком за развој метастаза, као и са високом стопом рецидива и краћим преживљавањем оболелих од ове врсте карцинома (163). Овакав налаз је компатибилан са ранијим запажањима да линије карцинома штитасте жлезде који повећано експримирају VEGF показују агресивнији потенцијал (164) (165). Уз то, експресија VEGF (на нивоу mRNA и протеина) је повећана како у примарном тумору са детектабилним метастазама у лимфним жлездама, тако и у удаљеним метастатским лезијама РТС. У туморима малог пречника регистровано је повећање експресије VEGF само на нивоу mRNA, док је код оболелих у вишим стадијумима рТ присутна повећана експресија и овог проангиогеног протеина (166).

Постоје налази који указују да експресија COX-2 позитивно корелира са повећаном MVD у тумору (96). *Fu* и сарадници (167) бележе да инхибитори COX-2 супримирају ангиогенезу тумора што је вероватно последица смањене експресије VEGF па су претпоставили да се проангиогена улога COX-2 огледа и у њеној способности да индукује транскрипцију гена за VEGF. У прилог овој претпоставци говори и налаз друге студије која се бави анализом експресије VEGF и COX-2 (168), која указује на позитивну корелацију између експресије VEGF и COX-2 у карциному штитасте жлезде и сугерише на то да интеракција ова два молекула игра значајну улогу у канцерогенези тако што индукује ангиогенезу. Подаци из литературе потврђују значајну повезаност година старости и пола пацијената са РТС са повећаном експресијом VEGF и COX-2 у узрапредовалом стадијуму болести (169).

Да би се боље разумели потенцијални механизми ангиогенезе у папиларном карциному штитасте жлезде, у овој студији анализирана је повезаност микроваскуларне густине са експресијом VEGF и COX-2. Актуелним истраживањем показано је да је повишена MVD значајно повезана са позитивном експресијом VEGF, али не и са експресијом COX-2 (Табела 4). Овакав налаз је у сагласности са резултатима ранијих истраживања који указују на то да у папиларном карциному штитасте жлезде постоји значајна веза између експресије VEGF и броја крвних судова, која у фоликуларном карциному није забележена (170). На основу ових, а и налаза других студија, може се закључити да је процес формирања нових крвних судова у папиларном карциному штитасте жлезде првенствено руковођен VEGF.

Узимајући у обзир његову добро познату улогу у расту тумора, у актуелној студији је анализирана повезаност експресије VEGF са величином тумора и старосном доби пацијената, као два важна фактора ризика оболелих од РТС. Уочена је значајно повећана фреквенца позитивне експресије VEGF у већим туморима код испитаника са 50 и више година старости (Графикон 4). Овакав налаз упућује да експресија VEGF може да послужи као индикатор ризика за прогресију папиларног карцинома штитасте жлезде. Експресија VEGF није детектована у многим ткивним пресецима РТС што је вероватно последица већег броја испитаника укључених у ову студију која су припадала рТ1 и рТ2 стадијуму. Међутим, у туморском ткиву већине пацијената у рТ3 стадијуму забележена је позитивна експресија VEGF што упућује на закључак да хипоксична и кисела микросредина, карактеристичне за тумор у узрапредовалом рТ стадијуму, највероватније индукују повећану експресију VEGF (166).

Познато је да је тумор мета имунског надзора, као и да је једна од физиолошких улога имунског система да препозна и уклони туморске ћелије. На жалост, у већини случајева, туморске ћелије индукују имуносупресивну туморску микросредину и тако "саботирају" имунски надзор и следствено избегавају сопствену елиминацију. Уз то, тумор креира хроничну инфламацију где ћелије имунског система продукују бројне митогене, антиапоптоске, проангиогене и пролимфангиогене факторе. На тај начин тумор, имунски систем као свог доскорашњег непријатеља претвара у саучесника, кога затим користи за напредовање, односно за сопствени развој и прогресију (171).

Имунски одговор против туморских ћелија у диферентованим карциномима штитасте жлезде је тема бројних истраживања (172), (173). Налаз леукоцитног инфилтрата, како у туморском ткиву тако и у његовој околини, сугерише на значајну везу између инфламацијске микросредине и агресивности карцинома штитасте жлезде (174) (175) (176), али њихова улога још увек није довољно расветљена. У карциному штитасте жлезде идентификоване су различите врсте тумор-асоцираних инфламацијских ћелија (177). То су ћелије урођеног (углавном макрофаги, а у мањој мери мастоцити и неутрофили) и ћелије стеченог имунског одговора (Т- и В-лимфоцити) (178). Генерално, субоптимално активирани ћелије урођене имуности чешће потпомажу раст и метастазирање тумора (179). Показано је да је у карциномима штитасте жлезде који су већег пречника, однос неутрофила и лимфоцита је измењен на рачун пораста броја неутрофила што последично повећава ризик за настанак рецидива (178). За разлику од ћелија урођене имуности, утицај лимфоцита на прогнозу овог карцинома и даље је предмет расправе бројних студија. Примећено је да они тумори који нису инфилтрисани лимфоцитима показују високу стопу рецидива што упућује на закључак да је присуство лимфоцита у туморској микросредини штитасте жлезде индикатор повољне прогнозе (173). Међутим, резултати других истраживања сугеришу да је налаз тумор-асоцираних лимфоцита карактеристичан за карцином штитасте жлезде и то у унапредовалом стадијуму, као и са већим лимфоваскуларним инвазивним и метастатским потенцијалом (179). Изгледа да баланс између протуморске и антитуморске активности ћелија имунског система одређује клинички исход оболелих од карцинома штитасте жлезде. Овај баланс је вероватно регулисан комплексним интеракцијама између туморских ћелија и имунског система које зависе од миљеа бројних цитокина и хемокина ослобођених у туморској микросредини.

У актуелној студији, у РТС у коме је детектована умерена и наглашена интратуморска инфилтрација леукоцита, регистрована је статистички значајно већа MVD у односу на карцином са оскудном инфилтрацијом леукоцита (Графикон 7Б). Уз то, забележено је и да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF већа у групи РТС са умереном и наглашеном инфилтрацијом леукоцита у поређењу са групом код којих је присутна оскудна инфилтрација у туморском ткиву (Графикон 8Б). Резултати другог истраживања упућују да густина новоформираних крвних судова, као и експресија VEGF, позитивно корелирају са густином тумор-асоцираних макрофага у карциному дојке (180). Познато је да тумор-асоцирани макрофаги заузимају важно место у узрапредовалом карциному штитасте жлезде (181) тако што секретују бројне цитокине, као и факторе раста, а нарочито VEGF (182). Такође, туморске ћелије ослобађањем VEGF не само што директно индукују ангиогенезу, већ подстичу и регрутовање леукоцита, пре свега макрофага у туморску микросредину (182), што све заједно за последицу има пораст густине крвних судова.

Из свега наведеног налази ове студије сугеришу на могућност да експресија VEGF повећава микроваскуларну гуштину што је вероватно последица и пораста инфилтрације леукоцита, највероватније макрофага, у папиларном карциному штитасте жлезде.

Повећана експресија COX-2 је детектована у бројним туморима, укључујући колоректални карцином, карцином дојке, панкреаса и плућа (183), (184), (185) и у корелацији је са лошом прогнозом оболелих. Резултати бројних истраживања упућују да COX-2 игра важну улогу у различитим корацима прогресије тумора и то тако што: стимулише пролиферацију малигно трансформисаних ћелија (184), инхибише апоптозу, омета ефикасност антитуморске терапије (186), (187) и промовише ангиогенезу на терену инфламације (188). На крају, сматра се да је укључен и у процес формирања метастаза и то тако што штити метастатске туморске ћелије од посебног облика апоптозе, односно аноиксиса, индукованог губитком ћелијског контакта са базалном мембраном и суседним ћелијама (189). Уз наведено, *in vitro* студије јасно указују и на адхезивну улогу COX-2 у хематогеној метастатској каскади тако што повећава експресију угљених хидрата (нпр. сијаличних *Lewis* антигена) на површини туморских ћелија и на тај начин вероватно потпомаже њихову адхезију за ендотел у удаљеним органима (190).

Опречни су резултати истраживања који се баве анализом значаја експресије СОХ-2 у карциному штитасте жлезде. У папиларном карциному забележена је повишена експресија СОХ-2 у односу на фоликуларни карцином и аденом штитасте жлезде, али је истовремено примећена и смањена експресија овог ензима код оболелих старије животне доби и у узрапредованом стадијуму болести, као и код РТС са већим пречником и мултифокалношћу (191). Ови резултати упућују да СОХ-2 игра много важнију улогу у раним фазама прогресије карцинома, укључујући канцерогенезу, него у узрапредованом стадијуму РТС (191). Супротно томе, друга студија описује повећану експресију СОХ-2 код пацијената са РТС који су старије животне доби што вероватно објашњава и агресивнији фенотип тумора у односу на млађу популацију оболелих (137). У актуелном истраживању, утврђена је статистички значајна повезаност експресије СОХ-2 са старосном доби и величином тумора код оболелих од РТС. Односно, забележена је повећана фреквенца позитивне експресије СОХ-2 међу испитаницима са 50 и више година старости и са пречником тумора већим од 4 cm (у рТ3 стадијуму) (Графикон 5). Механизам којим СОХ-2 промовише раст тумора још увек није потпуно расветљен. Претпоставља се да СОХ-2 подстиче раст тумора тако што индукује продукцију биоактивних простагландина којима активира сигналне путеве укључене у контролу пролиферације и апоптозе туморских ћелија (93). Уз то, резултати неких истраживања имплицирају да СОХ-2, посредством простагландина, игра важну улогу у формирању крвних судова на месту инфламације (192). Међутим, у овој студији није регистрована значајна повезаност експресије СОХ-2 било са густином крвних судова, било са степеном инфилтрације леукоцита у папиларном карциному штитасте жлезде.

На основу добијених резултата може се констатовати да експресија СОХ-2 значајно доприноси расту папиларног карцинома међу оболелима старије животне доби и то независно од тумор- асоциране ангиогенезе и инфламације.

### 5.3. Повезаност лимфангиогенезе и експресије p27 са клиничким и патохистолошким карактеристикама папиларног карцинома

Густина лимфних судова, експресија лимфангиогених фактора раста и инвазија туморских ћелија у лимфне судове су означени као "лимфни параметри" тумора и могу да послуже као показатељи формирања нових лимфних капилара, као и раног корака у процесу лимфогене метастатске каскаде (193).

