



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Весна Шкулетић

**Утицај експресије COX-2, P27 и VEGF на стварање нових крвних и  
лимфних судова у ткиву класичних и фоликуларних варијанти  
папиларног карцинома штитасте жлезде**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: проф др Гордана Радосављевић

**КРАГУЈЕВАЦ 2017**

# 1. УВОД

Предмет овог истраживања је испитивање значаја експресије VEGF, COX-2 и p27 за ангиогени и лимфангиогени фенотип папиларног карцинома штитасте жлезде, као и његових хистолошких варијанти: фоликуларног и класичног папиларног карцинома. У уводном делу приказани су општи аспекти који су потенцијално важни за разматрање резултата актуелне студије: опште патолошке карактеристике карцинома штитасте жлезде, 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 развој 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 води ка леталном исходу (3).

Добро је познато 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. Тако, 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

веза између естрогенског и Wnt сигналног пута 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 средње диферентован тумор који води порекло од парафоликуларних С-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 С- 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 малигних ћелија са еозинofilном цитоплазмом, тамним једрима и умереним митотским индексом. Клинички ток медуларног карцинома варира од индолентне форме до агресивне варијанте са високом стопом смртности. Метастазира лимфогено и хематогено.

**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 вретенастих, анапластичних и хиперхроматичних ћелија са израженом митозом. Изузетно се брзо се шири у околно ткиво и успоставља метастазе 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 препознатог добро диферентованог карцинома (12).

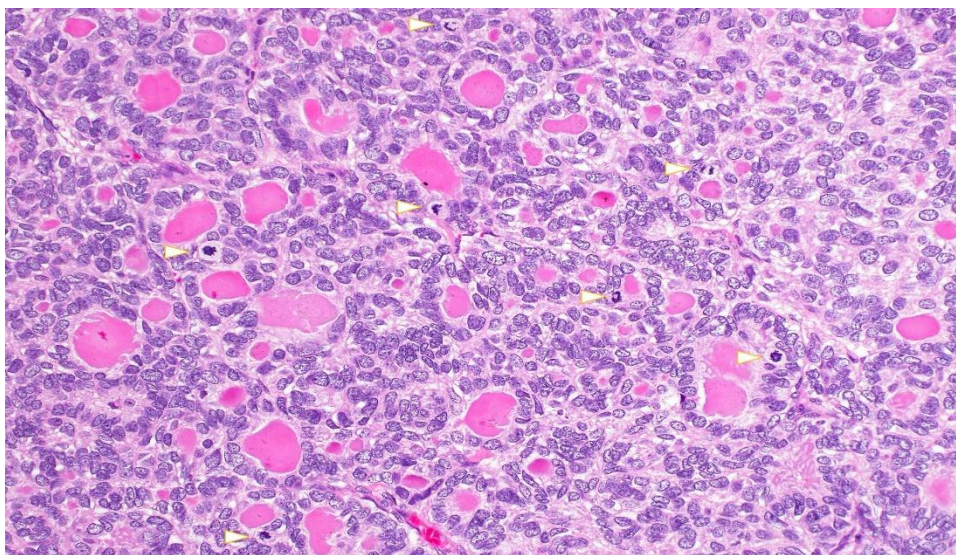
За разлику од претходно наведена два типа малигнома, добро диферентовани тумори су најчешћи тумори штитасте жлезде. То су фоликуларни и папиларни карцинома који, по правилу, имају добру прогнозу ако се примене сви ефикасни начини лечења.

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

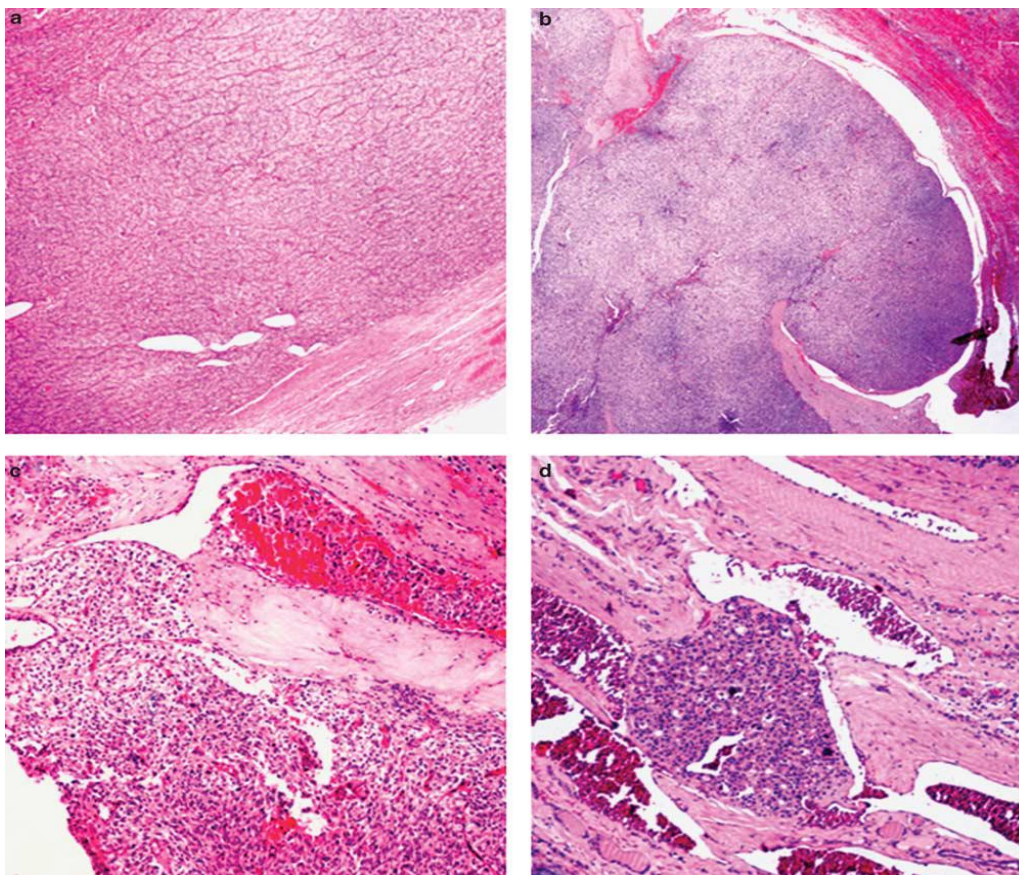
Увођењем строжијих критеријума за препознавање капсуларне и/или васкуларне инвазије, као и поштовањем свих карактеристика "нуклеарног сета" број дијагностикованих FV-РТС је у порасту, док број FTC опада (14), (15). Смањеној инциденци FTC широм света, а нарочито у последњој деценији, допринели су и спроведени пројекти за корекцију недостатка јода. Прогноза FTC 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 они FTC, који су грађени од онкоцитних ћелија или показују солидни, трабекуларни или инсуларни начин раста, много слабије реагују на терапију радиоактивним јодом. Стога оболели од овакве форме FTC имају лошију прогнозу (17), (18).

Хистолошки изглед FTC варира, од мале до средње величине фоликула, затим од 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 једра 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), тако и ангиоинвазивног FTC (са агресивнијим потенцијалом) где је неопходна детекција бар једног крвног суда који је јасно инвадиран туморским ћелијама (Слика 2).



**Слика 1.** Фоликуларни карцином штитасте жлезде у коме се уочавају мали до средње велики фоликули који су испуњени колоидом



**Слика 2. Хистолошки изглед FTC са минималном капсуларном инвазијом и ангиоинвазивног FTC.**  
А) Микрофоликуларни/солидни раст тумора са задебљаном капсулом; Б) Фокална капсуларна инвазија; Ц и Д) Васкуларна инвазија.

**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, а 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, лоциран преларингеално, представља лош прогностички знак и упућује на унапредовану форму болести (22).

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 код старијих је повезано са лошом прогнозом болести (23).

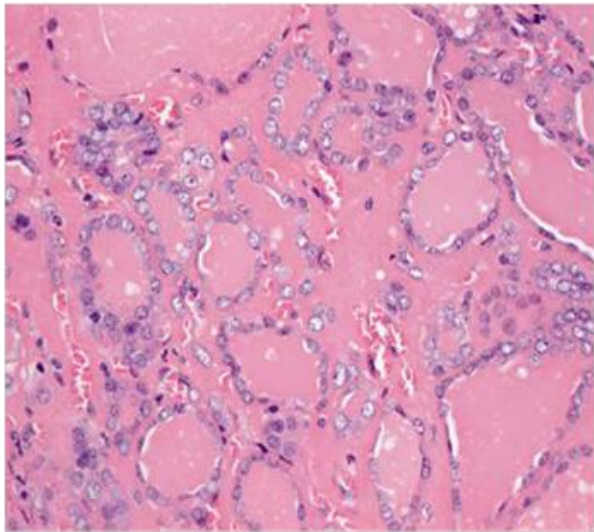
Као прогностички фактори за развој рецидива РТС наводе се капсуларна инфилтрација и екстратироидна инвазија (24). Тако, туморска инвазија у околне мишиће и мека ткива повезана је како са повећаном инциденцом метастазирања у удаљене органе тако и са већом стопом смртности (25). Потенцијал за дисеминацију 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).

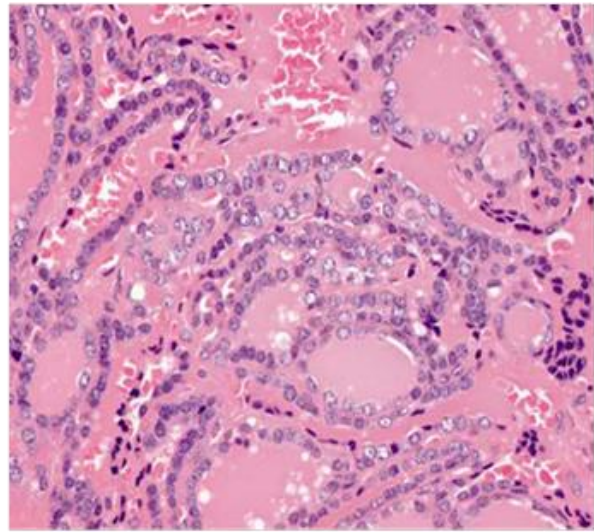
Хистолошка структура папиларног карцинома је варијабилна, а главни цитолошки критеријуми (4) за постављање дијагнозе су:

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

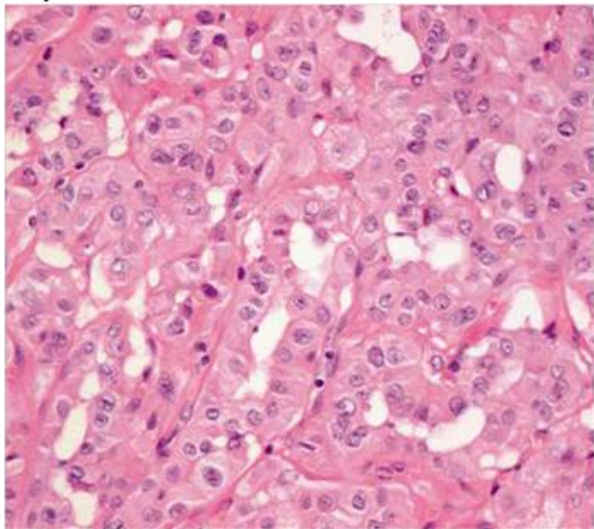
A)



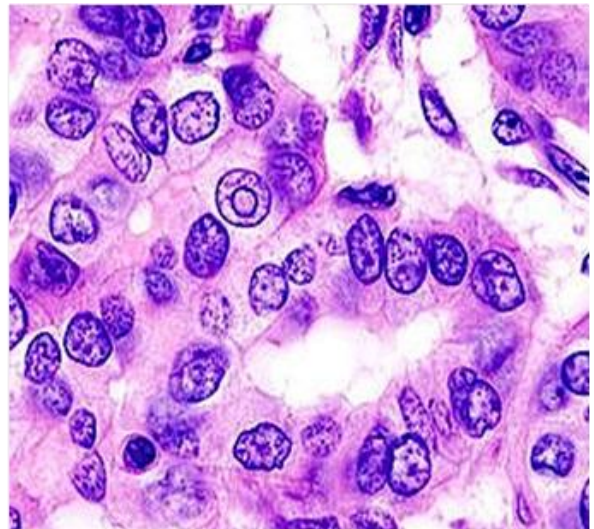
Б)



В)



Г)



**Слика 3. Патолошко-истолошке карактеристике папиларног карцинома штитасте жлезде.** А) Једра су увећана, хипохроматична, ирегуларног облика и често се гомилају и преклапају; Б) Кондесација хроматина уз једарну мембрану резултира карактеристичним изгледом једра која су или "празна" или имају изглед "мутног стакла"; В и Г) Неправилност једарних овојница резултује развојем једарних усека и интрануклеарних псеудоинклузија.

