

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sonja A. Šelemetjev

**SURVIVIN I VEGF-C U PAPILARNOM I
ANAPLASTIČNOM KARCINOMU
ŠTITASTE ŽLEZDE: EKSPRESIONI
PROFILI, ULOGA U BIOLOGIJI TUMORA
I KLINIČKO-PATOLOŠKI ZNAČAJ**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Соња А. Шелеметјев

**СУРВИВИН И VEGF-C У ПАПИЛАРНОМ
И АНАПЛАСТИЧНОМ КАРЦИНОМУ
ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ: ЕКСПРЕСИОНИ
ПРОФИЛИ, УЛОГА У БИОЛОГИЈИ
ТУМОРА И КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИ
ЗНАЧАЈ**

докторска дисертација

Београд, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sonja A. Šelemetjev

**SURVIVIN AND VEGF-C IN PAPILLARY
AND ANAPLASTIC THYROID
CARCINOMA: EXPRESSION PROFILES,
BIOLOGICAL ROLE AND THEIR
CLINICO-PATOLOGICAL SIGNIFICANCE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTORI

dr Dubravka Cvejić, naučni savetnik Instituta za primenu nuklearne energije INEP, Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučni savetnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ IBISS

ČLAN KOMISIJE

dr Svetislav Tatić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2014. godine

ZAHVALNICA

Najsrdačnije se zahvaljujem svojoj mentorki dr Dubravki Cvejić na ukazanom poverenju, strpljenju, nesebičnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada, dizajniranju koncepta i dugim korisnim diskusijama tokom pisanja doktorske teze. Zahvaljujem joj se i na nesebičnom znanju koje mi je prenela, kao i pomoći na mom naučnom usavršavanju.

Zahvaljujem se i prof. dr Gordani Matić i prof. dr Svetislavu Tatiću na čitanju teze, vrlo korisnim savetima, podršci i velikoj predusretljivosti.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Svetlani Savin na vrlo konstruktivnim sugestijama, kao i na spremnosti da uvek sasluša i pomogne.

Dragim koleginicama iz laboratorije, Iloni, Tijani, Svetlani i Jeleni dugujem zahvalnost za nesebičnu pomoć i veliku kolegijalnost, pri čemu bih izrazila najiskreniju zahvalnost koleginicama Iloni na velikoj spremnosti da uvek da pravi stručni savet i učestvuje u iscrpnim diskusijama.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici: Marku i ćerki Andrei na inspiraciji za pisanje i velikoj ljubavi koju su mi pružili, kao i sestri Vanji, mami, tati i Markovim roditeljima na velikoj pomoći i podršci. Posebnu zahvalnost dugujem svojoj baki Rosandri, koja je sve vreme bila uz mene, pružila mi veliku ljubav i razumevanje, dala snagu i primer kako u životu uvek treba gledati napred. Ovaj doktorat posvećujem svojoj baki.

Sonja Šelemetjev

SURVIVIN I VEGF-C U PAPILARNOM I ANAPLASTIČNOM KARCINOMU ŠTITASTE ŽLEZDE: EKSPRESIONI PROFILI, ULOGA U BIOLOGIJI TUMORA I KLINIČKO-PATOLOŠKI ZNAČAJ

REZIME

Progresija malignih tumora štitaste žlezde od dobro diferenciranih (papilarni karcinom) u nediferencirane, agresivne forme (anaplastični karcinom) praćena je različitim promenama na molekularnom nivou, koje omogućavaju malignoj ćeliji kontinuiranu aberantnu stimulaciju rasta i izbegavanje apoptotske smrti, što uz neoangiogenezu (formiranje novih krvnih i limfnih sudova) predstavlja preduslove tumorskog rasta i širenja.

Predmet ovog rada je izučavanje molekularnih promena koje prate dediferencijaciju papilarnog u anaplastični karcinom štitaste žlezde, tj. ispitivanje promena ekspresionih profila apoptotskih molekula (Bcl-2, Bax, survivin) i limfangiogenog faktora (VEGF-C) u korelaciji sa kliničkim parametrima tokom progresije maligniteta tumora štitaste žlezde.