Лимфангиогенеза је кључна за дисеминацију туморских ћелија у регионалне лимфне жлезде одакле могу dospети и у удаљене органе (194) (195). Клинички значај и регулација лимфангиогенезе у различитим врстама тумора још увек нису довољно расветљени. Разлог томе је што је дискриминација лимфних од крвних судова била отежана дуги низ година због недостатка специфичног маркера за ендотел лимфних судова (196). До данас, идентификовано је неколико маркера који се користе за детекцију ендотелних ћелија лимфних судова: подопланин, VEGFR-3 (енгл. *vascular endothelial growth factor receptor-3*), LYVE-1 (енгл. *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1*) и D2-40. D2-40 је моноклонско антитело које се селективно везује за O-гликозилирани сијалопротеин, специфично исказан на ендотелу лимфних судова, тако да пружа јасну разлику између ендотела лимфних и крвних судова (197). Због тога се све чешће користи за квантификацију LVD и за евалуацију инвазије лимфних судова у разним врстама тумора, укључујући и папиларни карцином штитасте жлезде (198), (199) (200).

Подаци из доступне литературе имплицирају да повећана густина лимфних судова доприноси агресивнијем фенотипу тумора (102), (201) тако што метастатске ћелије које су се одвијиле од примарног тумора првенствено улазе у лимфну циркулацију а што је вероватно последица структурних особина лимфних судова (одсуства перицита и базалне мембране). Неки аутори сугеришу да процена густине лимфних судова, поред тога што може да послужи као прогностички параметар, истовремено представља и потенцијалну терапијску мету (202) (203). У актуелном истраживању, анализом експресије D2-40, квантификована је густина лимфних судова у папиларном карциному штитасте жлезде. Није забележена статистички значајна разлика у густини лимфних судова у зависности од инвазије лимфних судова и локалне екстратироидне инвазије, као ни у односу на друге клиничке и патохистолошке параметре. За разлику од крвних судова који су доминатно локализовани у туморској



микросредини, примећено је да су лимфни судови углавном дистрибуирани у околини папиларног карцинома штитасте жлезде. Улога перитуморске наспрам интратуморске LVD у примарном тумору је била тема бројних истраживања. Регистровано је да је перитуморска LVD удружена са метастазирањем туморских ћелија у лимфне жлезде оболелих од карцинома дојке, простате и грлића материце (204), (205), (206). Супротно, код сквамозног карцинома главе и врата, једњака и усне дупље регистровано је да је интратуморска LVD предиктор удаљених метастаза (207), (208), (209).

Резултати малобројних истраживања која анализирају значај различите дистрибуције густине лимфних судова у карциному штитасте жлезде су разнолики. На пример, налаз *de la Torre* и сарадника (3) да перитуморска LVD не корелира са присуством метастаза у лимфним жлездама, као ни са другим клиничким и патохистолошким параметрима агресивности карцинома штитасте жлезде, сугерише да је оваква дистрибуција LVD повезана са бољом прогнозом оболелих. Супротно, резултати друге студије упућују да је перитуморска LVD значајно повезана са капсуларном инвазијом карцинома штитасте жлезде. С друге стране, анализирајући интратуморску LVD у РТС регистрована је позитивна корелација са мултифокалношћу тумора као и са метастазирањем у регионалне лимфне жлезде оболелих (210).

Показано је да је експресија VEGF-C, кључног пролимфангиогеног фактора, повећана у РТС са детектованим метастазама у лимфним жлездама (211) (212) (213). С обзиром на потенцијалну улогу COX-2 у регулацији синтезе VEGF-C (214), (215), у актуелној студији анализирана је густина лимфних судова у зависности од експресије COX-2. Иако је претходно показана позитивна корелација између експресије COX-2 и VEGF-C у карциному грлића материце (214), у овој студији није забележена повезаност експресије COX-2 са LVD у РТС. На основу добијених резултата може се констатовати да у РТС квантификација LVD нема предиктивни значај и независна је од експресије COX-2.

Добро је познато да налаз инвазије лимфних судова значајно повећава ризик за развој метастаза у регионалне лимфне жлезде, одакле метастазирајуће туморске ћелије путем циркулације могу доспети у удаљене органе. У овој студији је забележено да је повећан проценат пацијената код којих је регистрована инвазија туморских ћелија у лимфне судове значајно повезан са позитивном експресијом, како VEGF тако и COX-2

(Графикон 6). Добијени налаз јасно указује на то да су VEGF и COX-2 заједно или самостално, укључени у локалну инвазивност папиларног карцинома штитасте жлезде.

Познато је да је малигна трансформација ћелије сложен процес и да је резултат акумулације генских мутација широког спектра, првенствено онкогена и антионкогена. Континуирани напредак у молекулској биологији омогућио је идентификацију генетских промена различитих антионкогена, укључених у генезу тумора. Протеин p27 је неконвенционалан антионкоген који се везује и инхибира активност циклин-зависних киназа (енгл. *Cyclin-dependent kinases*, CDKs), и на тај функционише као негативни регулатор ћелијског циклуса који контролише прелазак из G0 у S фазу (133) (216). Познато је да терминално диферентоване епителне ћелије (епител плућа, дојке, простате и јајника) повећано експримирају p27 у једру, док је за пролиферишуће ћелије (нпр. у криптама колона) карактеристична смањена једарна експресија овог протеина (217). Протеолиза p27 драстично расте током прогресије G1 фазе и полуживот овог протеина се смањује током преласка из G0 у S фазу ћелијског циклуса. Бројни механизми регулишу убиквитин-зависну протеолизу p27 у ћелији. Међутим, конститутивна активација деградацијских путева укључених у протеолизу p27 доприносе генези тумора. Тако је на пример у премалигним и у неинвазивним туморским лезијама карцинома дојке и простате, забележена редукована експресија овог протеина (218), (219).

Када је реч о карциному штитасте жлезде такође је забележена ниска експресија p27 протеина (220). Показано је да је оваква експресија повезана са већим пречником тумора и локалним екстратироидним ширењем (220). *Do* и сарадници (221) указују да редукована експресија p27 доприноси развоју папиларног карцинома као и његовом агресивнијем потенцијалу. Наиме, регистрована је повишена експресија p27 (нарочито изражена у једру ћелија) у 26 од 107 (24.3%) лезија РТС и у 81 од 96 (90.1%) бенигну лезија штитасте жлезде. Друге студије које су имунохистохемијском методом анализирале експресију p27 у папиларним микрокарциномима штитасте жлезде сугеришу на могућност да је p27 индикатор агресивнијег потенцијала ове хистолошке варијанте (222) (223). У актуелном истраживању није потврђен налаз претходних студија. Иако је проценат испитаника са позитивном експресијом p27 у туморском ткиву био низак (22.2%; 16/72), није забележена значајна повезаност експресије p27 ни са једним од клиничких и патолошких карактеристика РТС. На основу овог и других налаза може се констатовати да је оцена клиничког значаја експресије p27 протеина у

папиларном карциному комплексна и да би се у потпуности разјаснио, неопходна су додатна истраживања са већим бројем испитаника.

Међутим, интересантно је запажање да је p27 доминатно еспримиран у једрима ћелија туморске строме, док је у туморским ћелијама изражена цитоплазматска експресија овог протеина (Слика 9Б). Претпоставља се да је локализација p27 у цитоплазми малигно трансформисаних тироцита последица повећане експресије циклина D3 који затим индукује формирање комплекса кога чине p27, циклин D3 и CDKs. Формирање овог сложеног комплекса у цитоплазми резултује смањеном концентрацијом p27 и на тај начин се редукује његова доступност у интеракцији са CDKs у једру (224). Из свега наведеног, поред смањења експресије p27 услед повећане деградације у ћелији, забележена релокализација протеина p27 из једра у цитоплазму имликује да малигне ћелије индукују и секвестрацију овог протеина у цитоплазми што представља још један начин којим избегавају функцију p27 у инхибицији ћелијске пролиферације. Додатно, циљана трансфекција p27 у цитоплазму линија ћелија хуманог меланома са slabим метастатским потенцијалом драстично је повећала њихову ћелијску покретљивост *in vitro* и метастатски капацитет *in vivo* (225) што указује на парадоксалну “*Jin-Jang*” функцију p27 у тумору, а која зависи од његове ћелијске локализације. Другим речима, p27 у једру функционише као антионкоген, а у цитоплазми као метастатски онкоген.

#### **5.4. Различит образац експресије VEGF, p27 и COX-2 утиче на хетерогеност ангиогеног и лимфангиогеног потенцијала у класичној и фоликуларној варијанти папиларног карцинома**

Анализа експресије одређених молекула у нетуморским и туморским лезијама штитасте жлезде, поред тога што доприноси бољем разумевању генезе тумора, претпоставља се да би могла послужити и за њихову диференцијалну дијагнозу. Резултати *Wolinskog* и сарадника (226) сугеришу да процена експресије VEGF-C на нивоу mRNA има већи значај у односу на VEGF-A због чега се сматра да је кориснији маркер у диференцијацији бенигних од малигних лезија у штитастој жлезди. Показано је да је експресија VEGF-C статистички значајно већа у диферентованим карциномима у поређењу са бенигним туморима штитасте жлезде, при чему није забележена значајна разлика у експресији VEGF-A на нивоу mRNA (226). Противно налазу

претходно наведене студије, у актуелном истраживању уочена је статистички значајно мања MVD у нетуморском (MNG) у поређењу са туморским ткивом (PTC) штитасте жлезде (Графикон 12А). Додатно, *de la Torre* и сарадници (3) описују да је у ткиву MNG забележена значајно нижа експресија VEGF-A на нивоу протеина у поређењу са папиларним и медуларним карциномом. У складу са овим налазом, у актуелној студији је забележено да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF мања у групи пацијената са MNG у односу на групу оболелих од PTC, при чему ова разлика није статистички значајна (леви панел Графикана 12Б). Уз наведено, фреквенца позитивне експресије p27 је била већа међу испитаницима са MNG него код оболелих од PTC, мада није забележена статистички значајна разлика између испитиваних група (десни панел Графикана 12Б). Међутим, у другим студијама регистрована је статистички значајно већа експресија p27 у нормалном ткиву као и у мултинодозној струми него у карциному штитасте жлезде (227), (228).