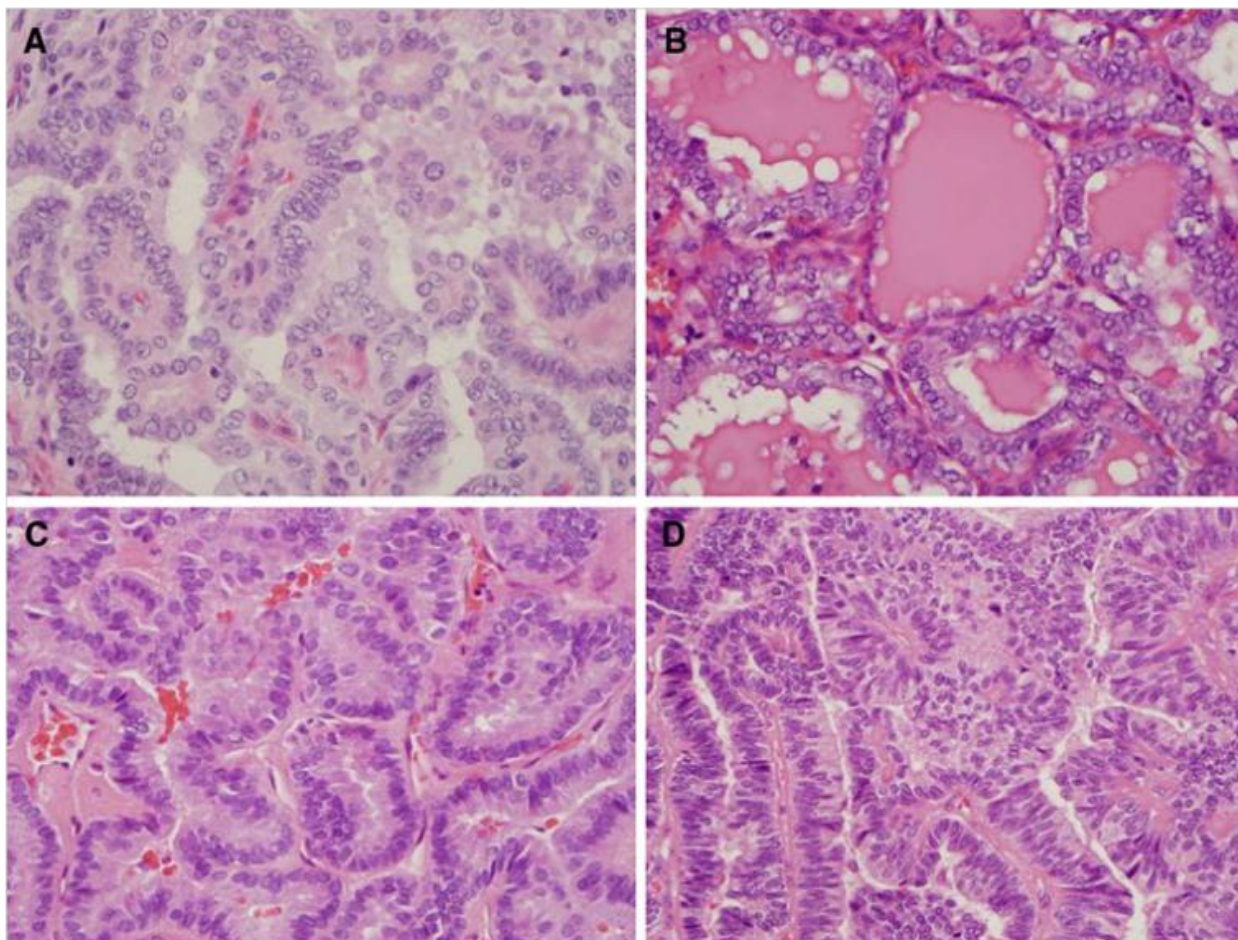


## 1.2. Хистолошке варијанте папиларног карцинома штитасте жлезде

Папиларни карцином штитасте жлезде је хетероген ентитет који обухвата широк спектар хистолошки различитих варијанти, а то су класична и фоликуларна варијанта, затим микрокарцином, високоћелијска варијанта, онкоцитни, цилиндричноћелијски тип, дифузно склерозирајући, солидни, светлоћелијски, крибриформно моруларни и макрофоликуларни тип, РТС са "*fascitis-like*" стромом, РТС налик *Warthin*-овом тумору, мешовити папиларно-медуларни карцином, као и папиларни карцином код кога се региструје дедиференцијација у анапластични карцином (28). С обзиром на претпоставку да варијације у молекулском профилу свих наведених хистолошких варијанти условавају различити исход болести важно је прецизно дефинисање морфолошких карактеристика којима се разликују хистолошке варијанте папиларног карцинома (29).

**Класична варијанта папиларног карцинома штитасте жлезде** (енгл. *classical variant of papillary thyroid carcinoma, CV-РТС*) је најчешћа хистолошка варијанта коју карактеришу разгранате папиларне структуре. Папиле чине малигне ћелије са еозинофилном цитоплазмом и увећаним једром са свим одликама карактеристичног "нуклеарног сета" (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-РТС*) 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 РТС. Уз то, може се регистровати карактеристичан хиперезинофилни колоид са периферним "тестерастим" ивицама, као и мултиједарне циновске ћелије и изузетно ретко псамозна телашца (Слика 4Б).

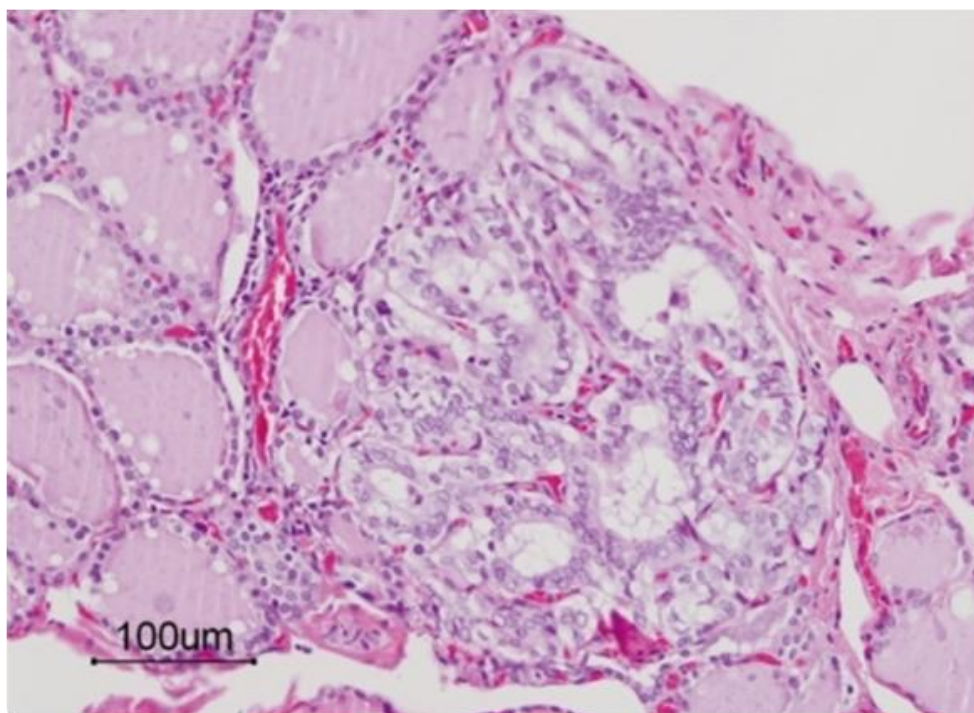


**Слика 4. Хистолошке варијанте папиларног карцинома.** А) Класична хистолошка варијанта са папиларним структурама у чијем се средишту налази фиброваскуларно језгро, док су једра туморских ћелија увећана и хипохроматична; Б) У фоликуларној варијанти РТС уочавају се фоликули који имају увећана једра. Колоид је тамније боје и "тестерасто" на зубљених ивица; Ц) Код високоћелијске варијанте једра туморских ћелија су са карактеристикама РТС и ецентрично су постављена уз базалну мембрану; Д) Цилиндрична ћелијска подваријанта са псеудостратификацијом ћелија у којима се преклапају увећана једра.

**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 уочава оксифилна цитоплазма, а једра су локализована уз саму базалну мембрану (Слика 4Ц). 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 препознат. За постављање дијагнозе високоћелијске хистолошке варијанте неопходно је да се региструје више од 50% туморских ћелија

изгледа "високих ћелија" (32). Додатно, постоји цилиндрични подтип ове хистолошке варијанте у коме се уочава псеудостратификација ћелија (Слика 4Д).

**Папиларни микрокарцином** је дефинисан као папиларни карцином пречника од 1cm и мање, и илустрован је на Слици 5 (33). Обично се случајно открива у току тироидектомије бенигнух лезија или се открива код пацијената са метастазама у регионалним лимфним жлездама или у удаљеним метастазама (34). Мада је у већини случајева индолентан, резултати неких истраживања указују на лошу прогнозу која је повезана са присуством неких патохистолошких параметара, као што су мултифокалност, екстратироидно ширење и присутне метастазе у регионалним лимфним жлездама (35).



**Слика 5.** Папиларни микрокарцином са једрима карактеристичним за папиларни карцином штитасте жлезде

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 понашење 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 мањи 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) документовано је 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 успостављања метастаза 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 на да FV-PTC поседују агресивнији потенцијал и склони су да успостављају метастазе у плућима (39).

Фоликуларна хистолошка варијанта је чешће инкапсулирана него класична варијанта папиларног карцинома (40) и биолошко понашање ове инкапсулиране форме је слично фоликуларном аденому или карциному (41). Даље, анализом молекулске основе FV-PTC примећено је да је молекулски профил FV-PTC ближи 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 оваква 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). Стога, током последњих деценија, бројна истраживања су углавном фокусирана на идентификацију генетских промена, као и на разумевање молекулских догађаја укључених у генезу диферентованих карцинома

штитасте жлезде, што може да омогући нови терапијски приступ у лечењу, а 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 и 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 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, значајне 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 индукција 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, као и 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 малигнућих ћелија (52). Сем тога, за овакве

хистолошке варијанте РТС карактеристична је рефрактарност на радиоактивни јод. Претпоставља 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 РТС 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. Наиме, у овим мишевима 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 изазаваним 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).

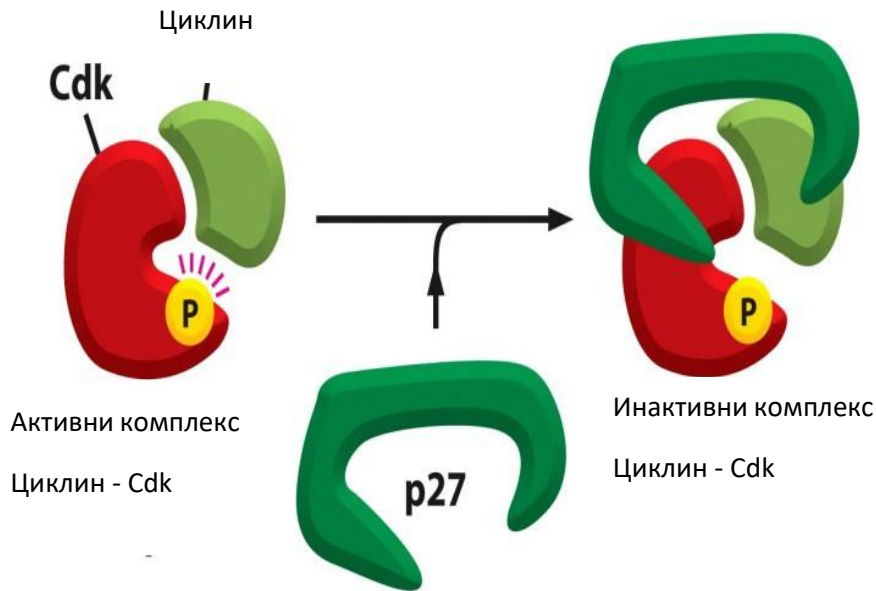


Figure 17-19 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

### Схема 1. Биолошка улога протеина p27

Новија истраживања сугеришу на то да су у генезу карцинома штитасте жлезде укључене и мутиране тиороидне матичне и прогениторске ћелије (59). Ћелијска деоба диферентованих ћелија је предуслов за акумулацију мутација и/или генетских и епигенетских промена што резултује онкогенезом тумора. Међутим, претпоставља се да алтернативни извор у генези тумора, укључујући карцином штитасте жлезде, су матичне и прогениторске ћелије (59), (60). Матичне ћелије су недиферентоване ћелије које имају способност самообнављања. Ове ћелије 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 недозвољавају матичним ћелијама да уђу у неконтролисану ћелијску деобу. Одређени услови, нпр. 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 фоликуларном, папиларном

и недиферентованом карциному штитасте жлезде регистрована је мала популација CSCs (енгл. *cancer stem cells*). Интересантно је запажање да ортотопска апликација малог броја тироидних CSCs резултује агресивнијим метастатским потенцијалом недиферентованог карцинома штитасте жлезде (62).

## 1.4. Ангиогенеза и лимфангиогенеза у тумору

### 1.4.1a. Механизми неоангиогенезе

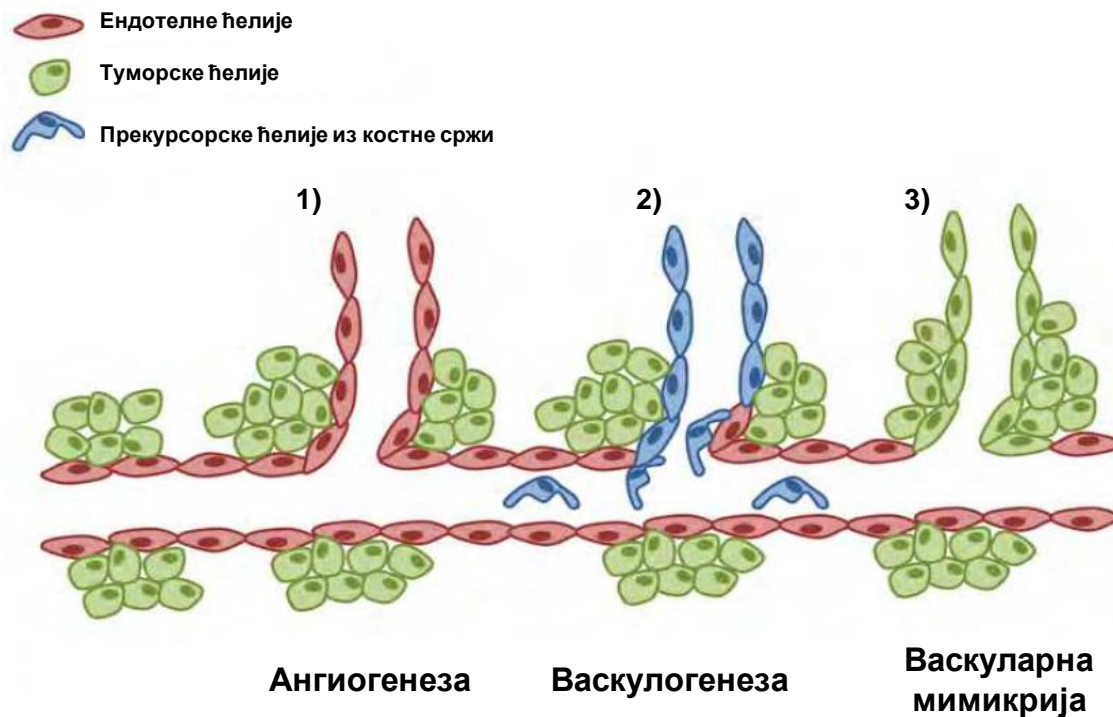
Ангиогенеза је процес формирања нових из већ постојећих крвних судова и од суштинског је значаја за многе физиолошке процесе, укључујући ембрионални развој и зрастање ране (63), (64). Овај генетски програмиран и динамичан процес је под строгим контролом две врсте молекула, а то су: с једне стране **проангиогени фактори** који стимулишу стварање нових крвних судова и с друге стране **антиангиогени фактори** који инхибирају ангиогенезу. Ангиогенеза се локално активира под утицајем стимулаторних сигнала што каскадно покреће след кључних корака: 1) активацију ендотелних ћелија; 2) протеолитичку разградњу базалне мембране посткапиларне венуле и локалног ванћелијског матрикса; 3) пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија; 4) пупљење и раст ендотелних трака и формирање капиларне петље; 5) матурацију и стабилизацију новонасталог крвног суда (65). Сви поменути кораци који се одигравају током физиолошке ангиогенезе су регулисани деликатном равнотежом између про- и антиангиогених фактора (66). Строго координисана и регулисана интеракција бројних ендогених про- и антиангиогених 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 мутације k-ras, raf или p53 индукују повећану синтезу и секрецију 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 хаотичном распоредом. Резултат је 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 $\beta$  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 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, у неким врстама тумора (нпр. меланому, глиобластому и саркому), малигне ћелије и макрофаги показују изражену пластичност односно способност да трансдиферентују у ћелије сличне ендотелним ћелијама и на тај начин формирају сопствену васкуларну мрежу. 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 нама доступне литературе указују да специјална популација туморских ћелија, односно туморске матичне ћелије (енгл. *cancer stem cells*, 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 су још једни 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 метастатских ћелија у удаљене органе.