Imunohistohemijskom analizom ekspresionih profila članova Bcl-2 familije konstatovano je da tokom progresije dolazi do smanjenja ekspresije Bcl-2 (antiapoptotski molekul), ali da je *in situ* apoptotska smrt detektovana TUNEL metodom na niskom nivou, uprkos visokih ekspresionih nivoa Bax (pro-apoptotskog) molekula. U isto vreme sa smanjenjem ekspresije Bcl-2 tokom progresije maligniteta dolazi do postepenog povećanja drugog antiapoptotskog molekula, survivina, koji je operativan nizvodno od Bax-a. Visoka ekspresija survivina je bila u korelaciji sa sniženim stepenom *in situ* detektovane apoptotske smrti, što sugerije da survivin, a ne odnos Bcl-2/Bax ima ulogu u inhibiciji finalizacije programirane ćelijske smrti. Poređenjem imunohistohemijske ekspresije survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata utvrđena je značajna korelacija između visoke ekspresije survivina i prisustva metastaza u limfnim čvorovima. Ekspresioni profili VEGF-C proteina (angiogeni faktor koji promoviše formiranje tumorske vaskulature, a time i rast i širenje tumora) pokazali su porast tokom tumorske progresije i značajnu korelaciju sa prisustvom limfnih metastaza, ekstratiroidnom invazijom i uznapredovalim stadijumom tumorske bolesti. Značajna međusobna korelacija imunohistohemijske ekspresije

survivina i VEGF-C proteina u tumorima sa prisutnim limfnim metastazama, kao i u njihovom metastatskom tkivu, sugerise koordinisanu ulogu ova dva molekula u metastatskom procesu. Klinički značaj evaluacije ekspresije survivina i VEGF-C proteina je u predikciji metastatskog potencijala tumora i agresivnijeg toka bolesti karcinoma štitaste žlezde. Sagledavanje uloge ova dva proteina u biologiji tumora otvoriće mogućnosti za kreiranje i primenu ciljanih molekulskih terapija kojima će aktivacija apoptoze i inhibicija angiogeneze sigurno biti integralni deo.

Ključne reči: štitasta žlezda, papilarni karcinom, anaplastični karcinom, survivin, VEGF-C, apoptoza, angiogeneza

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija tumora

UDK broj: [577.112 : 616-037] : [616-006.6 : 612.44] (043.3)

SURVIVIN AND VEGF-C IN PAPILLARY AND ANAPLASTIC THYROID CARCINOMA: EXPRESSION PROFILES, BIOLOGICAL ROLE AND THEIR CLINICO-PATHOLOGICAL SIGNIFICANCE

ABSTRACT

Progression of malignancy of thyroid gland tumors from well differentiated (papillary carcinoma) to undifferentiated, aggressive form (anaplastic carcinoma) is accompanied by molecular changes. These enable continuous stimulation of aberrant growth and escape from apoptotic death, together with neoangiogenesis (formation of new blood and lymphatic vessels) which are prerequisites for tumor growth and spread.

The objective of this work was examination of some molecular changes accompanying dedifferentiation of papillary to anaplastic carcinoma of the thyroid gland, i.e. an investigation of alterations in expression profiles associated with apoptosis (Bcl-2, Bax, survivin) and lymphangiogenic factor, VEGF-C, in correlation with clinico-pathological parameters during the progression of malignancy of thyroid gland tumors.

Immunohistochemical analysis of expression profiles of Bcl-2 family members revealed decrease of Bcl-2 expression (anti-apoptotic molecule) during this progression, but a low level of *in situ* apoptotic cell death detected by the TUNEL method, despite high levels of Bax (pro-apoptotic molecule). The decrease of Bcl-2 expression was followed by increase of another anti-apoptotic molecule, survivin, which acts downstream from Bax. High survivin expression was found to correlate with the lower rate of *in situ* apoptotic cell death, suggesting that survivin, but not the Bcl-2/Bax ratio, has a role in finalization of programmed cell death. By comparing survivin immunohistochemical expression with clinico-pathological parameters of patients we found a significant positive correlation between high survivin expression and the presence of lymph node metastases. Expression profiles of VEGF-C protein (an angiogenic factor which promotes the formation of tumor vasculature, and thereby tumor growth and spread) revealed increased levels during tumor progression and a significant correlation with the presence of lymph node metastases, extrathyroid invasion and advanced stages of disease. Significant correlation between the expressions of two molecules, survivin and VEGF-C, in tumors with the presence of lymph metastases and in their metastatic tissues, suggests their coordinated roles in the metastatic process. The clinical