Добијени налаз у спроведеном истраживању потврђује претходни закључак да је забележени пораст микроваскуларне густине важна карактеристика папиларног карцинома штитасте жлезде. Статистички значајна разлика у експресији осталих испитиваних маркера између туморског и нетуморског ткива штитасте жлезде није регистрована, а разлози томе су следећи. Прво, већина укључених испитаника оболелих од PTC су била у раном pT1 или pT2 стадијуму. Друго, у актуелној студији је био ограничен број испитаника са MNG.

Папиларни карцином није хомогени ентитет и обухвата неколико хистолошки различитих варијанти, од којих су доминантне класична и фоликуларна варијанта PTC. Показано је да се FV-PTC и CV-PTC међусобно разликују не само у морфолошком и клиничком аспекту (30) (229), већ и у генетским алтерацијама (230), међутим, још увек није закључено да ли захтевају различити терапијски протокол? Тако на пример, иако обе хистолошке варијанте имају сличне туморске карактеристике у смислу величине тумора, мултифокалности, капсуларне инвазије, лимфоваскуларне инвазије и перинеуралне инфилтрације, код FV-PTC је регистрован низак степен метастазирања у цервикалне лимфне жлезде и локалног екстратиреодног ширења тумора (30), (229). Резултати других студија које су изучавале ове две хистолошки различите варијанте папиларног карцинома су мање-више контрадикторне. Неки аутори указују да FV-PTC показује мањи агресивни потенцијал, који се огледа у нижој инциденци метастазирања у лимфне жлезде и у удаљене органе, и да оболели од ове хистолошке варијанте имају

сличну или бољу прогнозу у односу на оболеле од CV-PTC (38), (37). Међутим, друга група аутора је документовала да FV-PTC има агресивнији потенцијал и да показује већу тенденцу метастазирања у плућа (39). Мултиваријантна анализа указује да иако FV-PTC карактерише већа учесталост васкуларне инвазије, ова варијанта има повољнији исход у односу на друге хистолошке варијанте PTC (231). Додатно, *Zhu* и сарадници (230) су показали да FV-PTC одликује посебан сет генетских алтерација, односна висока учесталост тачкастих мутација *ras* гена и ниска учесталост *ret/PTC* и *PAX8-PPAR $\gamma$*  реаранжирања. Овакав генетски профил се значајно разликује од CV-PTC код кога је регистрована значајна инциденца *ret/PTC* реаранжирања без мутација *ras* гена. Такође, сугерише се да сви папиларни карциноми код којих су детектоване мутације *ras* гена показују фоликуларни образац раста (230).

У до сада објављеној и доступној литератури, нема студија које се истовремено баве квантификацијом густине лимфних и крвних судова у FV-PTC и CV-PTC. У спроведеном истраживању, уочава се да је LVD била статистички значајно већа у односу на MVD у FV-PTC, али не и у CV-PTC. Уз наведено, MVD у FV-PTC статистички значајно нижа него код CV-PTC (Графикон 10). Овакав налаз је у сагласности са резултатима претходне студије у којој је укључено 123 испитаника, при чему је показано да је експресија VEGF на нивоу и mRNA и протеина била већа у CV-PTC у односу на FV-PTC (166). Исти аутори су такође забележили значајно повећану експресију VEGF-C на нивоу mRNA, али не и на нивоу протеина, у FV-PTC у односу на CV-PTC. Сагласно са претходном студијом, у актуелном истраживању регистрован је сличан тренд, односно пораст LVD у FV-PTC, али није достигао ниво статистичке значајности. Насупрот томе, новија истраживања показују да је LVD је статистички значајно већа CV-PTC него у FV-PTC (232). Поређењем густине крвних судова између MNG и ове две хистолошке варијанте карцинома, CV-PTC и FV-PTC, забележена је значајно нижа MVD у MNG у односу на обе хистолошке варијанте PTC, а нарочито у односу на CV-PTC (Графикон 13А).

На основу добијених резултата актуелне студије може се констатовати да се фоликуларна и класична варијанта папиларног карцинома међусобно разликују према ангиогеном и лимфангиогеном профили. С обзиром на то да је густина лимфних судова у FV-PTC значајно већа у односу на микроваскуларну густину може се закључити да је лимфангиогенеза доминантан процес у фоликуларној варијанти папиларног карцинома. Повећана густина крвних судова у класичној у односу на фоликуларну варијанту папиларног карцинома сугерише на то да ангиогенеза заузима

важно место у CV-PTC. У складу са тим, симултана анализа MVD и LVD у даљим истраживањима може да буде од помоћи у процени клиничког исхода различитих хистолошких варијанти PTC.

Услед регистрованих разлика у ангиогеном и лимфангиогеном профилу у CV-PTC и FV-PTC намеће се питање, какав је значај експресије VEGF, COX-2 и p27 у овим хистолошким варијантама папиларног карцинома?

Резултати ове студије по први пут показују да образац експресије испитиваних маркера варира у хистолошки различитим варијантама PTC. Процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је статистички значајно већа у CV-PTC (46.67%) у односу на FV-PTC (14.29%) (Графикон 11А) што имплицира да је пораст густине крвних судова у CV-PTC резултат повећане експресије VEGF. Уз наведено, процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је била значајно нижа у MNG (9.1%) у односу на обе хистолошке варијанте PTC (Графикон 13Б). Овакав налаз сугерише на закључак да је повећање експресије VEGF у CV-PTC и FV-PTC резултат ангиогеног свича у туморском ткиву што резултује и већом густином крвних судова у односу на нетуморско ткиво (MNG).

Интересантан је налаз да у FV-PTC постоји статистички значајна разлика између позитивне експресије COX-2 и p27, што није био случај у CV-PTC (Графикон 11Б). Односно, уз пораст позитивне експресије COX-2 регистрована је смањена процентуална заступљеност позитивне експресије p27 што сугерише на могућност да је овакав образац експресије COX-2 и p27 повезан са претходно забележеним порастом густине лимфних судова у FV-PTC. Изгледа да ова инверзна експресија COX-2 и p27 утиче на пролиферацију ендотелних ћелија лимфних судова, односно промовише лимфангиогенезу у FV-PTC. У прилог ове претпоставке је налаз друге студије која указује да индукција или повишена експресија COX-2 резултира повећаном продукцијом простагландина E2 који затим подстиче ћелијску пролиферацију тако што фосфорилацијом p27 блокира негативну регулацију ћелијског циклуса (233). Добро је познато да фосфорилисана форма p27 подлеже деградацији у протеозому (234).

Добијени резултати сугеришу да су VEGF, COX-2 и p27 важни биолошки маркери који условавају разлике у ангиогеном и лимфангиогеном потенцијалу између фоликуларне и класичне варијанте папиларног карцинома. На жалост, у овом истраживању експресија испитиваних маркера није анализирана и у другим

хистолошким варијантама РТС, високоћелијској варијанти и микрокарциномима, услед лимитираног броја испитаника. Да би се расветлио клинички значај интригантних налаза ове студије неопходна су додатна истраживања са већим бројем испитаника.

## 6. ЗАКЉУЧАК

Ангиогенеза заузима централно место у расту и локалном ширењу тумора и представља један од најранијих показатеља прогресије папиларног карцинома штитасте жлезде. Процес ангиогенезе углавном зависи од експресије VEGF. Фоликуларна и класична варијанта папиларног карцинома штитасте жлезде показују значајну хетерогеност у ангиогеном и лимфангиогеном потенцијалу који је условљен разликама у обрасцу експресије VEGF, COX-2 и p27.

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. густина крвних судова је већа у групи пацијената са високим ризиком, као и у групи РТС са детектованом васкуларном и локалном екстратироидном инвазијом
2. експресија VEGF значајно повећава густину крвних судова и последично промовише раст папиларног карцинома код пацијената са 50 и више година старости
3. VEGF и COX-2, заједно или самостално, су укључени у инвазију лимфних судова у папиларном карциному
4. не постоји значајна повезаност експресије COX-2 са густином лимфних судова у папиларном карциному
5. густина лимфних судова и p27 нису предиктори ризика код оболелих од папиларног карцинома
6. лимфангиогенеза је доминантна у фоликуларној варијанти папиларног карцинома што се огледа у већој густини лимфних судова у односу на микроваскуларну густину
7. пораст густине лимфних судова у фоликуларној варијанти папиларног карцинома је условљен инверзном експресијом COX-2 и p27 која вероватно утиче на пролиферацију ендотелних ћелија лимфних судова
8. густина крвних судова је значајно већа у класичној у односу на фоликуларну варијанту папиларног карцинома што је последица повећане експресије VEGF



## 7. СКРАЋЕНИЦЕ

<b>AJCC</b>	енгл. <i>American Joint Comittee on Cancer</i>
<b>ATC</b>	Анапластични карцином штитасте жлезде (енгл. <i>Anaplastic thyroid cancer</i> )
<b>CAFs</b>	Тумор- асоцирани фибробласти (енгл. <i>Cancer associated fibroblasts</i> )
<b>CAP</b>	енгл. <i>College of American Pathologist</i>
<b>CCL21</b>	енгл. <i>Chemokine (C-C motif) ligand 21</i>
<b>CCR-7</b>	енгл. <i>C-C chemokine receptor type 7</i>
<b>CDKs</b>	Циклин зависна киназа (енгл. <i>Cyclin-dependent kinase</i> )
<b>CIH</b>	енгл. <i>The Cancer Institute Hospiital</i>
<b>Cip/Kip</b>	Инхибитори циклин зависних киназа (енгл. <i>CDK interacting protein/Kinase inhibitor protein</i> )
<b>COX-1</b>	енгл. <i>Cyclooxygenase- 1</i>
<b>COX-2</b>	енгл. <i>Cyclooxygenase2</i>
<b>CSCs</b>	Туморске матичне ћелије (енгл. <i>Cancer stem cells</i> )
<b>CV-PTC</b>	Класична варијанта папиларног карцинома штитасте жлезде (енгл. <i>Classical variant of papillary thyroid carcinoma</i> )
<b>CXCL12</b>	енгл. <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>
<b>EP2</b>	Рецептор-2 за простагландин E2 (енгл. <i>Prostaglandin E2 receptor 2</i> )
<b>EP3</b>	Рецептор-3 за простагландин E2 (енгл. <i>Prostaglandin E2 receptor 3</i> )
<b>EP4</b>	Рецептор-4 за простагландин E2 (енгл. <i>Prostaglandin E2 receptor 4</i> )
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	енгл. <i>Estrogen receptor- alpha</i>
<b>ERK-1</b>	киназа 1 регулисана екстрацелуларним сигналом (енгл. <i>Extracellular signal-regulated kinase 1</i> ).
<b>ERK-2</b>	киназа 2 регулисана екстрацелуларним сигналом (енгл. <i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i> ).
<b>FTC</b>	Фоликуларни карцином штитасте жлезде (енгл. <i>Follicular thyroid carcinoma</i> )
<b>FV-PTC</b>	Фоликуларна варијанта папиларног карцинома штитасте жлезде (енгл. <i>Follicular variant of papillary thyroid carcinoma</i> )
<b>H&amp;E</b>	енгл. <i>Haematoxylin and eosin</i>