#### 1.4.16. 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 у 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 дуже 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, перичитима и глатко мишићним ћелијама, макрофагима и дендритским ћелијама (79). Везивањем за VEGFR-2 на ендотелним ћелијама, VEGF покреће бројне интацелуларне сигналне путеве укључене у пролиферацију, преживљавању 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 моноклеарних и полимофонуклеарних леукоцита у туморску микросредину. Уз то, претпоставља се доприноси миграцији и инвазији неких туморских ћелија (нпр.

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 мишијег и хуманог карцинома дојке (84). Стога, сматра се да туморске ћелије, у неповољним условима: хипоксија, 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. Штавише, примећено је да делеција гена за неуропилин-1 (енгл. *neuropilin-1*, Nrp1) односно корецептора 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: с једне стране паракрино подстиче ангиогенезу и на тај начин креира периваскуларну нишу за CSCs, док с друге стране VEGF 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 до простагландина. 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, а под утицајем фактора раста и медијатора запаљења експресија COX-2 се рапидно повећава (87), (88).

Резултати бројних истраживања показују да је повећана експресија COX-2 у већини тумора, укључујући карцином колоне, простате, плућа, дојке, панкреаса и желуца, повезана са унапредованим 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 колоне 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 СОХ-2 промовише ангиогенезу и да на тај начин подстиче малигни фенотип туморских ћелија (95). Наиме, регистровано је да експресија СОХ-2 корелира са повећаном микроваскуларном густином у експерименталном моделу карцинома колона, плућа и желуца (96), (97). Уз наведено, уочено је да продукција простагландина, а нарочито тромбоксана А<sub>2</sub> и PGE<sub>2</sub> повећава неоангиогенезу (98). Изгледа да СОХ-2 пореклом из ендотелних ћелија и ћелија туморске строме модулише ангиогенезу. Тако, документована 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 СОХ-2 и последично PGI<sub>2</sub> у овим ћелијама. Коначан резултат ове координисане сарадње VEGF и СОХ-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 PGI<sub>2</sub>, а активацијом PLCγ-IP3/Ca<sup>2+</sup>-calcineurin–NFAT сигналног пута подстиче повећану експресију СОХ-2 (100), (101).

#### 1.4.2. Механизми и медијатори неолимфангиогенезе

Лимфни судови могу да представљају један од најважнијих путева за дисеминацију метастатских ћелија. Штавише, очекује се да туморске ћелије много лакше улазе у лимфне него у крвне судове што је условљено њиховим структурним разликама. Тако, дисконтинуирана и/или потпуно одсутна базална мембрана, као и одсуство перицита (потпорних ћелија) доприноси већој пропустљивости лимфних у поређењу са крвним судовима (102). Стога, спекулише се да формирање нових лимфних судова процесом лимфангиогенезе и/или 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 као у примарном тумору тако и у сентинелним (стражарским) лимфним чворовима, фаворизују улазак метастатских 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 је централни догађај у лимфангиогенези. Сматра се да VEGF-C–VEGF-R3 и VEGF-D–VEGF-R3 сигнални пут је главни покретач 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 Akt сигналног пута што резултује пролиферацијом, преживљавањем и миграцијом ендотелних ћелија лимфних судова (105), (106). Додатно, NRP-2 (енгл. *neuropilin- 2*), корецептор VEGF-R3, модулише све поменуте сигналне путеве у ендотелним ћелијама покренуте пролимафангиогеним факторима: VEGF-C и VEGF-D (107), (108).

Добро се зна 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 затим 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 околној строми. Сем туморских ћелија, ове факторе раста лимфних судова секретују и канцер-асоцирани фибробласти, 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 дренајућим лимфним чворовима, позитивно корелира се лимфогеним метастазирањем тумора. Интересантно је и запажање да експанзија лимфних судова у сентинелним лимфним чворовима започиње пре него што метастатске ћелије стигну на ово место. Претпоставља се да се VEGF-C из примарне туморске лезија дрена у лимфне чворове где иницира лимфангиогенезу, а када стигну и метастатске 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 метастатских ћелија у лимфне судове (104). Показано је и да VEGF-C повећава пропустљивост лимфних судова што додатно фацилитира интравасацију и лимфогену дисеминацију метастатских 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).

Стога може се закључити да лимфангиогенеза индукована тумором може да промовише дисеминацију туморских ћелија јер са порастом броја новостворених лимфних судова повећава се и вероватноћа уласка метастатских ћелија у лимфни систем. За улазак у лимфни систем, метастатске ћелије користе исти образац миграције као и активирани дендритске ћелије и наивни Т лимфоцит. 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 на ендотелу лимфних судова, као 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 ћелија меланома која експримира CCR7 стиче способност хемотаксе у правцу CCL21 *in vitro*, као и *in vivo* и то у правцу ендотелних ћелија лимфних судова које секретују CCL21 (116), (117). Тако на пример, повећана експресија CCR7 у В16 варијанти мишијег меланома промовише њихово метастазирање у дренајући лимфни чвор (118).

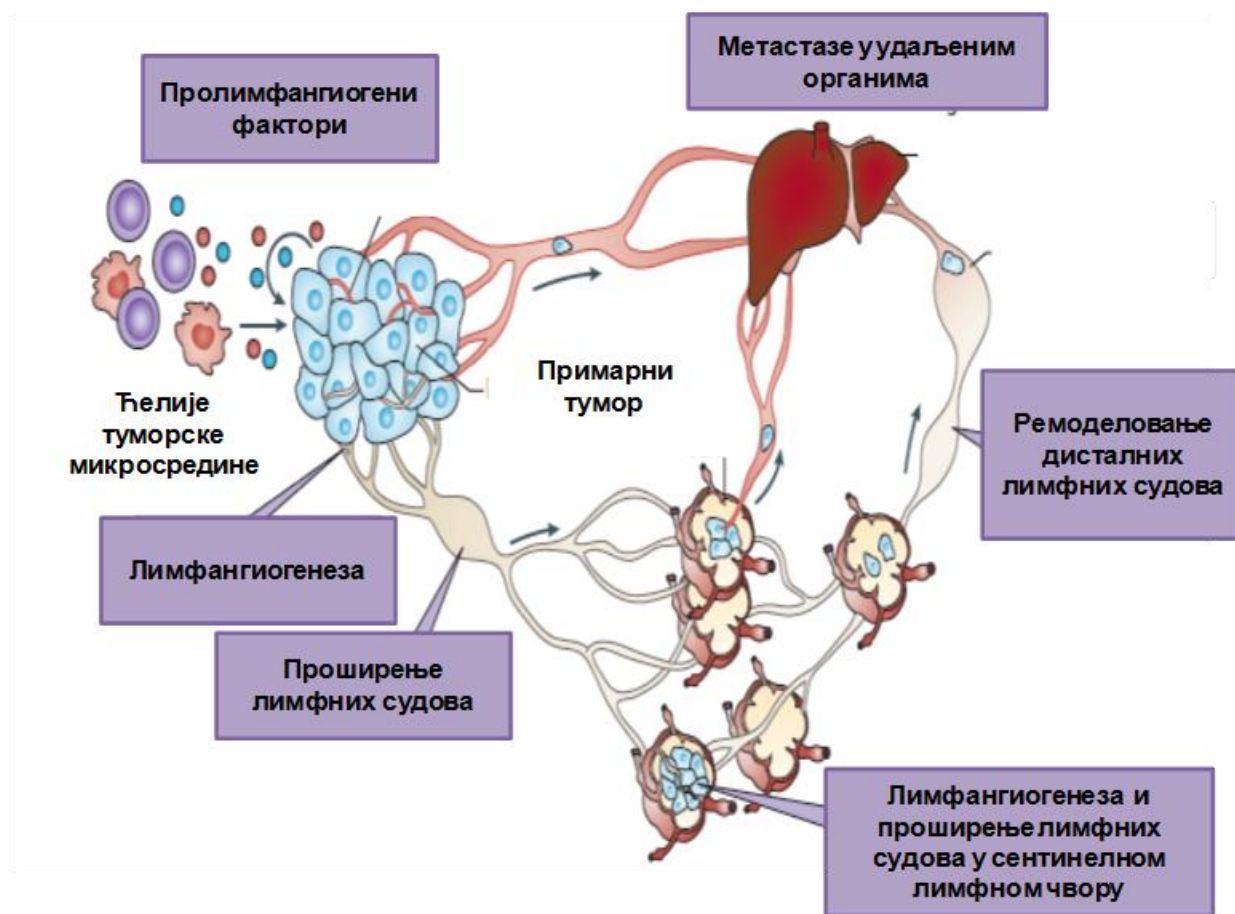


Схема 3. Промене у тумор-асоцираним лимфним судовима које олакшавају лимфогено метастазирање тумора (кориговано према: *Stacker SA, et al. Nat Rev Cancer 2014;14(3):159-72.*)

Подаци из нама доступне литературе сугеришу на то да су простагландини укључени у нелимфангиогенезу тако што модулишу експресију VEGF-C. Туморске и имунске ћелије који 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. Тако услед пролонгираног излагања повећаној концентрацији простагландина, регулисано VEGF-D, јавља се проширење постојећих лимфних судова што све заједно утиче на пораст степена дисеминације метастатских 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 дијагностику и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и у Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије у Београду у периоду од 2009 до 2013. године 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 и лобектомије са или без учињене регионалне лимфаденоктомије. Оперативни материјал је након детаљног макроскопског описа обрађиван стандардном патохистолошком процедуром на 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 Америчког удруженог комитета за рак и Интернационалне уније против рака AJCC/UICC (енгл. *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 дијагнозе, микроскопски прегледом 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 екстратиرويدна инвазија и дезмоплазија.

Смерница Јапанске институтске болнице за малигне болести (енгл. *The Cancer Institute Hospital of JRC, CIH*) разликује две групе ризика. Тако, 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 екстратиرويدна 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 екстратиرويدна 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 развијен на терену Хашимотовог тиреодитиса.

### **3.2. Истраживачки поступак**

За патохистопатолошку 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 стављени 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, онда 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 1 минут. Након бојења уследила је дехидратација исечака како би се у њима 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 ледено хладном ацетону 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 је 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 одговарајућа зечја поликлонска антитела која су одговарајућем разблажењу растворена у PBS-у са 1% BSA (Табела 1).

Антитело	Порекло и врста	Произвођач	Каталошки 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 коришених 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* (каталошки број ab64259; *Abcam*) и *Rabbit specific HRP-AEC Detection IHC Kit* (каталошки број ab94361; *Abcam*) у зависности од порекла примарног антитела.

За детекцију антигена које засновано на примени моноклонских мишјих антитела, исечци ткива су инкубирани са одговарајућим секундарним антителима на собној температури и у влажној комори. Након инкубације, препарати су опрани у PBS а онда је ткивне исечке апликована *Streptavidin Peroxidase*-а. По истеку инкубације од 30 минута, уследило је троструко испирање а затим је на ткивне исечке нанет DAB 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 лџуспицом.

За детекцију антигена засновано на примени зечјих поликлонских антитела коришћен је *Rabbit specific HRP-AEC Detection IHC Kit*. Наиме, 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 лъуспицом.

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 мултинодозне 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  $\leq 10\%$  ћелија.

**Квантификација густине крвних и лимфних судова у ткиву штитасте жлезде и мултинодозне струме.** Микроваскуларна густина 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

дефинисани као крвни судови. Коришћењем микроскопских увећања од 40 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 дефинисани су као лимфни судови. Слично као и приликом одређивања густине крвних судова, најпре су селектована три "врућа поља" на микроскопском увећању 40 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 IBM 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 оболелих укључених у ову студију, била стара 50 и више година.

На основу класификације Светске здравствене организације WHO ( енгл. World Helth 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*, РСМ) је дефинисан као карцином величине  $\leq 1$  cm (130).

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

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 због чега личе на миофибробласте, као и 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 фактор ризика (131), (123).

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

Параметар	Испитаници		
	N=73	%	
Ризик <sup>a</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
	<i>Умерена</i>	20	27.4
	<i>Наглашена</i>	18	24.6

<sup>a</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).

Запажа се 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. С обзиром да испитаници нису имали удаљене хематогене метастазе нити метастатске лимфне жлезде једнаке и веће од 3 cm, групу високог ризика чинили су

пацијенти од 50 година и више код којих је регистрована локална екстратиرويدна инвазија, док су испитаници млађи од 50 година са/или без локалне екстратиرويدне 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 екстратиرويدном инвазијом у поређењу са пацијентима код којих није регистрована локална екстратиرويدна инвазија РТС ( $p < 0.05$ ; Графикон 1Б).