significance of the evaluation of survivin and VEGF-C expressions could be in predicting the metastatic potential of tumors and an aggressive course of the disease. Better insight into the roles of these two proteins in tumor biology may open possibilities for creating targeted molecular therapies in the future in which activation of apoptosis and inhibition of angiogenesis should be integral parts.

Key words: thyroid gland, papillary carcinoma, anaplastic carcinoma, survivin, apoptosis, VEGF-C, angiogenesis

Scientific field: Biology

Special topic: Tumor biology

UDC number: [577.112 : 616-037] : [616-006.6 : 612.44] (043.3)

SKRAĆENICE

ABC - avidin biotin kompleks

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (engl. „**Acquired Immunodeficiency Syndrome**“)

AJCC – Američka ujedinjena komisija za karcinom (engl. „**American Joint Committee on Cancer**“)

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

Apaf-1 – apoptotski aktivirajući faktor proteaza (engl. „**Apoptotic protease activating factor 1**“)

ATC – anaplastični tiroidni karcinom (engl. „**Anaplastic Thyroid Carcinoma**“)

Bax – X protein pridružen Bcl-2 (engl. „**Bcl-2 Associated X protein**“)

BCA – bicinhoninična kiselina

Bcl-2 – B-ćelijski limfoma 2 protein (engl. „**B-cell Lymphoma 2 protein**“)

BIR – bakulovirusni inhibitorski ponovak (engl. „**Baculovirus Inhibitor of Apoptosis protein Repeat**“)

BRAF – proto-onkogen za serin/treonin-protein kinazu B-Raf

CARD – kaspaza-aktivirajući i regrutujući domen (engl. „**Caspase Activation and Recruitment Domains**“)

c-IAP1 – ćelijski inhibitorski apoptotski protein 1 (engl. „**Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1**“)

c-IAP2 – ćelijski inhibitorski apoptotski protein 2 (engl. „**Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-2**“)

CT – kompjuterizovana tomografija, skener

DAB – 3, 3'-dimaninobenzidin

DTC – diferencirani tiroidni karcinom (engl. „**Differentiated Thyroid Carcinoma**“)

dNTP – deoksiribonukleotid trifosfat

ECL – enzimski hemiluminescentni kit

EI – ekstratiroidna invazija

FTC – folikularni tiroidni karcinom (engl. „**Follicular Thyroid Carcinoma**“)

HRP – peroksidaza iz rena (engl. „**Horseradish Peroxidase**“)

IAP – inhibitorni apoptotski proteini

ILP-2 – IAP-sličan protein 2 (engl. „**IAP-like Protein 2**“)

INCENP – unutrašnji protein centromere (engl. „**Inner Centromere Protein**“)

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

LNM – metastaze u limfnim čvorovima (engl. „**Lymph Node Metastasis**“)

MAPK – mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (engl. „**Mitogen-Activated Protein Kinases**“)

ML-IAP – melanoma inhibitorni apoptotski protein

MR – magnetna rezonanca

NAIP – bakulovirusni protein 1 koji sadrži IAP ponovak

p53 – protein 53

PBS – natrijum fosfatni pufer (engl. „**Phosphate Buffered Saline**“)

PI3K – fosfatidilinozitol 3 kinaze

PI3KCA – fosfatidilinozitol-4, 5-bifosfat 3-kinazna katalitička subjedinica alfa izoforme

PLGF – placentalni faktor rasta (engl. „**Placental Growth Factor**“)