<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	енгл. <i>Hypoxia inducibile factor -1 alpha</i>
<b>HIF-1<math>\beta</math></b>	енгл. <i>Hypoxia inducibile factor- 1 beta</i>
<b>LVD</b>	Густина лимфних судова (енгл. <i>Lymphatic vessel density</i> )
<b>LYVE-1</b>	Хијалуронски рецептор ендоела лимфних судова (енгл. <i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1</i> )
<b>MAPK</b>	Протеин киназе активирани митогеном (енгл. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>MEN</b>	Мултипла ендокрина неоплазија (енгл. <i>Multiple endocrine neoplasia</i> )
<b>MMP-9</b>	Металопротеиназа- 9 матрикса (енгл. <i>Matrix metalloproteinase-9</i> )
<b>MMPs</b>	Металопротеиназе матрикса (енгл. <i>Matrix metalloproteinase</i> )
<b>MNG</b>	Мультинодуларна струма (енгл. <i>Multinodular goiter</i> )
<b>mRNA</b>	Информациона рибонуклеинска киселина (енгл. <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
<b>MTC</b>	Медуларни карцином штитасте жлезде (енгл. <i>Medullary thyroid carcinoma</i> )
<b>MVD</b>	Микроваскуларна густина (енгл. <i>Microvascular vessel density</i> )
<b>NRP-1</b>	енгл. <i>Neuropilin-1</i>
<b>NRP-2</b>	енгл. <i>Neuropilin-2</i>
<b>PAX8</b>	енгл. <i>Paired box gene 8</i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	енгл. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>PBS</b>	Фосфатни пуфер (енгл. <i>Phosphate-buffered saline</i> )
<b>PCM</b>	Папиларни микрокарцином (енгл. <i>Papillary microcarcinoma</i> )
<b>15-PGDH</b>	енгл. <i>15- hydroxyprostaglandin dehydrogenase NAD<sup>+</sup></i>
<b>PGE2</b>	Простагландин Е2 (енгл. <i>Prostaglandin E2</i> )
<b>PIGF</b>	Фактор раста плаценте (енгл. <i>Placental growth factor</i> )
<b>PI3K</b>	енгл. <i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	енгл. <i>Phospholipase C<math>\gamma</math></i>
<b>IP3</b>	енгл. <i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>

<b>PPARG</b>	енгл. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
<b>PTC</b>	Папиларни карцином штитасте жлезде (енгл. <i>Papillary thyroid carcinoma</i> )
<b>RET</b>	енгл. <i>Rearranged during transfection</i> )
<b>РНК</b>	Рибонуклеинска киселина
<b>ДНК</b>	Дезоксирибонуклеинска киселина
<b>ROC curve</b>	енгл. <i>Receiver operating characteristic</i>
<b>TNM</b>	енгл. <i>Tumour Nodal Metastases</i>
<b>UICC</b>	енгл. <i>Union for International Cancer Control</i>
<b>UK NEQAS</b>	енгл. <i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>
<b>VEGF</b>	Фактор раста васкуларног ендотела (енгл. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VEGFR</b>	Рецептор за VEGF (енгл. <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> )
<b>WHO</b>	Светска здравствена организација (енгл. <i>World Health Organisation</i> )

## 8. ЛІТЕРАТУРА

1. Liu S, Semenciw R, Ugnat AM, Mao Y. Increasing thyroid cancer incidence in Canada, 1979-1996: time trends and age-period-cohort effects. *Br J Cancer*. 2001; 85: p. 1335-1339.
2. Schneider DF, Chen H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63(6): p. 374-394.
3. de la Torre NG, Buley I, Wass JA, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behavior. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13 (3): p. 931–944.
4. DeLellis RA, Lloyd RV, HeitzPU, Eng C. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon (FR):IARC Press; 2004. p. 50-66.
5. Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H. Estrogen receptors ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions. *Mod Pathol*. 2003; 16: p. 437-444.
6. Derwahl M, Nicula D. Estrogen and its role in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5): p. T273-283.
7. Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Wilson YL, Schantz SP, Geliebter J, Tiwari RK. Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells. *Thyroid*. 2010;20(1): p. 33-41.
8. Dong W, Zhang H, Li J, Guan H, He L, Wang Z, Shan Z, Teng W. Estrogen Induces Metastatic Potential of Papillary Thyroid Cancer Cells through Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Int J Endocrinol*. 2013;2013:941568. doi: 10.1155/2013/941568.
9. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S. Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem*. 2004;279(39): p. 40255-40258.
10. Scopa CD. Histopathology of Thyroid Tumors. An Overview. *Hormones*. 2004; 3(2): p. 100-110.
11. Smallridge RC, Copland JA. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; 22: p. 486-497.
12. O'Neill JP, Shaha AR. Anaplastic thyroid cancer. *Oral Oncol*. 2013;49: p. 702-706.
13. Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R, Lloyd RV, LiVolsi VA, Papotti M, Sobrinho-Simoes M, Bussolati G, Rosai J. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(8): p. 1256-1267.

14. Sobrinho Simoes M, Asa SL, Kroll TG, Nikifirov Y, DeLellis R, Farid P, Kitamura Y, Nogouchi SU, Eng C, Harach HR, Williams ED, Schnider AB, Fagin JA, Ghossein RA, Mazzaferri EL, Lloyd RV, LiVolsi V, Chan JKC, Baloch Z, Clark OH. Follicular carcinoma. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (eds). WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics. Tumours of Endocrine Organs. IARC Press: Lyon, France, 2004. pp 67–76.
15. LiVolsi VA, Asa SL. The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* 1994;4: p. 233–236.
16. Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T. Follicular thyroid carcinoma. *Modern Pathology*. 2011; 24: p. S10–S18 .
17. Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Hürthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch* 2000;437: p. 107–115.
18. Maximo V, Soares P, Sobrinho Simoes M. Mitochondria and cancer. *Virchows Arch* 2009;454: p. 481–495.
19. Khan A, Nose V. In: Lloyd RV, editor. *Endocrine pathology: differential diagnosis and molecular advances*, 2nd ed. New York: Springer 2010; p. 181–236.
20. Hemminki K, Li X. Familial risk of cancer by site and histopathology. *Int J Cancer*. 2003;103: p. 105–109.
21. Iannuccilli JD, Cronan JJ, Monchic JM. Risk for malignancy of thyroid nodules as assessed by sonographic criteria: the need for biopsy. *J Ultrasound Med*. 2004; 23: p. 1455-1464.
22. Isaacs JD, Lundgren CI, Sidhu SB, Sywak MS, Edhouse PJ, Delbridge LW. The Delphian lymph node in thyroid cancer. *Ann Surg*. 2008; 247: p. 477–482.
23. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis. *Head Neck*. 1996; 18(2): p. 127–132.
24. Mercante G, Frasoldati A, Pedroni C, Formisano D, Renna L, Piana S, Gardini G, Valcani R, Barbieri V. Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients. *Thyroid*. 2009;19: p. 707-716.
25. Sebastian SO, Gonzalez JM, Paricio PP, Perez JS, Flores DP, Madrona AP, Romero PR, Tebar FJ. Papillary thyroid carcinoma: prognostic index for survival including the histologic variety. *Arch Surg*. 2000; 135: p. 272-277.
26. Maxon HR, Smith HS. Radioiodine-131 in the diagnosis and treatment of metastatic well-differentiated thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1990; 19: p. 685-671.
27. Lin JD, Chao TC, Chou SC, Hsueh C. Papillary thyroid carcinomas with lung metastases. *Thyroid*. 2004; 14: p. 1091-1096.
28. Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary thyroid carcinoma variants. *Head Neck Pathol*. 2011; 5(1): p. 51-56.

29. Ito Y, Hirokawa M, Uruno T, Kihara M, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A. Prevalence and biological behaviour of variants of papillary thyroid carcinoma: experience at a single institute. *Pathology*. 2008; 40: p. 617-622.
30. Lang BH, Lo CY, Chan WF Lam AK, Wan KY. Classical and follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study on clinicopathologic features and long-term outcome. *World J Surg*. 2006; 30: p. 752-758.
31. Hawk WA, Hazard JB. The many appearances of papillary carcinoma of the thyroid. *Cleve Clin Q*. 1976;43: p. 207- 215.
32. Ghossein R, Livolsi VA. Papillary thyroid carcinoma tall cell variant. *Thyroid* 2008;18: p. 1179-1181.
33. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer*. 1989; 63: p. 908–911.
34. Ito Y, Miyauchi A. Atherapeutic strategy for incidentally detected papillarymicrocarcinoma of the thyroid. *Nature Clin Practice Endocrinol Metab*. 2007;3: p. 240-248.
35. Pelizzo MR, Boschin IM, Toniato A, Piotto A, Bernante P, Pagetta C, Rampin L, Rubello D. Papillary thyroid microcarcinoma( PTCM): prognostic factors, management and outcome in 403 patients. *Eur J Surg Oncol*.2006; 32: p. 1114-1148.
36. Crile GJ, Hazard JB. Relationship of the age of the patient to the natural history and prognosis of carcinoma of the thyroid. *Ann Surg*. 1953; 138: p. 33–38.
37. Zidan J, Karen D, Stein M, Rosenblatt E, Basher W, Kuten A. Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma: clinical features prognostic factors, treatment, and survival. *Cancer* 2003; 97: p. 1181–1185.
38. Passler C, Prager G, Scheuba C, Niederle BE, Kaserer K, Zettinig G, Niederle B. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a long-term follow-up. *Arch Surg*. 2003; 138: p1362–1366.
39. Tielens ET, Sherman SI, Hruban RH, Ladenson PW. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study. *Cancer*. 1994; 73: p. 424–431.
40. Jain M, Khan A, Patwardhan N, Reale F, Safran M. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study of histopathologic features and cytology results in 141 patients. *Endocr Pract*. 2001;7: p 79–84.
41. Liu J, Singh B, Tallini G, Carlson DL, Katabi N, Shaha A, Tuttle RM, Ghossein RA. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer*. 2006;107(6): p1255-1264.
42. Wreesmann VB, Ghossein RA, Hezel M, Banerjee D, Shaha AR, Tuttle RM, Shah JP, Rao PH, Singh B. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: genome-wide appraisal of a controversial entity. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;40: p. 355–364.