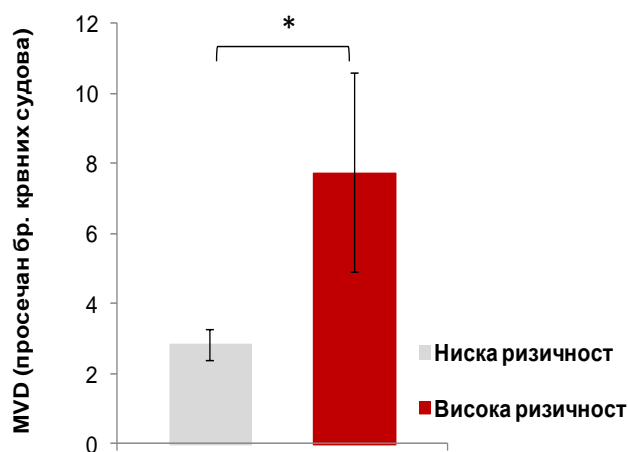
Параметар	N	MVD	
		Просечан бр. крвних судова $\pm$ SD	
Степен ризика	<i>Низак</i>	65	2.84 $\pm$ 3.56
	<i>Висок</i>	8	7.75 $\pm$ 7.52
Инвазија крвних судова	<i>Одсутна</i>	61	3.03 $\pm$ 4.35
	<i>Присутна</i>	12	5.08 $\pm$ 3.57
Локална екстратиرويدна инвазија	<i>Одсутна</i>	64	2.88 $\pm$ 3.60
	<i>Присутна</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

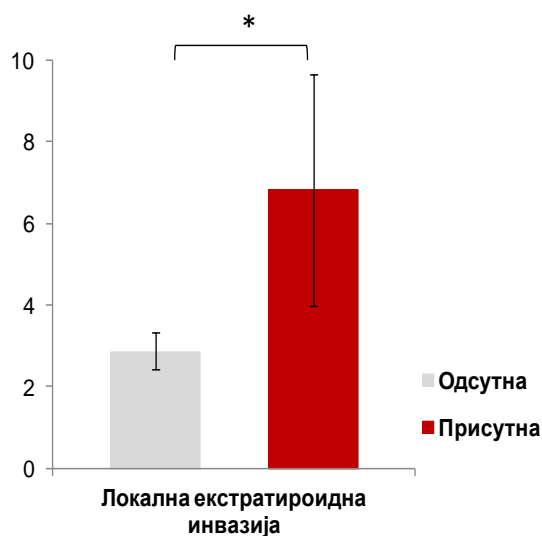
**Табела 3.** Густина крвних судова у зависности од клиничких и патолошких карактеристика карцинома.

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).

A)

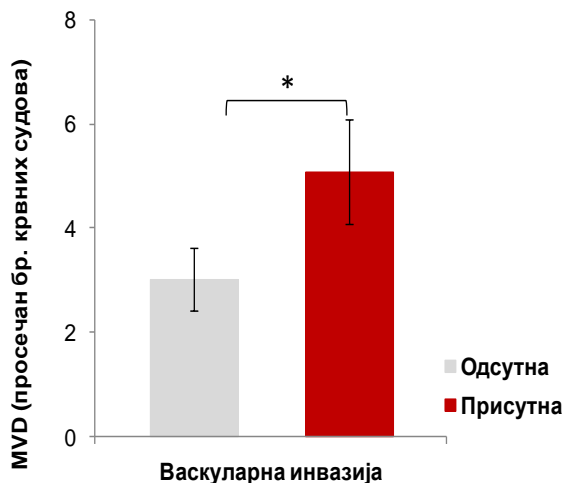


Б)

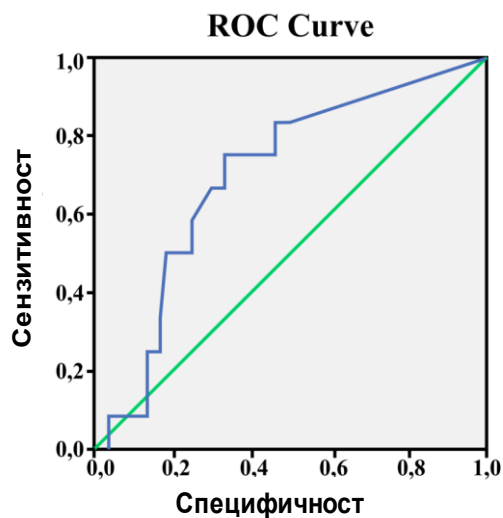


**Графикон 1. MVD као фактор повећаног ризика за локално ширење и потенцијалну прогресију карцинома.** А) Повећана микроваскуларна густина забележена је код оболелих од РТС са високим ризиком (*Student's t* тест,  $p=0.037$ ); Б) Истовремено, микроваскуларна густина је статистички значајно већа у групи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

A)



Б)

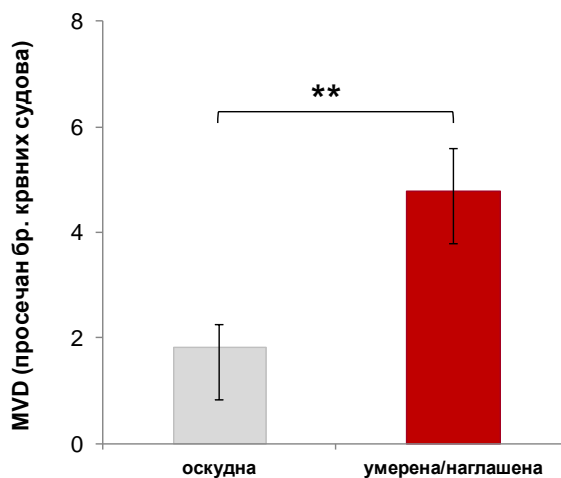


**Графикон 2. Веза MVD са васкуларном инвазијом РТС.** А) Микроваскуларна густина је статистички значајно већа у карциномима код којих је регистрована инвазија туморских ћелија у крвне судове у

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).

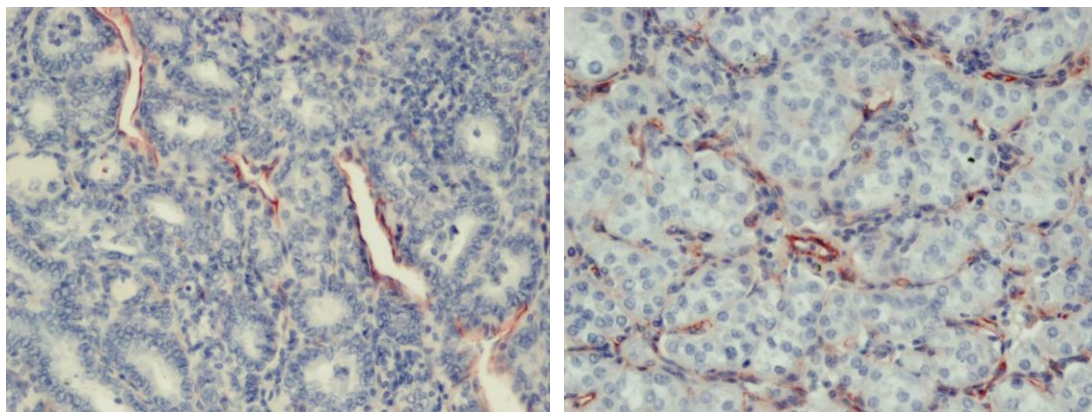
**А)**



**Б)**

Дезмопластична реакција

CD-31 -позитивни крвни судови



**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*”). На доњем панелу приказани су РТС са већом (лево) и мањом (десно) MVD (оригинално увећање 200x).

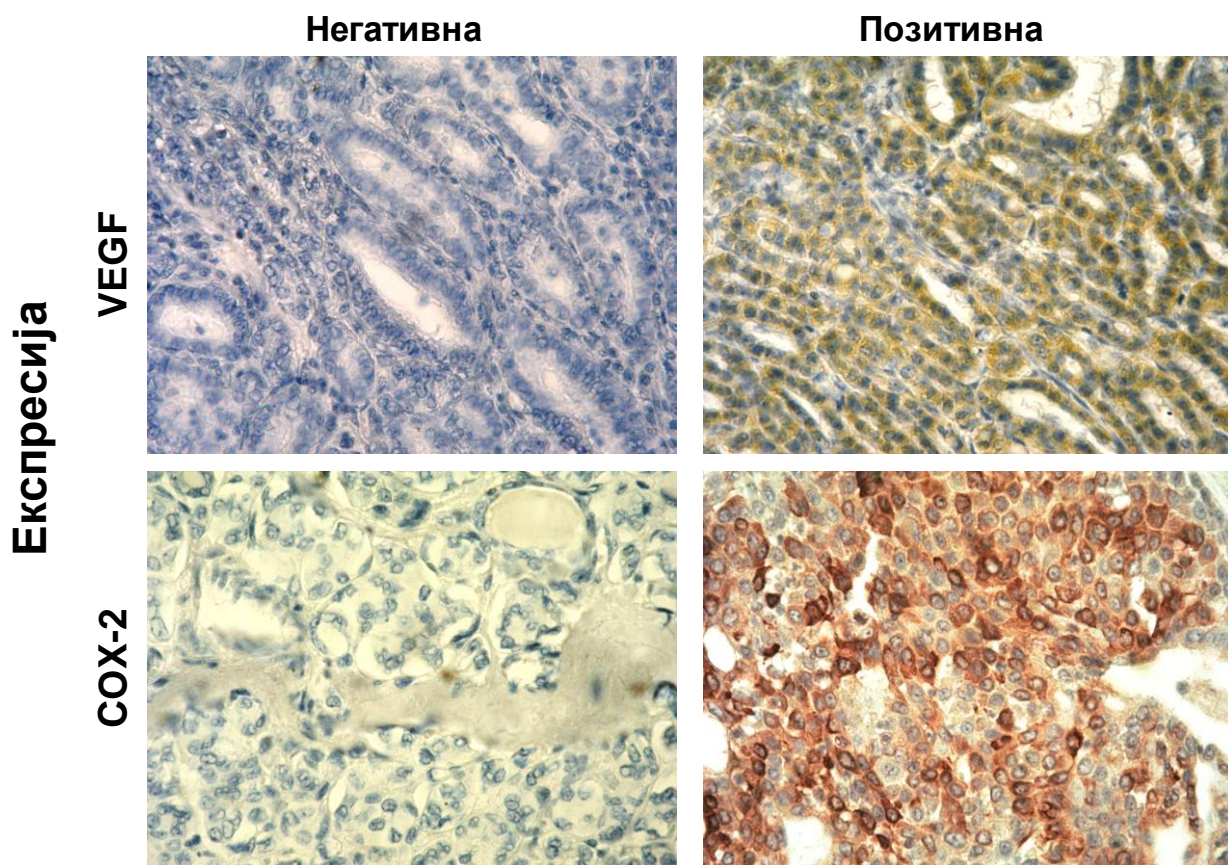
На основу налаза повећане MVD у групи испитаника са високим ризиком, као и у групи РТС са васкуларном и локалном екстратироидном инвазијом, очигледно је да локално ширење, а потенцијално и прогресија папиларног карцинома штитасте жлезде зависе од процеса ангиогенезе.

#### **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 Слици 1. Није забележена статистички значајна разлика у експресији ових проангиогених фактора између туморске микросредине и њене околине (податак није приказан).

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 интерквртила 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).

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. Репрезентативни пресеци туморског ткива са мањом (леви панел) и већом (десни панел) густином крвних судова приказани су на Графикону 3Б.



**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)



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

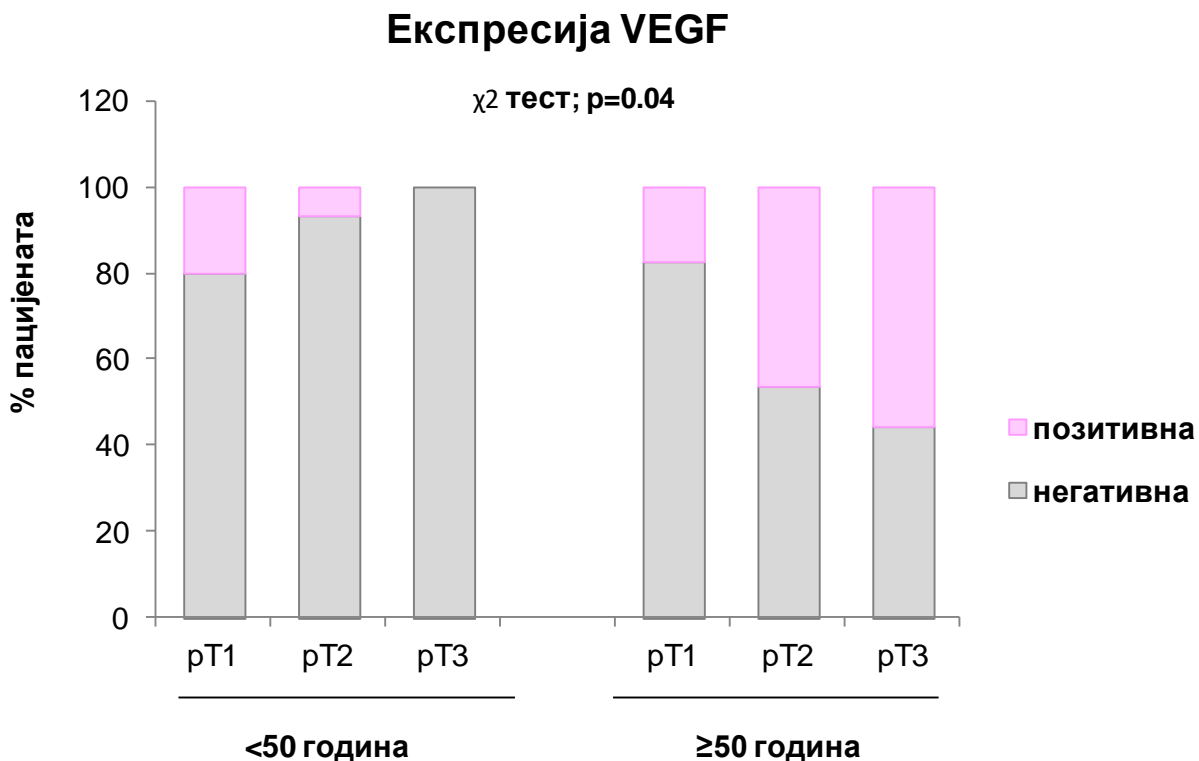
Табела 4. Однос MVD и експресије VEGF и COX-2

Анализирана је и повезаност експресије VEGF и COX-2 истовремено како са старосном доби пацијената према претходно поменутиим смерницама, 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.