PTC – papilarni tiroidni karcinom (engl. „**Papillary Thyroid Carcinoma**“)

PTEN – fosfataza i tensin homolog (engl. „**Phosphatase and Tensin Homolog**“)

PVDF – polivinil-difluorid

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

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

RET – proto-onkogen za receptor tirozin kinaze

RING – zaista interesantan novi gen (engl. „**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene“)

SDS-PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS - (engl. “**SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis**”)

SH-2 – Src homologni domen 2

T₃ – 3, 5, 3’-trijodtironin

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

TdT – deoksinukleotidil-transferaza

Tg – tireoglobulin

TNF- α – tumorski nekrotični faktor α

TNM – klasifikacija malignih tumora prema velični tumora (T), starosti pacijenata, prisustvu metastaza u okolnim limfnim čvorovima (N) i udaljenim metastazama (M)

TPO – tiroidna-peroksidaza

TSH – tireostimulirajući hormon, tireotropin

TUNEL – kit za *in situ* detekciju ćelijske smrti (engl. „**T**erminal-mediated deoxynucleotidyl transferase dUTP **n**ick **e**nd- **l**abeling”)

UBA – ubikvitin pridruženi domen

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (engl. „**W**orld **H**elath **O**rganization”)

XIAP – X-spojen inhibitorni apoptotski protein

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. „**V**ascularn **E**ndothelial **G**rowth **F**actor”)

VEGFR – receptor za vaskularni endotelni faktor rasta (engl. „**V**ascularn **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor”)

SADRŽAJ

UVOD	1
1. PREGLED LITERATURE	3
1.1. Štitasta žlezda: struktura, funkcija i regulacija.....	4
1.2. Tumori štitaste žlezde.....	6
1.2.1. Histološka klasifikacija tumora štitaste žlezde.....	6
1.2.2. Papilarni karcinom štitaste žlezde: cito-histološke karakteristike, etiologija i prognoza.....	8
1.2.3. Anaplastični karcinom štitaste žlezde: cito-histološke karakteristike, etiologija i prognoza.....	10
1.2.4. TNM klasifikacija tumora štitaste žlezde	12
1.3. Programirana ćelijska smrt - apoptoza	15
1.3.1. Istorija	15
1.3.2. Definicija, morfološke karakteristike i uloga apoptoze.....	15
1.3.3. Indukcija i mehanizam apoptotskog procesa.....	17
1.3.4. Regulacija apoptotskog procesa	18
1.3.4.1. Bcl-2 familija proteina	18
1.3.4.2. Inhibitorni apoptotski proteini – IAP familija.....	19
1.4. SURVIVIN.....	20
1.4.1. Strukturne i funkcionalne karakteristike survivina.....	20
1.4.2. Uloge survivina	21
1.4.3. Ekspresija survivina u kancerima.....	23
1.4.4. Ekspresija survivina u tumorima štitaste žlezde.....	23
1.5. ANGIOGENEZA	24
1.6. Osnovne karakteristike VEGF familije proteina	25
1.6.1. VEGF-A	25
1.6.2. VEGF-B	26
1.6.3. VEGF-C i VEGF-D.....	27
1.7. VEGF receptori: struktura, distribucija i uloga	27
1.7.1. VEGF receptor-1	28
1.7.2. VEGF receptor-2	29
1.7.2. VEGF receptor-3.....	29
1.8. Mehanizam angiogeneze u tumorima.....	30
1.9. Angiogeneza u tumorima štitaste žlezde	31