43. Baloch ZW, Shafique K, Flannagan M, Livolsi VA. Encapsulated classic and follicular variants of papillary thyroid carcinoma: comparative clinicopathologic study. *Endocr Pract.* 2010; 16(6): p. 952-959.
44. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle R. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19(11): p. 1167-1214.
45. Parameswaran R, Brooks S, Sadler GP. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers. *Int J Surg.* 2010;8(3): p. 186-193.
46. Romitti M, Ceolin L, Siqueira Dr, Ferreira Cv, Wajner Sm, Maia Al. Signaling pathways in follicular cell-derived thyroid carcinomas. *International Journal Of Oncology* 2013; 42: p. 19-28.
47. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(7): p. 1454-1457.
48. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(2): p. 245-262.
49. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5): p. 2318-2326.
50. García-Rostán G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, Herrero A, Fusco A, Cameselle-Teijeiro J, Santoro M. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res.* 2005;65(22): p. 10199-10207.
51. Fagin JA, Wells SA Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med* 2016;375(11): p. 1054-1067.
52. Mesa C Jr, Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, Knauf JA, Weber GF, Fagin JA. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res.* 2006;66(13): p. 6521-6529.
53. Chakravarty D, Santos E, Ryder M, Knauf JA, Liao XH, West BL, Bollag G, Kolesnick R, Thin TH, Rosen N, Zanzonico P, Larson SM, Refetoff S, Ghossein R, Fagin JA. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest.* 2011;121(12): p. 4700-4711.
54. Abukhdeir AM, Park BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e19. doi: 10.1017/S1462399408000744.
55. Sasaki M, Sugio K, Kuwabara Y, Koga H, Nakagawa M, Chen T, Kaneko K, Hayashi K, Shioyama Y, Sakai S, Honda H. Alterations of tumor suppressor genes (Rb, p16, p27 and p53) and an increased FDG uptake in lung cancer. *Ann Nucl Med.* 2003;17(3): p. 189-196.

56. Fedele M, Palmieri D, Chiappetta G, Pasquinelli R, De Martino I, Arra C, Palma G, Valentino T, Pierantoni GM, Viglietto G, Rothstein JL, Santoro M, Fusco A. Impairment of the p27kip1 function enhances thyroid carcinogenesis in TRK-T1 transgenic mice. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: p. 483-490.
57. Ricarte-Filho JC, Li S, Garcia-Rendueles ME, Montero-Conde C, Voza F, Knauf JA, Heguy A, Viale A, Bogdanova T, Thomas GA, Mason CE, Fagin JA. Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2013;123(11): p. 4935-4944.
58. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*. 2000;290(5489): p. 138-141.
59. Derwahl M. Linking stem cells to thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3): p. 610-613.
60. Davies TF, Latif R, Minsky NC, Ma R. Clinical review: The emerging cell biology of thyroid stem cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(9): p. 2692-26702.
61. Rezza A, Sennett R, Rendl M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol*. 2014;107: p. 333-372.
62. Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, Gulotta G, Dieli F, Giordano S, De Maria R, Stassi G. Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010;70(21): p. 8874-8885.
63. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*. 2006;44(5): p. 265-274.
64. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9(4): p. 777-794.
65. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(5): p. C947-970.
66. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2008;73(7): p. 751-762.
67. Cao Y. Tumor angiogenesis and therapy. *Biomed Pharmacother* 2005;59(2): p. S340-343.
68. Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon*. 2009;7(3): p. 174-180.
69. McMahon G. VEGF receptor signalling in tumour angiogenesis. *The Oncologist* 2000;5(1): p. 3-10.
70. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001;61: p. 6050-6054.
71. Chaudary N, Hill RP. Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast Dis* 2006; 26: p. 55-64.



72. Saponaro C, Malfettone A, Ranieri G, Danza K, Simone G, Paradiso A, Mangia A. VEGF, HIF-1 $\alpha$  Expression and MVD as an Angiogenic Network in Familial Breast Cancer. *PLoS One*. 2013; 8(1): e53070. doi: 10.1371/journal.pone.0053070.
73. Garcea G, Doucas H, Steward WP, Dennison AR, Berry DP. Hypoxia and angiogenesis in pancreatic cancer. *ANZ J Surg*. 2006;76(9): p. 830-842.
74. Harris AL. von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* 2000;5(1): p. 32-36.
75. Ronca R, Benkheil M, Mitola S, Struyf S, Liekens S. Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Med Res Rev*. 2017 doi: 10.1002/med.21452.
76. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res*. 2009;69(18): p. 7243-7251.
77. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010;468(7325): p. 829–833.
78. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 2010;468(7325): p. 824–828.
79. Mashreghi M, Azarpara H, Bazaz MR, Jafari A, Masoudifar A, Mirzaei H, Jaafari MR. Angiogenesis biomarkers and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 2017; DOI 10.1002/jcp.26049.
80. Guo S, Colbert LS, Fuller M, Zhang Y, Gonzalez-Perez RR. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806 (1): p. 108–121.
81. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(5): p. 359–371.
82. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87:3336–3343.
83. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004; 56: p. 549–580.
84. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 2001; 85: p. 273–278.
85. Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, Sotiropoulou PA, Loges S, Lapouge G, Candi A, Mascre G, Drogat B, Dekoninck S, Haigh JJ, Carmeliet P, Blanpain C. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature*. 2011;478(7369): p. 399-403.

86. Dermond O, Ruegg C. Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal antiinflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resist Updat* 2001;4(5): p. 314-321.
87. Cha YI, Solnica-Krezel L, DuBois RN. Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase derived prostaglandins. *Developmental Biol* 2006;298: p. 263-272.
88. Meisenberg G, Simmons WH. *Principles of Medical Biochemistry* 1st edn. Missouri: Mosby, 1998: p. 567-570.
89. Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappiè O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression correlates with tumour angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterol* 2001;121: p. 1339-1347.
90. Kim HS, Youm HR, Lee JS, Min KW, Chung JH, Park CS. Correlation between cyclooxygenase-2 and tumour angiogenesis in non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003;42: p. 163-170.
91. Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, Lin JT. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 2005;12: p. 229-241.
92. Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasia and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001;91(2): p. 333-338.
93. Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006; 55(1): p. 115-122.
94. Wang D, Buchanan FG, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res* 2005;65(5): p. 1822-1829.
95. Wang D, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *PNAS* 2004;101(2): p. 415-416.
96. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: p. 4064-4068.
97. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105(11): p. 1589-1594.
98. Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV. Thromboxane A2 regulation of endothelial cell migration, angiogenesis and tumour metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267: p. 245-251.
99. Murphy JF, Fitzgerald DJ. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) induces cyclooxygenase (COX)-dependant proliferation of endothelial cells (EC) via the VEGF-2 receptor. *Faseb J* 2001;15(9): p. 1667-1669.

100. Hernández GL, Volpert OV, Iñiguez MA, Lorenzo E, Martínez-Martínez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 2001;193(5): p. 607-620.
101. Neagoe P-E, Lemieux C, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - A156 induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem* 2005; 280(11): p. 9904-9912.
102. Reis-Fillho JS, Schmitt FC. Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? *Microsc Res Techn*. 2003; 60: p. 171–180.
103. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB, Achen MG. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(3):p. 159-172.
104. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7(2): p. 192-198.
105. Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J*. 2001;20(17): p. 4762-4773.
106. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Biochem*. 2013;153(1): p. 13-19.
107. Kärpänen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, Tamagnone L, Alitalo K. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J*. 2006;20(9): p. 1462-1472.
108. Harris NC, Paavonen K, Davydova N, Roufail S, Sato T, Zhang Y-F, Karnezis T, Stacker SA, Achen MG. Proteolytic processing of vascular endothelial growth factor-D is essential for its capacity to promote the growth and spread of cancer. *FASEB J*. 2011; 25: p. 2615–2625.
109. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: p. 573–583.
110. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nature Med*. 2011; 17: p. 1371–1380.
111. Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J. Clin. Invest*. 2005; 115: p. 2316–2319.
112. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood*. 2007;109(3): p. 1010-1017.
113. Tammela T, He Y, Lyytikä J, Jeltsch M, Markkanen J, Pajusola K, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Distinct architecture of lymphatic vessels induced by chimeric vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor heparin-binding domain fusion proteins. *Circ Res*. 2007;100(10): p. 1468-1475.

114. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(2): p. 548-553.
115. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, Birner P, Krieger S, Hovorka A, Silberhumer G, Laakkonen P, Petrova T, Langer B, Raab I. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(3): p. 603-612.
116. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824): p. 50-56.
117. Shields JD, Emmett MS, Dunn DB, Joory KD, Sage LM, Rigby H, Mortimer PS, Orlando A, Levick JR, Bates DO. Chemokine-mediated migration of melanoma cells towards lymphatics-a mechanism contributing to metastasis. *Oncogene*. 2007;26(21): p. 2997-3005.
118. Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(21): p. 1638-1643.
119. Su JL, Shih JY, Yen ML, Jeng YM, Chang CC, Hsieh CY, Wei LH, Yang PC, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2004;64(2): p. 554-564.
120. Kubo H, Hosono K, Suzuki T, Ogawa Y, Kato H, Kamata H, Ito Y, Amano H, Kato T, Sakagami H, Hayashi I, Sugimoto Y, Narumiya S, Watanabe M, Majima M. Host prostaglandin EP3 receptor signaling relevant to tumor-associated lymphangiogenesis. *Biomed Pharmacother*. 2010;64(2): p. 101-106.
121. Hosono K, Suzuki T, Tamaki H, Sakagami H, Hayashi I, Narumiya S, Alitalo K, Majima M. Roles of prostaglandin E2-EP3/EP4 receptor signaling in the enhancement of lymphangiogenesis during fibroblast growth factor-2-induced granulation formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5): p. 1049-1058.
122. Karnezis T, Shayan R, Caesar C, Roufail S, Harris NC, Ardipradja K, Zhang YF, Williams SP, Farnsworth RH, Chai MG, Rupasinghe TW, Tull DL, Baldwin ME, Sloan EK, Fox SB, Achen MG, Stacker SA. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell*. 2012; 21(2): p. 181-195.
123. Sugitani I, Kasai N, Fujimoto Y, Yanagisawa A. A novel classification system for patients with PTC: addition of the new variables of large (3 cm or greater) nodal metastases and reclassification during the follow-up period. *Surgery*. 2004; 135: p. 139-148.
124. Heidenhain M. Noch einmal über die darstellung der centralkörper durch eisenhamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen über die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk* 1896; 13: p. 186.