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

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

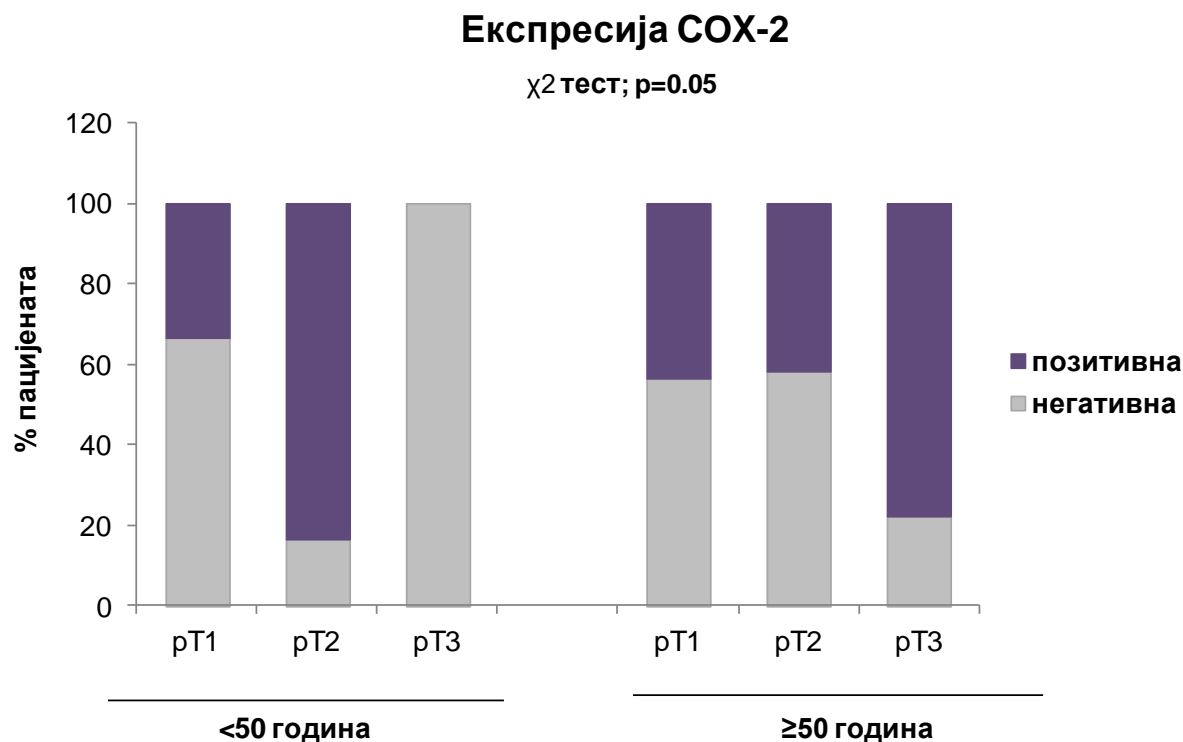
Табела 5. Дистрибуција испитаника у зависности од величине тумора и година старости



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  $\geq 50$  година код којих пречник тумора већи од 2 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).



**Графикон 5. Експресија COX-2 у зависности од старосне доби испитаника и величине карцинома штитасте жлезде.** На основу семиквантитативног скор система базираног на проценту обојених туморских ћелија, сви pTc су сврстани у групу са позитивном експресијом COX-2 ( $>10\%$  позитивних ћелија) и у групу са негативном експресијом COX-2 ( $\leq 10\%$  позитивних ћелија). Постоји статистички значајна повезаност експресије COX-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 COX-2 са осталим клиничким и патолошким карактеристикама папиларног карцинома штитасте жлезде (Табела 6).

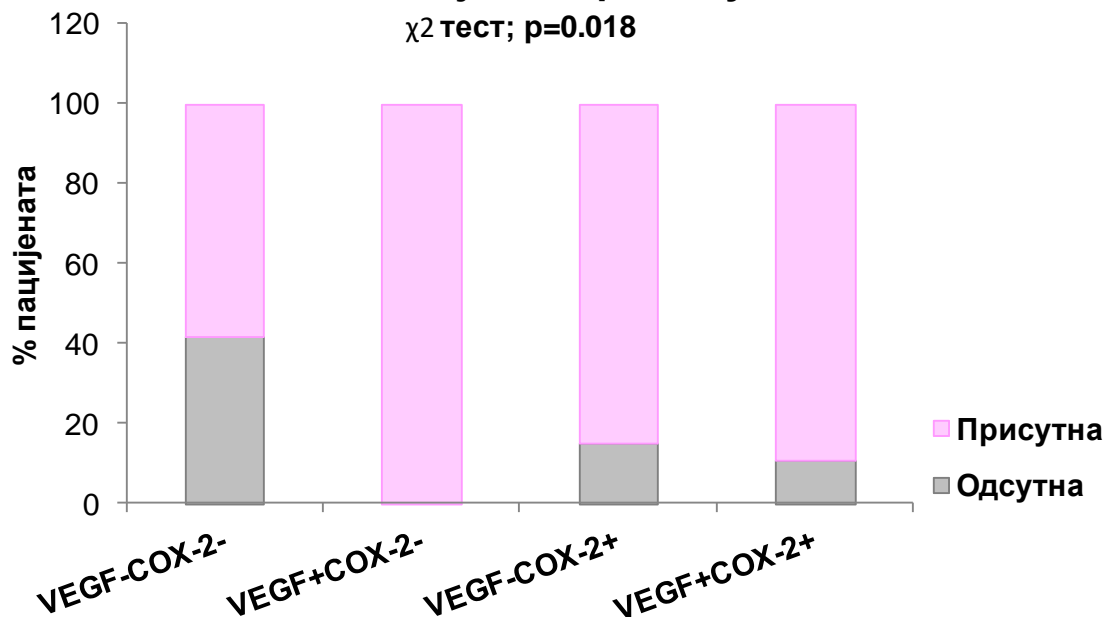
Параметар		Експресија VEGF (*N=71)		Експресија COX-2 (*N=69)		P- вредност
		Негативна	Позитивна	Негативна	Позитивна	
Ризичност	<i>Ниска</i>	49	14	31	31	$p>0.05$
	<i>Висока</i>	3	5	2	5	
Инвазија лимфних судова	<i>Одсутна</i>	14	1	11	5	$p>0.05$
	<i>Присутна</i>	38	17	22	31	
Инвазија крвних судова	<i>Одсутна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

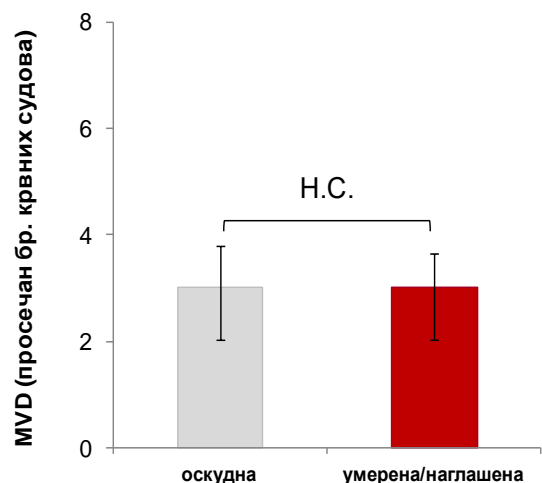
## Инвазија лимфних судова



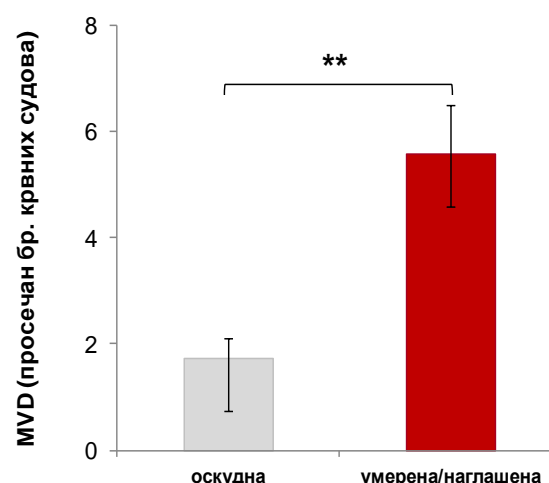
**Графикон 6. Повезаност експресије VEGF и COX-2 са инвазивношћу туморских ћелија у лимфне судове.** Према унапред утврђеним критеријумима верификована је експресија VEGF и COX-2. Затим су на основу истовремено позитивне или негативне експресије VEGF и COX-2 испитаници сврстани у следеће групе: VEGF<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- и интра-туморском леукоцитном инфилтрацијом. Није уочена статистички значајна разлика у MVD између групе РТС са оскудном и групе са умереном и наглашеном инфилтацијом 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).

**A)**

**Перитуморска инфилтрација леукоцита**

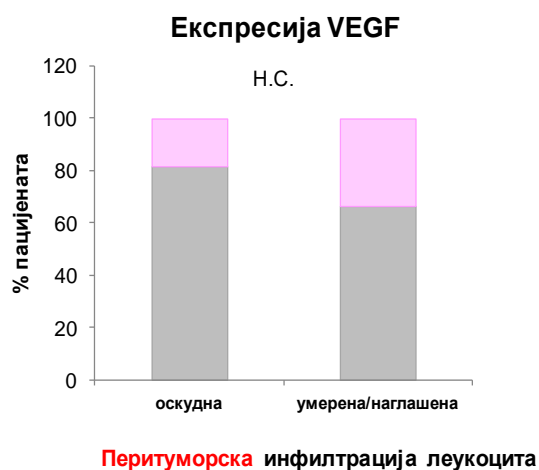
**Б)**

**Интратуморска инфилтрација леукоцита**

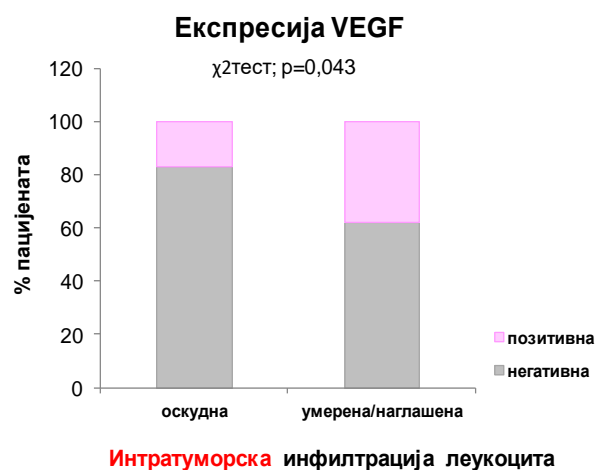
**Графикон 7. Однос MVD и перитуморске и интратуморске инфилтрације леукоцита.** Према унапред утврђеним критеријумима одређена је MVD. На основу интензитета леукоцитног инфилтрата у туморској микросредини и у њеној околини, РТС су сврстани у групу са оскудном и са умереном/наглашеном инфилтрацијом леукоцита; **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)

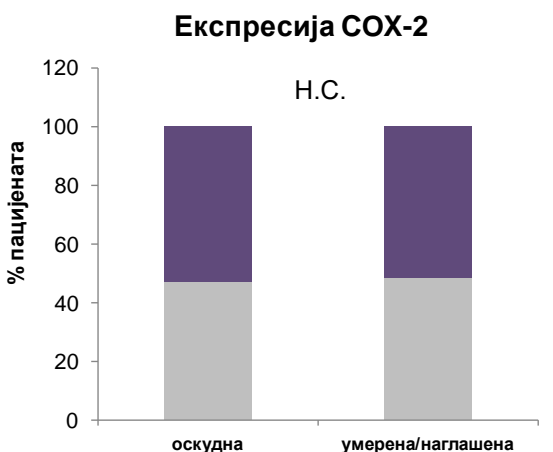


**Графикон 8. Процена експресије VEGF у односу на перитуморску и интратуморску инфилтрацију леукоцита.** Према унапред утврђеним критеријумима квантификована је експресија VEGF. На основу интензитета леукоцитног инфилтрата у туморској микросредини и у њеној околини, РТС су сврстани у групу са оскудном 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.

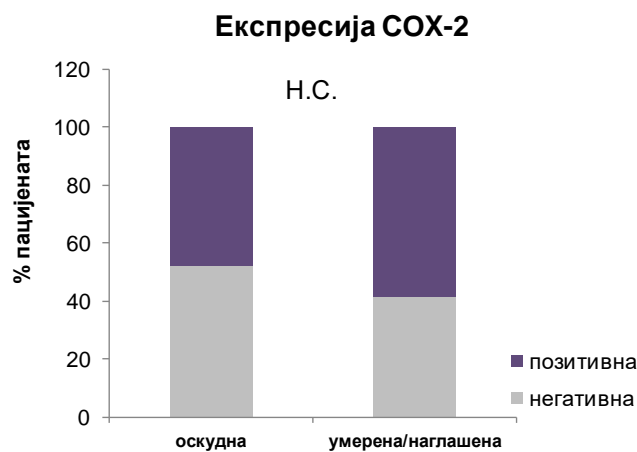
Процентуална заступљеност експресије COX-2 била је слична и у групи РТС са оскудном и у групи са умереном или наглашеном инфилтрацијом леукоцита, како у околини тако и у туморском ткиву, што се види на Графикону 9.

**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 и на основу клиничких и патхистолошких параметара, а то су степен ризика, лимфна и



локална екстратироидна инвазија тумора, мултифокалност и дезмопластична реакција (Табела 7).

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 3. 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 3).

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

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 екстратироидна 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

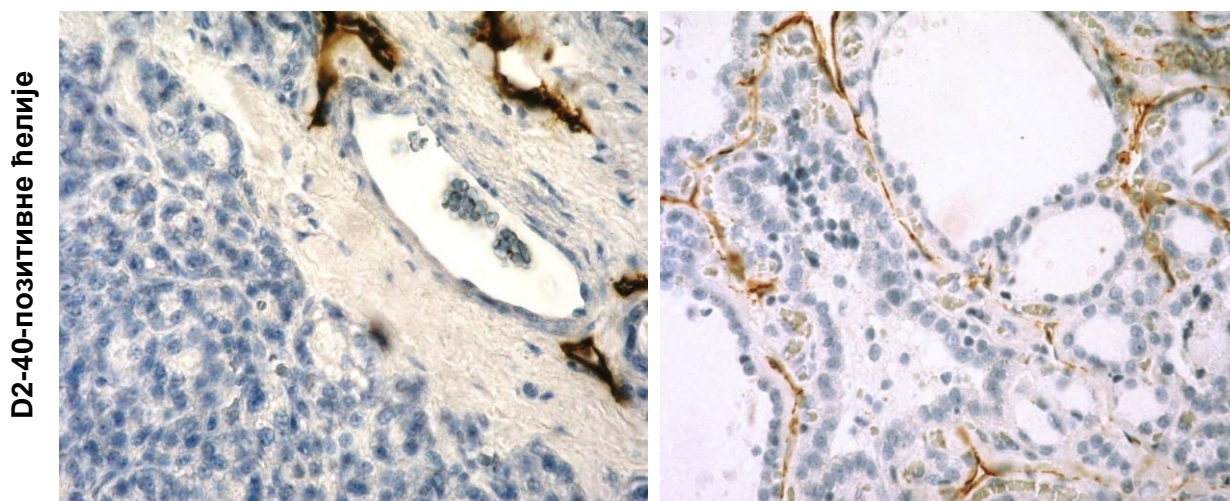
**Табела 7.** Густина лимфних судова у зависности од клиничких и патолошких карактеристика РТС.