2. CILJ	34
3. MATERIJAL I METODE	35
3.1. MATERIJAL.....	38
3.1.1. Reagensi	38
3.1.2. Klinički materijal.....	39
3.2. METODE	40
3.2.1. Detekcija ekspresije proteina imunohistohemijskom metodom.....	40
3.2.2. In situ detekcija apoptoze TUNEL-kitom (TdT In Situ Apoptosis Detection Kit) ...	42
3.2.3. Homogenizacija tkiva štitaste žlezde	45
3.2.4. Detekcija ekspresije proteina imunoblotom.....	45
3.2.5. Kvantifikacija proteinskih traka (denzitometrija)	46
3.3. Statističke analize.....	46
4. REZULTATI	48
4.1. Ekspresija anti-apoptotskog proteina Bcl-2 i pro-apoptotskog proteina Bax u tkivu papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde.....	49
4.2. Detekcija apoptotske smrti ćelija u tkivu papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde.....	55
4.3. Poređenje ekspresije Bcl-2 i Bax proteina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde.....	57
4.4. Analiza imunohistohemijske ekspresije survivina u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde	59
4.5. Poređenje imunohistohemijske ekspresije survivina i članova Bcl-2 familije (Bcl-2, Bax) u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde	63
4.6. Korelacija imunohistohemijske ekspresije survivina i apoptotske smrti ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde.....	65
4.7. Poređenje ekspresije survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde	67
4.8. Poređenje ekspresije survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde	70
4.9. Poređenje imunohistohemijske ekspresije survivina u uzorcima pacijenata sa papilarnim karcinomom sa prisustvom/odsustvom metastaza u limfnim čvorovima.....	71
4.10. Imunoblot analiza ekspresije survivina u uzorcima pacijenata sa papilarnim karcinomom sa prisustvom/odsustvom metastaza u limfnim čvorovima.....	72
4.11. Analiza imunohistohemijske ekspresije survivina u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma u poređenju sa metastatskim tkivom u limfnim čvorovima istog pacijenata.....	73
4.12. Analiza imunohistohemijske ekspresije VEGF-C proteina u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde.....	76

4.13. Poređenje ekspresije VEGF-C proteina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde.....	80
4.14. Imunoblot analiza i denzitometrijska kvantifikacija traka koje odgovaraju VEGF-C proteinu iz tkivnih uzoraka pacijenata sa papilarnim karcinomom sa prisustvom/odsustvom metastaza u limfnim čvorovima	82
4.15. Analiza imunohistohemijske ekspresije VEGF-C u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma u poređenju sa metastatskim tkivom u limfnim čvorovima istog pacijenta	85
4.16. Korelacija imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma.....	88
5. DISKUSIJA.....	94
6. ZAKLJUČCI	111
7. LITERATURA.....	114
8. BIOGRAFIJA AUTORA	134
9. PRILOZI.....	136
<i>Изјава о ауторству.....</i>	<i>137</i>
<i>Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада</i>	<i>138</i>
<i>Изјава о коришћењу</i>	<i>139</i>

UVOD

Višećelijski organizmi razvili su složene, genski regulisane mehanizme, kojima održavaju konstantan broj ćelija u tkivima, a otklanjaju ostarele, suvišne i “nepoželjne” ćelije.

Maligna ćelija, da bi ostvarila svoju misiju (neprestano umnožavanje i preživljavanje), mora da “prevari” kontrolne mehanizme koje je organizam razvio da bi regulisao kontrolu ćelijskog ciklusa i programiranu ćelijsku smrt-apoptozu.

Misija maligne ćelije je i zauzimanje novih prostora, a za to je potrebno dodatno snabdevanje tumorskog tkiva nutritivnim faktorima i stvaranje nove vaskulature, koja će to obezbediti.

Dakle, u osnovi razvoja i progresije tumora su poremećaji u regulaciji ćelijskog ciklusa, programirane ćelijske smrti i angiogeneze.

Tema ovog rada bila je izučavanje molekularnih promena u ekspresiji proteina uključenih u procese apoptoze i angiogeneze, tokom progresije maligniteta tumora štitaste žlezde, od diferenciranih karcinoma sa dobrom prognozom, do nediferenciranih (anaplastičnih) karcinoma, sa agresivnim tokom bolesti i letalnim ishodom.