125. Gurr AB. Biological staining methods. Hopkin and Williams Chadowell Heath 1976.
126. Radosavljevic G, Ljubic B, Jovanovic I, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Bankovic D, Knezevic M, Acimovic LJ, Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumor marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2010; 57: p. 135-144.
127. Avdalyan A, Bobrov I, Klimachev V, Lazarev A. Prognostic Value of Microvessel Density in Tumor and Peritumoral Area as Evaluated by CD31 Protein Expression and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Count in Endothelial Cells in Uterine Leiomyosarcoma. *Sarcoma* 2012; 2012:594512.
128. Aishima S, Nishihara Y, Iguchi T, Taguchi K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Lymphatic spread is related to VEGF-C expression and D2-40-positive myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 2008;21(3): p. 256-264.
129. Sobin L, Wittekind C, eds. TNM classification of malignant tumours. 5th edn. New York, Wiley-Liss Inc, 1997.
130. LiVolsi VA, Albores-Saavedrs J, Asa SL, Baloch ZW, Sobrinho Simoes M, Wenig B, DeLellis RA, Cady B, Mazzaferri EL, Hay I, Fagin JA, Weber JA, Caruso I, Voutilainen PE, Fransilla KO, Williams ED, Schneider AB, Nikiforov Y, Rabes HM, Akslen L, Ezzat S et al. Papillary carcinoma. In: DeLellis RA, Liloyd RV, Heitz PU, Eng C, eds. WHO: Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs. end 3, Lyon, France: IARC Press;2004: p. 57-66.
131. Ghossein R, Asa SL, Barnes L, Chan J, Harrison LB, Heffess CS, Hunt JL, Richardson MS, Shah J, Thompson LDR, Wenig BM. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the thyroid gland. Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition. College of American Pathologists (CAP). 2012.
132. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: p. 2474-2484.
133. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13: p. 1501–1512.
134. Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med* 1997; 126: p. 226–231 .
135. Carpi A, Rossi G, Romani R, Di Coscio G, Nicolini A, Simoncini T, Russo M, Mechanick J. Are risk factors common to thyroid cancer and nodule? A forty years observational time-trend study. *PLOS ONE* 2012; 7: e47758.
136. Choi YJ, Park YL, Koh JH. Prevalence of thyroid cancer at a medical screening center: pathological features of screen-detected thyroid carcinomas. *Yonsei Med J* 2008; 49: p. 748–756.
137. Siironen P, Ristimäki A, Narko K, Nordling S, Louhimo J, Andersson S, Haapiainen R, Haglund C. Expression of COX-2 is increased with age in papillary thyroid cancer. *Histopathology* 2004; 44: p. 490–497.

138. Gomes FG, Nedel F, Alves AM, Nör JE, Tarquinio SB. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci* 2013; 92: p 101-107.
139. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002; 29: p. 15-28.
140. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene.* 2012; 31: p. 4499-4508.
141. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82(1): p. 4-6.
142. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988;133(2): p. 419-423.
143. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(24): p. 1875-1887.
144. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 1992;340(8812): p. 145-146.
145. Miyata Y, Mitsunari K, Asai A, Takehara K, Mochizuki Y, Sakai H. Miya Pathological significance and prognostic role of microvessel density, evaluated using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy. *The Prostate.* 2015; 75: p. 84-91.
146. Zhuang H, Yang ZG, Chen HJ, Peng YL, Li L. Time-intensity curve parameters in colorectal tumours measured using double contrast enhanced ultrasound: correlations with tumour angiogenesis. *Colorectal Dis* 2012; 14: p. 181-187.
147. Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F. Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 1996; 9(6): p. 636-641.
148. Goldenberg JD, Portugal LG, Wenig BL, Ferrer K, Wu JC, Sabnani J. Well-differentiated thyroid carcinomas: p53 mutation status and microvessel density. *Head Neck* 1998;20(2): p. 152-158.
149. Fujii T, Yajima R, Hirakata T, Miyamoto T, Fujisawa T, Tsutsumi S, Ynagita Y, Iijima M, Kuwano H. Impact of the prognostic value of vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2014;34(3): p. 1255-1259.
150. Fujii T, Yajima R, Morita H, Hirakata T, Miyamoto T, Fujisawa T, Tsutsumi S, Ynagita Y, Iijima M, Kuwano H. Impact of vascular invasion of a primary tumor as a strong risk factor for disease recurrence in patients with node-positive breast cancer. *Am Surg* 2015;81(5): p. 523-526.

151. Minardi D, Lucarini G, Filosa A, Milanese G, Zizzi A, Di Primio R, Montironi R, Muzzonigro G. Prognostic role of tumor necrosis, microvessel density, vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in patients with clear cell renal carcinoma after radical nephrectomy in a long term follow-up. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(2): p. 447-455.
152. Gardner RE, Tuttle RM, Burman KD, Haddady S, Truman C, Sparling YH, Wartofsky L, Sessions RB, Ringel MD. Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000; 126(3): p. 309-312.
153. Stabenow E, Tavares MR, Ab´Saber AM, Parra-Cuentas ER, de Matos LL, Eher EMI, Capelozzi VL, Ferraz AR. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. *Clinics*. 2005;60(3): p. 233-240.
154. Hu A, Clark J, Payne RJ, Eski S, Walfish PG, Freeman JL. Extrathyroidal extension in well-differentiated thyroid cancer: macroscopic vs microscopic as a predictor of outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;133(7): p. 644-649.
155. Ortiz S, Rodríguez JM, Soria T, Pérez-Flores D, Piñero A, Moreno J, Parrilla P. Extrathyroid spread in papillary carcinoma of the thyroid: clinicopathological and prognostic study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124(3): p. 261-265.
156. Furlan JC, Bedard YC, Rosen IB. Significance of tumor capsular invasion in well-differentiated thyroid carcinomas. *Am Surg* 2007;73(5): p. 484-491.
157. Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol*. 2002; 17(2): p. 623-637.
158. Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 2002; 17: p. 599-621.
159. Koperek O, Scheuba C, Puri C, Birner P, Haslinger C, Rettig W, Niederle B, Kaserer K, Garin Chesa P. Molecular characterization of the desmoplastic tumor stroma in medullary thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 2007;31(1): p. 59-67.
160. Koperek O, Asari R, Niederle B, Kaserer K. Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma. *Histopathology* 2011; 58: p. 919–924.
161. Mai KT, Perkins DG, Yazdi HM, Commons AS, Thomas J, Meban S. Infiltrating papillary thyroid carcinoma: review of 134 cases of papillary carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1998; 122: p. 166–171.
162. Pilch H, Schlenger K, Steiner E, Brockerhoff P, Knapstein P, Vaupel P. Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts. *Int J Gynecol Cancer*. 2001; 11: p. 137-142.
163. Lennard CM, Patel A, Wilson J, Reinhardt B, Tuman C, Fenton C, Blair E, Francis GL, Tuttle RM. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery*. 2001; 129(5): p. 552-558.

164. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11(8): p. 1569-1579.
165. Belletti B, Ferraro P, Arra C, Baldassarre G, Bruni P, Staibano S, De Rosa G, Salvatore G, Fusco A, Persico MG, Viglietto G. Modulation of in vivo growth of thyroid tumor-derived cell lines by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene. *Oncogene*. 1999;18(34): p. 4860-4869.
166. Salajegheh A, Pakneshan S, Rahman A, Dolan-Evans E, Zhang S, Kwong E, Gopalan V, Lo CY, Smith RA, Lam AK. Co-regulatory potential of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C in thyroid carcinoma. *Hum Pathol*. 2013; 44: p. 2204-2212.
167. Fu SL, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Chen Y. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(13): p. 1971-1974.
168. Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G. COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study. *Int J Med Sci*. 2012; 9: p. 237-242.
169. Erdem H, Gündođdu C, Sipal S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2011; 90: p. 312-317.
170. Vieira JM, Santos SC, Espadinha C, Correia I, Vag T, Casalou C, Cavaco BM, Catarino AL, Dias S, Leite V. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop. *Eur J Endocrinol*. 2005; 153: p. 701-709.
171. Galdiero MR, Varricchi G, Marone G. The immune network in thyroid cancer. *Oncoimmunology*. 2016;5(6):e1168556. doi: 10.1080/2162402X.2016.1168556. .
172. Modi J, Patel A, Terrell R, Tuttle RM, Francis GL. Papillary thyroid carcinomas from young adults and children contain a mixture of lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(9): p. 4418-4425.
173. Cunha LL, Marcello MA, Ward LS. The role of the inflammatory microenvironment in thyroid carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(3): p. R85-R103.
174. Muzza M, Degl'Innocenti D, Colombo C, Perrino M, Ravasi E, Rossi S, Cirello V, Beck-Peccoz P, Borrello MG, Fugazzola L. The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010; 72(5): p. 702-708.
175. French JD, Kotnis GR, Said S, Raeburn CD, McIntyre RC Jr, Kloppper JP, Haugen BR. Programmed death-1+ T cells and regulatory T cells are enriched in tumor-involved lymph nodes and associated with aggressive features in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 97(6): p. E934-943.