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.

## LVD



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 (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 ( $\leq 10\%$  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).

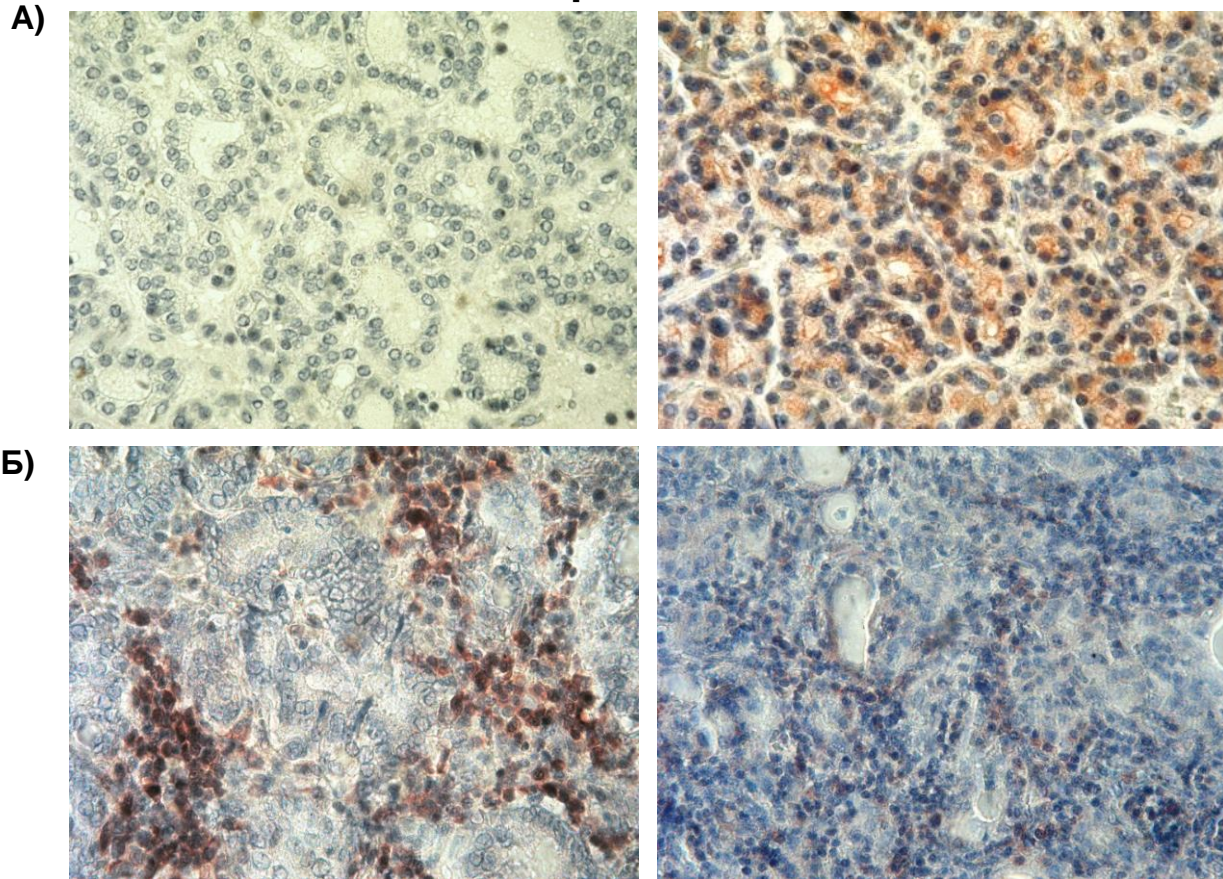
Параметар	Експресија p27 (*N=72 испитаника)		P-вредност
	Негативна	Позитивна	
Ризичност	Ниска	50	$p > 0.05$
	Висока	6	
Инвазија лимфних судова	Одсутна	12	$p > 0.05$
	Присутна	44	
Локална екстратироидна инвазија	Одсутна	48	$p > 0.05$
	Присутна	8	
Мултифокалност	Одсутна	23	$p > 0.05$
	Присутна	33	
Дезмопластична реакција	Оскудна	26	$p > 0.05$
	Умерена	16	
	Наглашена	14	

\*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 једру ћелија туморске строме, док је у туморским ћелијама изражена цитоплазматска експресија овог протеина (Слика 3Б).

## p27

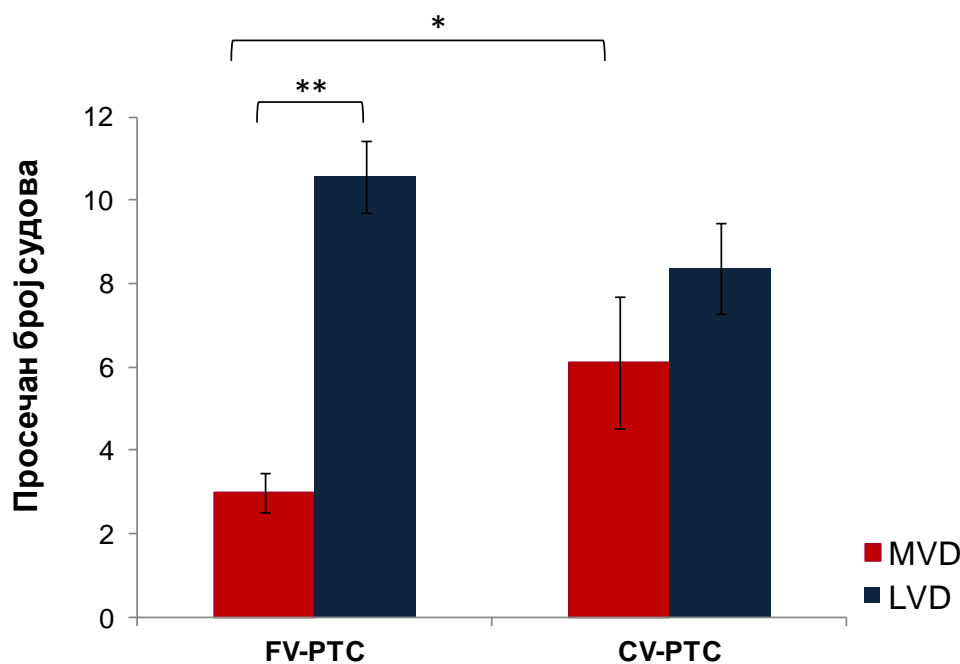


**Слика 3. Имунохистохемијска анализа експресије p27 у папиларном карциному штитасте жлезде. А)** На левом панелу слике представљен је папиларни карцином штитасте жлезде са негативном, а на десном панелу са позитивном експресијом p27; **Б)** Уочава се да је p27 доминатно еспримиран у једру ћелија туморске строме (лево), док је у туморским ћелијама израженија цитоплазматска експресија p27 (десно) (увећање 200x)

С обзиром 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 PTC (енгл. *follicular variant of papillary thyroid carcinoma*, FV-PTC) вредност LVD ( $10.55 \pm 0.86$ ) била је значајно већа у односу на вредност MVD ( $2.99 \pm 0.48$ ), што није био случај код класичне варијанте овог карцинома (енгл. *classical variants of papillary thyroid carcinoma*, CV-PTC). Ако се пореди густина крвних судова у ове две фоликуларне варијанте карцинома, уочава се да је MVD у FV-PTC статистички значајно нижа него код CV-PTC, што се види на Графикону 10.



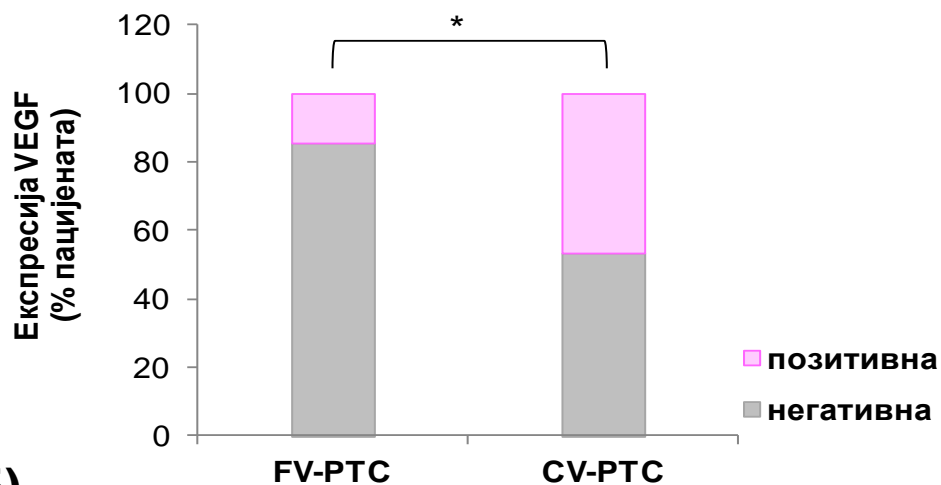
**Графикон 10. Густина лимфних и крвних судова у хистолошким варијантама папиларног карцинома штитасте жлезде (FV-PTC и CV-PTC).** За визуелизацију ендотелних ћелија лимфних и крвних судова коришћени су маркери D2-40 и CD31. Према унапред утврђеним критеријумима одређени су LVD и MVD. У FV-PTC LVD је значајно већа у поређењу са MVD (\*\*  $p=0.000$ ), али не и у CV-PTC. Додатно, MVD у FV-PTC је статистички значајно нижа у односу на CV-PTC (\*  $p=0.014$ ). 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 да је густина лимфних судова значајно већа у односу на микроваскуларну густину може се закључити и да лимфангиогенеза доминира у фоликуларној варијанти папиларног карцинома. Повећана густина крвних судова у класичној у односу на фоликуларну варијанту папиларног карцинома сугерише и да квантификација степена ангиогенезе може послужити као метод за разликовање ове две хистолошке варијанте.

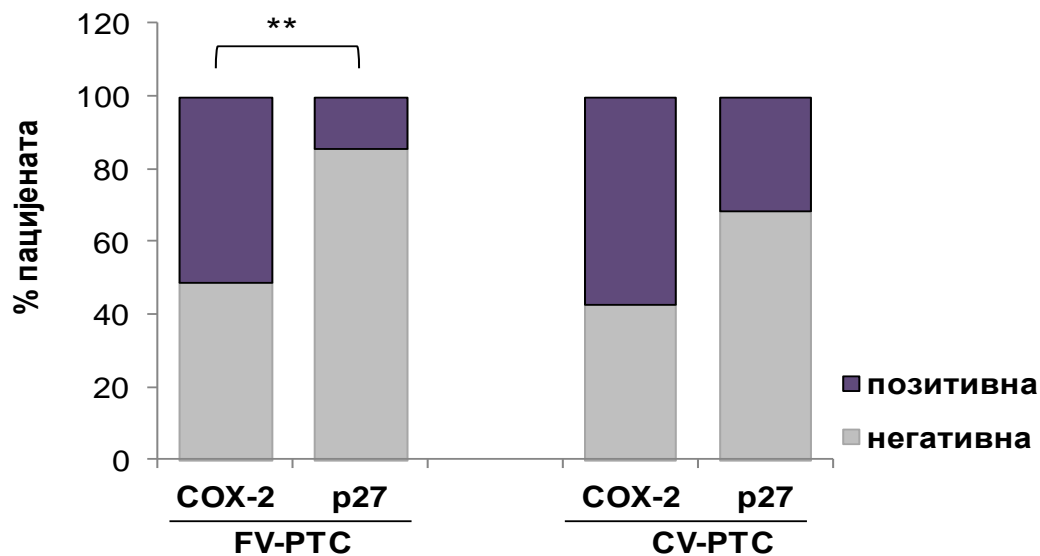
Даља анализа експресије VEGF, COX-2 и p27 у FV-PTC и CV-PTC, указала је да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF статистички значајно већа у CV-PTC (46.67%) у односу FV-PTC (14.29%) што је приказано на Графикону 11А. Овакав налаз упућује да је пораст густине крвних судова у CV-PTC вероватно 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 констатовати 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.

**А)**



**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 нетуморској и туморској лезији штитасте жлезде, у студију је укључено и 11 пацијената са мултинодозном струмом. Мултинодозна 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, процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је мања у групи пацијената са MNG у односу на групу оболелих од РТС, при чему ова разлика не досеже ниво статистичке значајности што је вероватно последица ограниченог броја испитаника са MNG (леви панел Графикана 12Б),

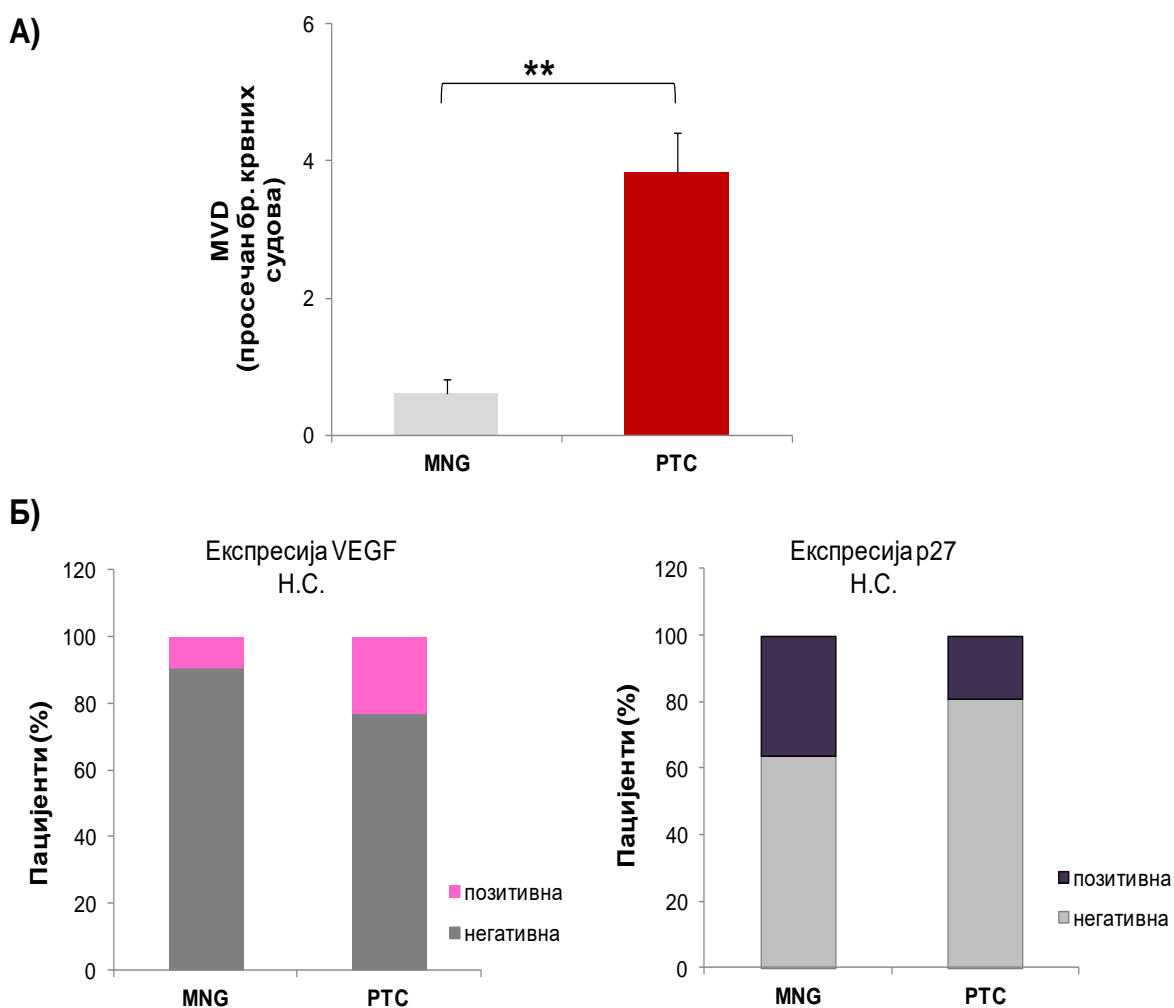
Очекивано, фреквенца позитивне експресије p27 је била већа међу испитаницима са MNG него код оболелих од РТС, мада није забележена статистички значајна разлика између испитиваних група, што је приказано на десном панелу Графикана 12Б.

Међутим, експресија COX-2, као и D2-40, маркера ендотела лимфних судова, 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.

Додатно, када је упоређена густина крвних судова између MNG и две хистолошке варијанте карцинома, CV-РТС и FV-РТС, забележена је значајно нижа MVD у лезијама

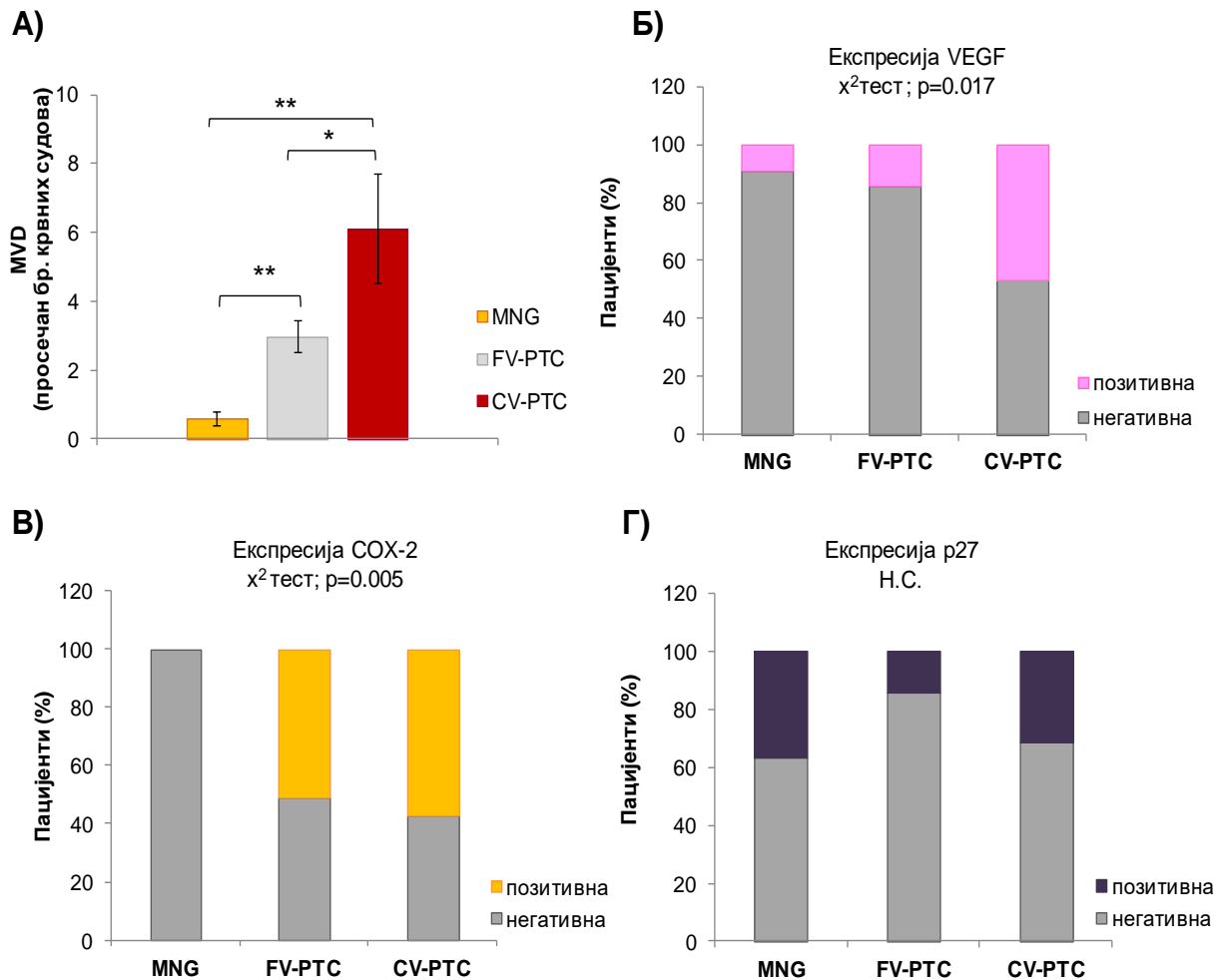


MNG у односу на лезије обе хистолошке варијанте РТС, а нарочито у односу на CV-РТС (Графикон 13А). У наставку анализе експресије VEGF, COX-2 и p27 у циљаним ткивима, уочено је да је процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF био значајно нижа у групи оболелих од MNG (9.1%) него у групи FV-РТС (14.29%), а нарочито у односу на групу са CV-РТС (46.67%) (Графикон 13Б). Експресија COX-2 није детектована код пацијената са MNG, док је позитивна експресија овог протеина регистрована у око половине испитаника са CV-РТС и FV-РТС (Графикон 13В). Није забележена значајна разлика у фреквенци позитивне експресије p27 између свих 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. Н.С.- 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, ово преживљавање се значајно редукује (3). Упркос бројним сазнањима о РТС клинички ток и исход хистолошки различитих варијанти РТС су комплексни и разнолики. Тако, молекулски профил који детерминише потенцијално агресивнији фенотип класичне и фоликуларне варијанте РТС није још увек у потпуности разјашњен.

Ангиогенеза и лимфангиогенеза су фундаментални процеси у прогресији тумора и представљају важну карактеристику туморске микросредине (138). Док ангиогенеза промовише раст тумора и хематогено метастазирање (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 њену 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). У почетним истраживања прогностичког значаја туморске ангиогенезе, као и повезаности густине крвних судова са метастатским потенцијалом, MVD (*енгл. microvessel density*) је издвојена 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 да се испита веза између MVD и клиничких и патохистолошких параметара удружених са прогнозом болести, међутим, добијени резултати су контроверзни. Тако на пример, у недиферентованом карциному штитасте жлезде забележен је мали број крвних судова, док је у медуларном карциному регистрована повећана MVD и стога 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 метастатских ћелија у удаљене органе. Стога васкуларна инвазија се углавном издваја као важан прогностички фактор у карциному дојке (149), (150), или се пак повезује са слабијом диференцијацијом и узнаткованим 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, а нарочито у папиларном карциному (152). Важан знак локалне инвазије

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

У актуелној студији, повећана MVD, као индикатор појачане ангиогенезе, је регистрована у групи испитаника високе ризичности (Графикон 1А). Јасно је уочен и пораст MVD у папиларним карциномима са присутном локалном екстратироидном 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 (дезмолазија) 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, показано је да је дезмопластична реакција повезана са повећаном инциденцом метастаза у лимфним жлездама (159). Подаци из литературе су оскудни за папиларни карцином и своде се свега на пар студија. Тако на пример, у папиларном микрокарциному, дезмопластична реакција је значајно повезана са васкуларном инвазијом, перитуморском инфилтрацијом, пречником тумора и са метастазама у лимфним жлездама. Уз то, примећено је да је дезмопластична реакција присутна у свим микрокарциномима у рТ3 стадијуму, као у групи са детектованом перитироидном инфилтрацијом (160). *Mai* и сарадници (161) су анализирали такозване "инфилтришуће" РТСs дефинисане на основу склерозне строме и показали су да се овакав тип карцинома одликује већим метастатским потенцијалом.

Добро је познато да је хипоксија, карактеристична за брзо растуће туморе, важан стимулус за продукцију VEGF у туморским ћелијама, као и у CAFs који су главне компонента дезмопластичне строме тумора (162). Стога 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 карциному штитасте жлезде где није забележена веза између MVD и интензитета дезмопластичне стромалне реакције (159). Налаз ове студије сугерише на могућност 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 добијених резултата 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. Стога 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 недовољно расветљени и разнолики. Иако је у карциному штитасте жлезде регистрована повећана експресија VEGF на нивоу протеина, међутим, није утврђена веза између експресије овог проангиогентског протеина и лоше прогнозе оболелих, односно између величине тумора, мултифокалности и/или присутних метастаза у локалним 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 мањим туморима регистровано је повећање експресије VEGF само на нивоу mRNA, док је код оболелих у узнатредованом стадијуму РТС присутна и повећана експресија 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). Наиме, показана је позитивна корелација између експресије VEGF и COX-2 у карциному штитасте жлезде што 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 оболелих од РТС са повећаном експресијом VEGF и COX-2 у узнатредованом 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, а 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.

Обзиром на 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

тога што су већина испитаника укључених у ову студију били углавном у pT1 и pT2 стадијуму. Међутим, у туморском ткиву већине пацијената у pT3 стадијуму забележена је позитивна експресија VEGF што упућује на закључак да хипоксична и кисела микросредина, карактеристичне за тумор у узнапредованом pT 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 имunosупресивну 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, антиапоптотске, проангиогене и пролимфангиогене факторе. На тај начин тумор, имунски систем као свог непријатеља, преусмерава у саучесника кога затим користи за напредовање, односно за сопствени развој и прогресију (171).

У диферентованом карциному штитасте жлезде, имунски одговор против туморских ћелија 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 у карциному штитасте жлезде који је 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. Тако, 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 узнапредованом стадијуму, као и са



већим лимфним 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 корелира са густином тумор-асоцираних макрофага у карциному дојке (180). Познато је да тумор-асоцирани макрофаги заузимају важно место у узнатреном 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 густину што је вероватно последица 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. Тако на пример, показано је да промовише пролиферацију малигно трансформисаних ћелија (184), инхибира апоптозу, омета ефикасност антитуморске терапије (186), (187) и промовише ангиогенезу на терену инфламације (188). На крају, сматра се да је укључен и у формирању метастаза и то тако што штити метастатске ћелије од посебног облика апоптозе, односно аноикиса, 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 COX-2 у карциному штитасте жлезде. У папиларном карциному забележена је повишена експресија COX-2 у односу на фоликуларни карцином и аденом штитасте жлезде, међутим, истовремено је примећена и смањена експресија овог ензима код оболелих старије животне доби и у узнаткованом стадијуму болести, као и са већим пречником и мултифокалошћу РТС (191). Ови резултати упућују да COX-2 игра много важнију улогу у раним фазама прогресије карцинома, укључујући карциногенезу, него у узнаткованом стадијуму РТС (191). Супротно томе, друга студија описује повећану експресију 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 COX-2 са старосном доби и величином тумора код оболелих од РТС. Наиме, забележена је повећана фреквенца позитивне експресије COX-2 међу испитаницима са 50 и више година старости са пречником тумора већим од 4 cm (у рТ3 стадијуму) (Графикон 5). Механизам којим COX-2 промовише раст тумора још увек није потпуно расветљен. Претпоставља се да COX-2 подстиче раст тумора тако што индукује продукцију биоактивних простагландина којима активира сигналне путеве укључене у контролу ћелијске пролиферације и апоптозе у туморским ћелијама (93). Додатно, резултати неких истраживања импликују да COX-2, посредством простагландина, игра важну улогу у формирању крвних судова на месту инфламације (192). Међутим, у овој студији није регистрована значајна повезаност експресије COX-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 COX-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 метастатских ћелија у регионалне лимфне жлезде одакле могу доспети и у удаљене органе (194) (195). Клинички значај и регулација лимфангиогенезе у различитим врстама тумора још увек нису довољно расветљени. Разлог томе је то што је дискриминација лимфних од крвних судова била отежана дуги низ година услед недостатка специфичног маркера за ендотел лимфних судова (196). До данас, идентификовано је неколико маркера који се користе за детекцију ендотелних ћелија лимфних судова, а то су 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 О-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 лимфне инвазије у разним врстама тумора, укључујући папиларни карцином штитасте жлезде (198), (199) (200).

Подаци из нама доступне литературе импликују да повећана густина лимфних судова је разлог агресивнијег фенотипа тумора (102), (201) где метастатске ћелије које су се одвијиле од примарног тумора првенствено улазе у лимфну циркулацију 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, новоформирани лимфни судови у тумору истовремено представљају 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 лимфне и локалне екстратиرويدне инвазије тумора, 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. Тако на пример, 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, интратуморска LVD је предиктор лифогеног метастазирања у удаљене органе код сквамозног карцинома главе и врата, једњака и усне дупље (207), (208), (209).