176. Puztaszeri MP, Faquin WC, Sadow PM. Tumor-associated inflammatory cells in thyroid carcinomas. *Surg Pathol Clin* 2014; 7: p. 501–514.
177. Li B, Severson E, Pignon JC, Zhao H, Li T, Novak J, Jiang P, Shen H, Aster JC, Rodig S, Signoretti S, Liu JS, Liu XS. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol.* 2016;17(1):174. doi: 10.1186/s13059-016-102.
178. Liu CL, Lee JJ, Liu TP, Chang YC, Hsu YC, Cheng SP. Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio correlates with tumor size in patients with differentiated thyroid cancer. *J Surg Oncol.* 2013;107(5): p. 493-497.
179. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, Said S, Klopper JP, Haugen BR. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5): p. 2325-2333.
180. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep.* 2005;14(2): p. 425-431.
181. Qing W, Fang WY, Ye L, Shen LY, Zhang XF, Fei XC, Chen X, Wang WQ, Li XY, Xiao JC, Ning G. Density of tumor-associated macrophages correlates with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2012; 22(9): p. 905-910.
182. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *Journal of Hematology Oncology* 2017; DOI: 10.1186/s13045-017-0430-2.
183. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12(12): p. 1063-1073.
184. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol.* 2002;190(3): p. 279-286.
185. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer.* 2000; 89: p. 2637-2645.
186. Chan MW, Wong CY, Cheng AS, Chan VY, Chan KK, To KF, Chan FK, Sung JJ, Leung WK. Targeted inhibition of COX-2 expression by RNA interference suppresses tumor growth and potentiates chemosensitivity to cisplatin in human gastric cancer cells. *Oncol Rep.* 2007;18(6): p. 1557-1562.
187. Johnson GE, Ivanov VN, Hei TK. Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival. *Apoptosis.* 2008;13(6): p. 790-802.
188. Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci* 2008;99(8): p.1501-1506.
189. Choi EM, Kwak SJ, Kim YM, Ha KS, Kim JI, Lee SW, Han JA. COX-2 inhibits anoikis by activation of the PI-3K/Akt pathway in human bladder cancer cells. *Exp Mol Med.* 2005;37(3): p. 199-203.

190. Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res.* 2002; 62: p. 1567-1572.
191. Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A. Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms. *Histopathology.* 2003; 42: p. 492-497.
192. Fosslien E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 2001;31(4): p. 325-348.
193. Albrecht I, Christofori G. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int J Dev Biol* 2011;55(4-5): p. 483-494.
194. Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1): p. 167-177.
195. McCarter MD, Clarke JH, Harken AH. Lymphangiogenesis is pivotal to the trials of a successful cancer metastasis. *Surgery.* 2004; 135: p. 121-124.
196. Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Int J Dev Biol* 2011;55(4-5): p. 483-494.
197. Ikeda K, Oki E, Saeki H, Ando K, Morita M, Oda Y, Imamura M, Kakeji Y, Maehara Y. Intratumoral lymphangiogenesis and prognostic significance of VEGFC expression in gastric cancer. *Anticancer Res* 2014;34(8): p. 3911-3915.
198. Wang SL, Li SH, Chen WT, Chai CY. Expression of D2-40 in adjunct diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *APMIS* 2007;115(8): p. 906-910.
199. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere J, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, Vermeulen PB, Van Marck EA. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br J Cancer* 2006; 94(11): p. 1643–1649.
200. Arnaout-Alkarain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol* 2007;20(2): p. 183-191.
201. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Ferreira L, Scapulatempo C, Alves VA, Baltazar F, Schmitt F. Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. *Virchows Arch.* 2008; 452(2): p. 133-138.
202. Garcia EA, Simões K, Wakamatsu A, Ressio RA, Avancini V, Alves F, Longatto-Filho A, Camargo RS. Lymphatic vessel density and VEGF-C expression are significantly different among benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol.* 2010; 21: p. 101–107.
203. Duong T, Koopman P, Francois M. Tumor Lymphangiogenesis as a Potential Therapeutic Target. *Journal of Oncology* 2012; 2012: Article ID 204946 doi.org/10.1155/2012/204946.

204. Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 2005;11(23): p. 8364–8371.
205. Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein EA, Zhou M. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2006;19(3): p. 392–398.
206. El-Gohary YM, Metwally G, Saad RS, Robinson MJ, Mesko T, Poppiti RJ. Prognostic significance of intratumoral and peritumoral lymphatic density and blood vessel density in invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(4): p. 578–586.
207. Maula SM, Luukka M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res.* 2003;63(8): p. 1920–1926.
208. Inoue A, Moriya H, Katada N, Tanabe S, Kobayashi N, Watanabe M, Okayasu I, Ohbu M. Intratumoral lymphangiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma and relationship with regulatory factors and prognosis. *Pathol Int.* 2008;58(10): p. 611–619.
209. Zhao D, Pan J, Li XQ, Wang XY, Tang C, Xuan M. Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(10): p. 616–625.
210. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129: p. 716–719.
211. Lin JD. Papillary thyroid carcinoma with lymph node metastases. *Growth Factors.* 2007; 25(1): p. 41-49.
212. Yu XM, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Leung P, Luk JM. Increased expression of vascular endothelial growth factor C in papillary thyroid carcinoma correlates with cervical lymph node metastases. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: p. 8063-8069.
213. Lee SH, Lee SJ, Jin SM, Lee NH, Kim DH, Chae SW, Sohn JH, Kim WS. Relationships between Lymph Node Metastasis and Expression of CD31, D2-40, and Vascular Endothelial Growth Factors A and C in Papillary Thyroid Cancer. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2012; 5: p. 150-155.
214. Liu H, Xiao J, Yang Y, Liu Y, Ma R, Li Y, Deng F, Zhang Y. COX-2 expression is correlated with VEGF-C, lymphangiogenesis and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Microvasc Res* 2011;82(2): p. 131-140.
215. Timoshenko AV, Chakraborty C, Wagner GF, Lala PK. COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94(8): p. 1154-1163.
216. Hengst L, Reed SI. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;227: p. 25-41.

217. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(4): p. 253-267.
218. Moriya T, Sakamoto K, Sasano H, Kawanaka M, Sonoo H, Manabe T, Ito J. Immunohistochemical analysis of Ki-67, p53, p21, and p27 in benign and malignant apocrine lesions of the breast:its correlation to histologic findings in 43 cases. *Mod Pathol* 2000;13(1): p. 13-18.
219. Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodieci P, Osman I, Millard SS, Gaudin PB, Fazzari M, Zhang Z-F, Massague J, Scher HI. Distinct Altered Patterns of p27KIP1 Gene Expression in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998;90: p. 1284–1291.
220. Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, Zeltermann D, Viale G, Bosari S, Carcangiu ML. Downregulation of p27KIP1 and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol* 1999;23(6): p. 678-685.
221. Do S, Kim DH, Yang JH, Pyo JS, Kim K, Lee H, Do IG, Kim DH, Chae SW, Sohn JH. Decreased expression of p27 is associated with malignant transformation and extrathyroidal extension in papillary thyroid carcinoma. *Tumour Biol* 2016;37(3): p. 3359-3364.
222. Khoo MI, Freeman JL, Witterick IJ, Irish JC, Rotstein LE, Gullane PJ, Asa SL. Underexpression of p27/kip 1 in thyroid papillary microcarcinoma with gross metastatic disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128: p. 253-257.
223. Ito Y, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Papillary microcarcinomas of the thyroid with preoperatively detectable lymph node metastasis show significantly higher aggressive characteristics on immunohistochemical examination. *Oncology.* 2005; 68: p. 87-96.
224. Baldassarre G, Belletti B, Bruni P, Boccia A, Trapasso F, Pentimalli F, Barone MV, Chiappetta G, Vento MT, Spiezia S, Fusco A, Viglietto G. Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *J Clin Invest.* 1999; 104(7): p. 865-874.
225. Denicourt C, Saenz CC, Datnow B, Cui XS, Dowdy SF. Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer Res* 2007;67(19): p. 9238-9243.
226. Woliński K, Stangierski A, Szczepanek-Parulska E, Gurgul E, Budny B, Wrotkowska E, Biczysko M, Ruchala M. VEGF-C Is a Thyroid Marker of Malignancy Superior to VEGF-A in the Differential Diagnostics of Thyroid Lesions. *PLoS One.* 2016; 11:e0150124.
227. Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol.* 1997;150: p. 401-407.
228. Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol.* 1998;11: p. 169-174.

229. Yu XM, Schneider DF, Levenson G, Chen H, Sippel RS. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma is a unique clinical entity: a population-based study of 10,740 cases. *Thyroid*. 2013; 23: p. 1263-1268.
230. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinicopathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol*. 2003; 120: p. 71-77.
231. Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J. Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer*. 1985; 55(4): p. 805-828.
232. Pereira F, Pereira SS, Mesquita M, Morais T, Costa MM, Quelhas P, Lopes C, Monteiro MP, Leite V. Lymph Node Metastases in Papillary and Medullary Thyroid Carcinoma Are Independent of Intratumoral Lymphatic Vessel Density. *Eur Thyroid J* 2017;6(2): p. 57-64.
233. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Int J Cell Biol*. 2010; 2010:215158.
234. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 1995;269: p. 682-685.

## 9. ПРИЛОГ

### 9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

#### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број-РБ:**

**Идентификациони број -ИБР:**

**Тип документације -ТД:** Монографска публикација

**Тип записа -ТЗ:** Текстуални штампани материјал

**Врста рада- ВР:** Докторска дисертација

**Аутор-АУ:** Весна Шкулетић

**Ментор/коментор-МН:** Проф.др Гордана Радосављевић

**Наслов рада- НР:** Утицај експресије СОХ-2, Р27 и VEGF на стварање нових крвних и лимфних судова у ткиву класичних и фоликуларних варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде.

**Језик публикације-ЈП:** Српски/ћирилица

**Језик извода-ЈИ:** Српски/енглески

**Земља публикавања-ЗП:** Србија

**Уже географско подручје- УГП:** Централна Србија

**Година-ГО:** 2017

**Издавач-ИЗ:** Ауторски репринт

**Место и адреса-МС:** 34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69

**Физичи опис рада-ФО:** Страница 114, поглавља 7, графикона 23, шема 3, табела 10 слика 26 и цитата 234

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина-ДИ:** Патологија

**Предметна одредница/ кључне речи-ПО:** Папиларни карцином штитасте жлезде, ангиогенеза, лимфангиогенеза.

**УДК**

**Чува се -ЧУ:** У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

**Важна напомена-ВН:**

**Извод-ИД:** Папиларни карцином штитасте жлезде (енгл. *Papillary thyroid carcinoma*, РТС) је најчешћи малигни тумор штитасте жлезде, добро диферентован карцином са повољном прогнозом. Представља хетерогени ентитет који обухвата широк спектар хистолошки различитих варијанти. Ангиогенеза и лимфангиогенеза представљају фундаменталне процесе у прогресији тумора а најчешћи метод за њихову кватификацију је одређивање микроваскуларне густине (енгл. *Microvascular density*, MVD) и густине лимфних судова (енгл. *Lymphatic vessel density*, LVD).