Резултати малобројних истраживања који 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 лимфних метастаза, као ни са другим клиничким и патохистолошким карактеристикама агресивности карцинома штитасте жлезде, импликује 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, у РТС је регистровано да интратуморска LVD позитивно корелира са мултифокалношћу тумора, као и са успостављањем метастаза 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). 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 пораст лимфне инвазије у тумору значајно повећава ризик за развој метастаза у регионалне лимфне жлезде, а одакле метастатске 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

б). 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 резултат је 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 (CDKs, *енгл. Cyclin-dependent kinases*) и на тај функционише као негативни регулатор ћелијског циклуса који контролише прелазак из G0 у S фазу (133) (216). Зна се да терминално диферентоване епителне ћелије (епител плућа, дојке, простате, јајника...) повећано експримирају p27 у једру, док је за пролиферишуће ћелије (нпр. у криптама колоне) 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, а и у неинвазивним туморским лезијама, укључујући карцином 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 и локалним екстратироидним ширењем карцинома (220). Додатно, Do и сарадници (221) указују да редукована експресија p27 доприноси развоју папиларног карцинома, као и његовом агресивнијем потенцијалу. Наиме, документована 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 микропапиларном карциному штитасте жлезде сугеришу на могућност да је p27 индикатор агресивнијег потенцијала ове хистолошке варијанте папиларног карцинома (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 једру ћелија туморске строме, док је у туморским ћелијама изражена цитоплазматска експресија овог протеина (Слика 2Б). 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 малигне ћелије 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 парадоксну “*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, постоје претпоставке да у ендокриној пракси могу послужити и за дефинитивну диференцију. Тако, резултати *Wolinskog* и сарадника (226) сугеришу да процена експресије VEGF-C на нову mRNA има већи значај у односу на VEGF-A због чега се сматра да је кориснији маркер у диференцијацији бенигних од малигнух лезија у штитастој жлезди. Показано је да је експресија VEGF-C статистички значајно већа у диферентованом карциному у поређењу са бенигним туморима штитасте жлезде, при чему није забележена значајна

разлика у експресији VEGF-A на новоу mRNA (226). Противно налазу претходно наведене студије, у актуелном истраживању уочена је статистички значајно мања MVD у нетуморском (MNG) у поређењу са туморским ткивом (РТС) 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, процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је мања у групи пацијената са MNG у односу на групу оболелих од РТС, 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 РТС, 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 туморских и нетуморских лезија штитасте жлезде није регистрована, а разлози тога су следећи. Прво, већина укључених испитаника оболелих од РТС 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 РТС. Показано је да се FV-РТС и CV-РТС међусобно разликују не само у морфолошком и клиничком аспекту (30) (229), већ и у генетским алтерацијама (230), међутим, још увек није разветљено 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-РТС хистолошки је потврђен низак степен метастазирања у цервикалне лимфне жлезде, као и локалног екстратиреодног ширења тумора (30), (229). Резултати других студија који се баве овим двема хистолошки различитим варијантама папиларног карцинома су мање-више конфликтни. Неки аутори указују да FV-РТС

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 капацитет и да показује већу тенденцу метастазирања у плућа (39). Мултиваријантна анализа указује да иако FV-PTC карактерише већа учесталост васкуларне инвазије, она је повезана са повољнијим исходом 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. Овакав налаз упућује да сви папиларни карциноми код којих су детектоване мутације *ras* гена показују фоликуларни образац раста (230).

У до сада објављеној и нама доступној литератури, нема студија које се истовремено баве квантификацијом густине лимфних и крвних судова у FV-PTC и CV-PTC. У спроведом 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 новоу mRNA и протеина била већа у CV-PTC у односу на FV-PTC (166). 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. Међутим, противно налази новијег истраживања показују да је LVD је статистички значајно већа CV-PTC него у FV-PTC (232). Поређењем густине крвних судова између MNG и две хистолошке варијанте карцинома, CV-PTC и FV-PTC, забележена је значајно нижа MVD у лезијама MNG у односу на лезије 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 профилима. Обзиром да је густина лимфних судова 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. Стога, симултана анализа MVD и LVD у даљим истраживањима може да буде од помоћи у процени клиничког исхода различитих хистолошких варијанти PTC.

С обзиром на различит ангиогени и лимфангиогени профил у CV-PTC и FV-PTC намеће се питање, какав је значај експресије VEGF, COX-2 и p27 у ове две хистолошки различите варијанте папиларног карцинома?

Резултати ове студије по први пут показују да образац експресије испитиваних маркера варира у хистолошки различитим варијантама PTC. Тако, процентуална заступљеност позитивне експресије VEGF је статистички значајно већа у CV-PTC (46.67%) у односу FV-PTC (14.29%) (Графикон 11А) што импликује 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). Наиме, 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 претходно забележеним порастом густине лимфних судова у FV-PTC. Изгледа да ова инверзна експресија COX-2 и p27 утиче на пролиферацију ендотелних ћелија што вероватно 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 на могућност 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, као што су високоћелијски РТС и микрокарцином услед лимитираног броја испитаника. Да би се расветлио клинички значај интригантних налаза ове студије неопходне су додатна истраживања са већим бројем испитаника.

## 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 екстратиرويدном 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
8. густина крвних судова је значајно већа у класичној у односу на фоликуларну варијанту папиларног карцинома што је последица повећане експресије VEGF

## РЕФЕРЕНЦЕ:

### Bibliography

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; 85:1335-1339.
2. **Schneider DF, Chen H.** *New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer.* *CA Cancer J Clin.* 2013; 63(6):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):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; 16:437-444.
6. **Derwahl M, Nicula D.** *Estrogen and its role in thyroid cancer.* *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(5):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):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):40255-40258.
10. **Scopa CD.** *Histopathology of Thyroid Tumors. An Overview.* *Hormones.* 2004; 3(2):100-110.
11. **Smallridge RC, Copland JA.** *Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies.* *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; 22:486-497.
12. **O'Neill JP, Shaha AR.** *Anaplastic thyroid cancer.* *Oral Oncol.* 2013;49:702-706.
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):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;4:233–236.
16. **Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T.** *Follicular thyroid carcinoma.* *Modern Pathology.* 2011; 24: 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;437:107–115.
18. **Maximo V, Soares P, Sobrinho Simoes M.** *Mitochondria and cancer.* *Virchows Arch* 2009;454:481–495.
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. **Hemminiki K, Li X.** *Familial risk of cancer by site and histopathology.* *Int J Cancer.* 2003;103:105–109.
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; 23:1455-1464.
22. **Isaacs JD, Lundgren CI, Sidhu SB, Sywak MS, Edhouse PJ, Delbridge LW.** *The Delphian lymph node in thyroid cancer.* *Ann Surg.* 2008; 247:477–482.
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):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;19:707-716.
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; 135:272-277.
26. **Maxon HR, Smith HS.** *Radioiodine-131 in the diagnosis and treatment of metastatic well-differentiated thyroid cancer.* *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1990; 19:685-671.
27. **Lin JD, Chao TC, Chou SC, Hsueh C.** *Papillary thyroid carcinomas with lung metastases.* *Thyroid.* 2004; 14:1091-1096.
28. **Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E.** *Papillary thyroid carcinoma variants.* *Head Neck Pathol.* 2011; 5(1):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; 40:617-622.*
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; 30:752-758.*
31. **Hawk WA, Hazard JB.** *The many appearances of papillary carcinoma of the thyroid. Cleve Clin Q. 1976;43:207- 215.*
32. **Ghossein R, Livolsi VA.** *Papillary thyroid carcinoma tall cell variant. Thyroid 2008;18:1179-1181.*
33. **Hedinger C, Williams ED, Sobin LH.** *The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. Cancer. 1989; 63:908–911.*
34. **Ito Y, Miyauchi A.** *Atherapeutic strategy for incidentally detected papillarymicrocarcinoma of the thyroid. Nature Clin Practice Endocrinol Metab. 2007;3:240-248.*
35. **Pelizzo MR, Boschini IM, Toniato A, Piotta 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; 32:1114-1148.*
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; 138:33–38.*
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; 97:1181–1185.*
38. **Passler C, Prager G, Scheuba C, Niederle BE, Kaserer K, Zetting G, Niederle B.** *Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a long-term follow-up. Arch Surg. 2003; 138:1362–1366.*
39. **Tielens ET, Sherman SI, Hruban RH, Ladenson PW.** *Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study. Cancer. 1994; 73:424–431.*
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;7:79–84.*
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):1255-1264.*
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: 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):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):1167-1214.
45. **Parameswaran R, Brooks S, Sadler GP.** *Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers.* *Int J Surg.* 2010;8(3):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; 42:19-28.
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):1454-1457.
48. **Xing M.** *BRAF mutation in thyroid cancer.* *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(2):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):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):10199-10207.
51. **Fagin JA, Wells SA Jr.** *Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer.* *N Engl J Med* 2016;375(11):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):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):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):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; 16:483-490.*
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):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):138-141.*
59. **Derwahl M.** *Linking stem cells to thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(3):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):2692-26702.*
61. **Rezza A, Sennett R, Rendl M.** *Adult stem cell niches: cellular and molecular components. Curr Top Dev Biol. 2014;107:333-372.*
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):8874-8885.*
63. **Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD.** *Angiogenesis--a new target for future therapy. Vascul Pharmacol. 2006;44(5):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):777-794.*
65. **Papetti M, Herman IM.** *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol. 2002;282(5):C947-970.*
66. **Karamysheva AF.** *Mechanisms of angiogenesis. Biochemistry (Mosc). 2008;73(7):751-762.*
67. **Cao Y.** *Tumor angiogenesis and therapy. Biomed Pharmacother 2005;59 Suppl 2: S340-343.*
68. **Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC.** *COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. Surgeon. 2009;7(3):174-180.*
69. **McMahon G.** *VEGF receptor signalling in tumour angiogenesis. The Oncologist 2000;5(Suppl 1):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: 6050-6054.*



71. **Chaudary N, Hill RP.** *Hypoxia and metastasis in breast cancer. Breast Dis 2006; 26:55–64.*
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):830-842.*
74. **Harris AL.** *von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. Oncologist 2000;5 Suppl 1: 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):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):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):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):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):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: 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: 273–278.*

85. Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, Sotiropoulou PA, Loges S, Lapouge G, Candi A, Mascré 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):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): 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: 263-272.*
88. Meisenberg G, Simmons WH. *Principles of Medical Biochemistry 1st edn. Missouri: Mosby, 1998:567-570.*
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;121:1339-1347.*
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: 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: 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):333-338.*
93. Wang D, Dubois RN. *Prostaglandins and cancer. Gut 2006; 55(1):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): 1822-1829.*
95. Wang D, DuBois RN. *Cyclooxygenase-2 derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. PNAS 2004;101(2): 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: 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): 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: 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):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): 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): 9904-9912.
102. **Reis-Fillho JS, Schmitt FC.** *Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? Microsc Res Techn.* 2003; 60:171–180.
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):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):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):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):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):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; 25:2615–2625.
109. **Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K.** *Lymphangiogenesis and cancer metastasis. Nat Rev Cancer* 2002; 2:573–583.
110. **Alitalo K.** *The lymphatic vasculature in disease. Nature Med.* 2011; 17:1371–1380.

111. Kerjaschki D. *The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis.* *J. Clin. Invest.* 2005; 115:2316–2319.
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):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):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):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):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):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):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):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):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):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):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):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; 135:139-148.*
124. **Heidenhain M.** *Noch einmal uber die darstellung der centralkorper durch eisnamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben. Z Wiss Mikrosk 1896; 13:186.*
125. **Gurr AB.** *Biological staining methods. Hopkin and Williams Chadowell Heath 1976.*
126. **Radosavljevic G, Ljujic 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; 57:135-144.*
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):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-Saavedra 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, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, eds. WHO: Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs. end 3, Lyon, France: IARC Press;2004:57-66.*
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:2474-2484.*
133. **Sherr CJ, Roberts JM.** *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 1999;13:1501-1512.*
134. **Tan GH, Gharib H.** *Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. Ann Intern Med 1997; 126: 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: 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: 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: 101-107.*
139. **Folkman J.** *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol. 2002; 29:15-28.*
140. **Alitalo A, Detmar M.** *Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. Oncogene. 2012; 31: 4499-4508.*
141. **Folkman J.** *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst. 1990; 82(1): 4-6.*
142. **Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE.** *The prognostic significance of tumor vascularity in intermedietthickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. Am J Pathol 1988;133(2):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):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):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; 75:84-91.*
146. **Zhuang H, Yang ZG, Chen HJ, Peng YL, Li L.** *Time-intensity curve parameters in colorectal tumours measured using double contrastenhanced ultrasound: correlations with tumour angiogenesis. Colorectal Dis 2012; 14:181–187.*
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):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):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):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):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):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):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):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):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):261-265.
156. **Furlan JC, Bedard YC, Rosen IB.** *Significance of tumor capsular invasion in well-differentiated thyroid carcinomas.* *Am Surg* 2007;73(5):484-491.
157. **Kunz-Schughart LA, Knuechel R.** *Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue.* *Histol Histopathol.* 2002; 17(2):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: 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):59-67.
160. **Koperek O, Asari R, Niederle B, Kaserer K.** *Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma.* *Histopathology* 2011; 58: 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; 122:166–171.

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; 11:137-142.
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):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):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):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; 44:2204-2212.
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):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; 9:237-242.
169. **Erdem H, Gündogdu C, Sipal S.** *Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma.* *Exp Mol Pathol.* 2011; 90:312-317.
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; 153:701-709.
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):4418-4425.
173. **Cunha LL, Marcello MA, Ward LS.** *The role of the inflammatory microenvironment in thyroid carcinogenesis.* *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(3):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):702-708.
175. **French JD, Kotnis GR, Said S, Raeburn CD, McIntyre RC Jr, Klopper 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):E934-943.
176. **Pusztaszeri MP, Faquin WC, Sadow PM.** *Tumor-associated inflammatory cells in thyroid carcinomas.* *Surg Pathol Clin* 2014; 7: 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):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):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):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):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):1063-1073.
184. **Cao Y, Prescott SM.** *Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer.* *J Cell Physiol.* 2002;190(3):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; 89:2637-2645.
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):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):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):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):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; 62:1567-1572.
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; 42:492-497.
192. **Fosslien E.** *Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. Ann Clin Lab Sci.* 2001;31(4):325-348.
193. **Albrecht I, Christofori G.** *Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. Int J Dev Biol* 2011;55(4-5):483-494.
194. **Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M.** *Lymphangiogenesis and tumor metastasis. Cell Tissue Res.* 2003;314(1):167-177.
195. **McCarter MD, Clarke JH, Harken AH.** *Lymphangiogenesis is pivotal to the trials of a successful cancer metastasis. Surgery.* 2004; 135:121-124.
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):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):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):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): 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):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):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; 21:101–107.
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):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):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):578–586.
207. **Maula SM, Luukkaa 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):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):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):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;129:716–719.
211. **Lin JD.** *Papillary thyroid carcinoma with lymph node metastases. Growth Factors.* 2007; 25(1):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; 11:8063-8069.

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; 5:150-155.
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):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):1154-1163.
216. **Hengst L, Reed SI.** Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;227:25-41.
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):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):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;90:1284–1291.
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):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):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;128:253-257.
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; 68:87-96.
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):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):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;150:401-407.
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;11:169-174.
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; 23:1263-1268.
230. **Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE.** *Molecular profile and clinical/pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. Am J Clin Pathol.* 2003; 120:71-77.
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):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):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;269:682-685.