Циљ студије је био процена значаја експресије VEGF, COX-2 и P27 на ангиогени и лимфангиогени профил папиларног карцинома штитасте жлезде, са посебним освртом на класичну и фоликуларну варијанту папиларног карцинома. Налаз значајно веће MVD код испитаника који су припадали групи високог ризика, са детектабилном васкуларном и локалном ектратироидном инвазијом, указује на то да прогресија РТС зависи од процеса ангиогенезе. Присутна висока специфичност и сензитивност MVD у односу на васкуларну инвазију упућују да MVD може да послужи као маркер за детерминацију васкуларне инвазије. Значајна повезаност повећане MVD са позитивном експресијом VEGF, али не и са експресијом COX-2, сугерише да процес ангиогенезе у РТС углавном зависи од експресије VEGF. Забележена је значајна повезаност експресије VEGF и COX-2 са старосном доби пацијената и величином тумора, као и са инвазијом туморских ћелија у лимфне судове. Упркос томе што није забележена статистички значајна повезаност LVD ни са једним од клиничких и патохистолошких параметара РТС. У фоликуларној варијанти РТС, LVD је значајно већа у односу на MVD, што није био случај код класичне варијанте РТС. Налаз инверзне експресије, тј. Повећане експресије COX-2 и смањене експресије p27 у фоликуларној варијанти РТС је вероватно повезан са забележеним порастом LVD у овој хистолошкој варијанти. Ову претпоставку подржавају сазнања да COX-2 путем повећане продукције простагландина, блокира активност p27 и подстиче ћелијску пролиферацију. Статистички значајно виша MVD у класичној варијанти РТС него код фоликуларне варијанте РТС, праћена је и статистички значајно већом процентуалном заступљеношћу позитивне експресије VEGF у класичној у односу на фоликуларну варијанту РТС. На основу добијених резултата, може се констатовати је лимфангиогенеза доминантан процес у фоликуларној варијанти РТС, док је у класичној варијанти РТС кључан процес ангиогенеза.

Закључак студије је да класична и фоликуларна варијанта РТС показују значајну хетерогеност у ангиогеном и лимфангиогеном потенцијалу који је условљен разликама у обрасцу експресије VEGF, COX-2 и p27. Значај квантификације степена ангиогенезе у РТС поред предиктивног значаја може послужити и као метод за диференцирање класичне од фоликуларне варијанте, што би могло да има клиничке и потенцијално терапијске импликације.

**Датум прихватања теме од стране ННВ-ДП:** 28.11.2012

**Датум одбране- ДО: 20 .09.2017.**

**Чланови комисије-КО:**

1. **Проф. др Небојша Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области *Микробиологија и имунологија; Онкологија*, председник.
2. **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области *Микробиологија и имунологија; Онкологија*, члан.
3. **Проф. др Снежана Церовић**, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Патологија*, члан.



## 9.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC**  
**FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number - ANO:**

**Identification number – INO:**

**Documentation type – DT:** Monographic publication

**Type of record – TR:** Textual printed material

**Contents code – CC:** Ph. D. Thesis

**Author – AU:** Vesna Škuletić

**Menthor/co-mentor–MN:** Prof. Gordana Radosavljević, M.D.Ph.D

**Title – TI:** The influence of COX-2, P27 and VEGF expression on creation of new blood and lymph vessels in tissue of classical and follicular variants of papillary thyroid carcinoma

**Language of text – LT:** Serbian / Cyrillic

**Language of abstract:** Serbian / English

**Country of publication – CP:** Serbia

**Locality of publication – LP:** Central Serbia

**Publication year- PY:** 2017

**Publisher – PU:** Author reprint

**Publication place – PP:** 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69

**Physical description – PD:** Pages 114, chapters 7, graphs 23, scheme 3, tables 10, pictures 26, citations 234

**Scientific field – SF:** Medicine

**Scientific discipline – SD:** Pathol

**Subject/key words –SKW:** Papillary thyroid carcinoma, angiogenesis, lymphangiogenesis

**UDC - Holding data:** Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Serbia

**Note – N:**

**Abstract – AB:** Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common type of thyroid malignancy, well-differentiated carcinoma with favorable prognostic outcome. It represents heterogenous entity which comprises wide spectar of histologically different variants. Angiogenesis and lymphangiogenesis are fundamental processes for tumor progression and frequently used methods for their quantifying are determining the microvascular density (MVD) and lymphatic vessel density (LVD).

The purpose of this study was to evaluate the angiogenic and lymphangiogenic phenotypes of PTC, with special focus on classical and follicular variant of PTC. The finding of significantly higher MVD in high risk patients as well as in patients with vascular and local extrathyroidal invasion, indicates that the progression of PTC is an angiogenesis-dependent process. The presence of high sensitivity and specificity of MDV regarding vascular invasion suggests that MVD may serve as a valuable marker for the determination of vascular invasion in PTC. Significant associations between higher MVD and positive VEGF expression, but not with the COX-2 expression, suggest that angiogenesis in PTC is mostly VEGF-dependent. The present study demonstrates significant association between expression of VEGF and COX-2 and patient age and tumor size, as well as lymph vessel invasion. However, there were no significant associations between LVD and clinicopathological parameters of PTC. The present study provides evidence that LVD in FV-PTC was increased compared to MVD. Inversive expression, respectively, high frequency of COX-2 expression accompanied with lower frequency of p27 expression in FV-PTC is probably related with increased LVD. This hypothesis supports the findings that COX-2 induction results in increased production of prostaglandins, which further increases cell proliferation via blocking activity p27. Statistically significantly higher MVD in CV-PTC than in FVPTC is associated with higher percentage distribution of VEGF. Based on the results obtained, it can be concluded that lymphangiogenesis is a dominant process in FV-PTC, while the angiogenesis has crucial significance in CV-PTC.

Conclusion of the study is that classical and follicular variants of PTC show significant heterogeneity in regard to angiogenic and lymphangiogenic potential determined by the differences within the pattern of expression of VEGF, COX-2 and p27. Quantification of the degree of angiogenesis, beside predictive significance in PTC, could well serve as the method for differentiation of classical from follicular variant, which could have clinical and potentially therapeutic implications.

**Accepted by the Scientific Board on – ASB: 28.11.2012.**

**Defended on – DE: 20.09.2017.**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty) – DB:**

1. **Full Professor, Nebojša Arsenijević**, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, Chairman;
2. **Associate Professor, Ivan Jovanović**, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, member;
3. **Full Professor, Snežana Cerović**, Faculty of Medicine of Military Medical Academy, University of Defence Belgrade, member.

## БИОГРАФИЈА

Весна Шкулетић рођена је 30.04.1968. године у Сарајеву. Основну и средњу школу завршила у Нишу. Дипломирала на Медицинском факултету Универзитета у Београду 1997. године са просечном оценом 8,70 и стекла звање доктора медицине. Специјалистичке студије из области Патолошке анатомије уписала школске 1998/1999. године у Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у Београду, а специјалистички испит је положила 2001. године. Од априла 2002. године ради у Одсеку за цитологију, Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије, где је постављена за начелника 2005. године. Академске докторске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је школске 2007/2008. године, изборно подручје Онкологија, а усмени докторски испит положила у мају 2009. године са оценом 10. Тема докторске дисертације под називом "Утицај експресије COX-2, P27 и VEGF на стварање нових крвних и лимфних судова у ткиву класичних и фоликуларних варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде" је прихваћена 2012. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Школске 2011/2012. године је изабрана у звање сарадника у настави на предмету Патологија Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду. Школске 2012/2013. године је изабрана у звање асистента, а школске 2016/2017. године реизабрана у звање асистента.

Учесник је јуниор пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом: "Утицај експресије COX-2, P27 и VEGF на стварање нових крвних и лимфних судова у ткиву класичних и фоликуларних варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде" (ЈП 27/12). Активно се бави научно-истраживачким радом и на Институту за патологију и судску медицину ВМА Универзитета одбране у Београду.

Члан је Европског удружења патолога, Удружења патолога и цитолога Србије и Српског лекарског друштва.

Аутор је и коаутор једне монографије и више радова објављених у међународним и националним часописима.

Служи се еглеским језиком.

## БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Skuletić V**, Radosavljevic GD, Pantic J, Markovic BS, Jovanovic I, Jankovic N, Petrovic D, Jevtovic A, Dzodic R, Arsenijevic N. Angiogenic and lymphangiogenic profiles in histological variants of papillary thyroid carcinoma. *Pol Arch Intern Med* 2017; 127(6):429-437. **M21**
2. Tatomirović Ž, **Škuletić V**, Peković D, Karličić V, Đurović B, Ristić S, Tomić Lj, Džambas J, Cerović S. The value of transbronchial needle aspiration cytology in the diagnosis of stage I and II sarcoidosis. *Vojnosanit Pregl* 2017; 74(6):536-542. **M23**
3. Tatomirović Ž, **Škuletić V**, Tufegđić I, Tomić Lj, Džambas J, Tarabar D. The value of brush cytology and biopsy for the diagnosis of colorectal cancer. *Vojnosanit Pregl* 2017; 74(7):659-665. **M23**
4. Novković D, **Skuletić V**, Vulin A, Cvetković G. Exercise-induced bronchoconstriction and non-specific airway hyperreactivity in patients suffering from bronchial asthma. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(2):191-194. **M23**
5. Terzić B, Maksić D, **Skuletić V**, Pilcević D, Mijusković M, Cukić Z, Obrencević K, Petrović M, Tadić-Pilcević J, Petrović M. Myeloma multiplex with pulmonary dissemination. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(6): 596-599. **M23**
6. Novković D, **Skuletić V**, Vuković J, Cerović S, Tomić I, Karličić V, Stojisavljević M. Disseminated typical bronchial carcinoid tumor. *Vojnosanit Pregl* 2013;70(5): 516-521. **M23**
7. Tatomirović Ž, **Skuletić V**, Bokun R, Trimčev J, Radić O, Cerović S, Štrbac M, Zolotarevski L, Tukić Lj, Stamatović D, Tatabar O. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of head and neck masses: accuracy and diagnostic problems. *J BUON* 2009;14:65

***ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ***

Ја, Весна Шкулетић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај експресије СОХ-2, Р27 и VEGF на стварање нових крвних и лимфних судова у ткиву класичних и фоликуларних варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 21.09.2017. године.

потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Весна Шкулетић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај експресије СОХ-2, Р27 и VEGF на стварање нових крвних и лимфних судова у ткиву класичних и фоликуларних варијанти папиларног карцинома штитасте жлезде

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 21.09.2017. године.

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>