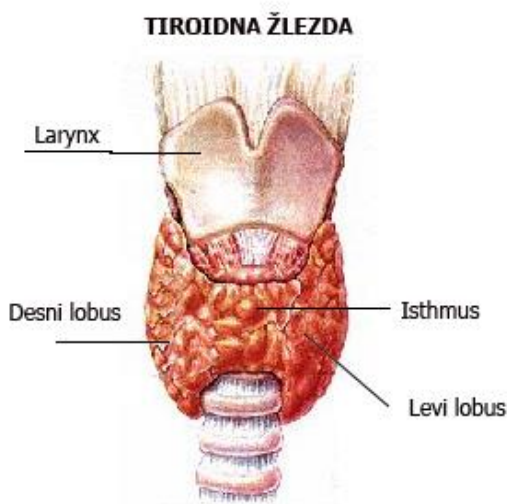
Istraživanja su izvedena sa željom da daju doprinos boljem sagledavanju biologije tumora štitaste žlezde, u korelaciji sa njihovim kliničkim ponašanjem, a time doprinesu i novim modalitetima terapije ovih pacijenata u budućnosti.

1. PREGLED LITERATURE

1.1. Štitasta žlezda: struktura, funkcija i regulacija

Štitasta žlezda ili tiroidea (lat. Glandula thyreoides) je jedan od najvažnijih endokrinih organa u organizmu. Ova žlezda putem svojih hormona, tiroksina (T_4) i trijodtironina (T_3), omogućava normalan rast i razviće i utiče na osnovne metaboličke procese.

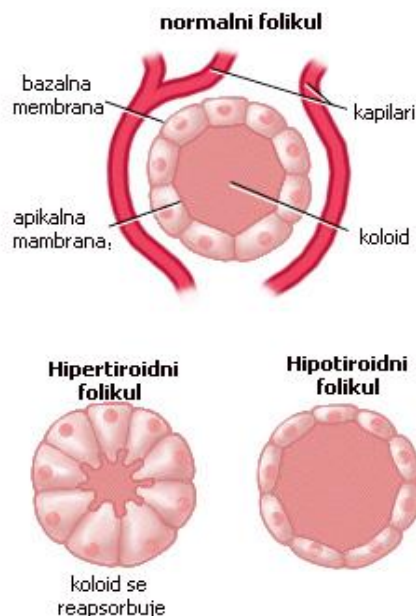
Štitasta žlezda se nalazi na prednjem delu vrata, uz traheju, i čine je dva bočna režnja (lobusa) spojena tkivnim mostom - Isthmusom (**Slika 1**). Prosečna težina štitaste žlezde odrasle osobe je 20 do 30 grama (Petrović i Cvijić, 1997). U strukturu ovog organa ulaze tri vrste tkiva: epitel (žlezdano tkivo), stroma (vezivno tkivo) i endotel (krvni sudovi).



Slika 1. Građa štitaste (tiroidne) žlezde. Preuzeto sa internet adrese <http://medicallook.com>

Tiroidne epitelne ćelije (tirociti), odgovorne za sintezu tiroidnih hormona, organizovane su u sferne strukture zvane folikuli, koji su građeni od jednoslojnog epitela koji zaokružuje unutrašnjost folikula (folikularni lumen). Između folikula je stroma koja se sastoji od krvnih sudova (kapilara) i vezivnog tkiva. Folikuli su sa spoljne strane ograničeni bazalnom membranom. Bazolateralni deo ćelijske membrane, koji je u kontaktu sa potpornim tkivom (stroma), kao i krvnim kapilarima, snabdeven je membranskim receptorima za tirotropin, faktore rasta i druge molekule, koji regulišu rast i funkciju folikularne tiroidne ćelije. Apikalni deo ćelijske membrane tirocita okrenut je ka unutrašnjosti folikula i učestvuje u sintezi tiroidnih hormona. Visina i

oblik folikularnog epitela su u skladu sa aktivnošću žlezde. Pored tirocita, u tkivu štitaste žlezde prisutne su i parafolikularne ili C ćelije, koje proizvode kalcitonin i regulišu nivo kalcijuma u organizmu (Havelka i Tatić, 2003).



Slika 2. Građa folikula. Preuzeto sa internet adrese <http://humanphysiology.tuars.com>

Osnovna funkcija štitaste žlezde je sinteza i sekrecija tiroidnih hormona, tiroksina (T4) i trijodtironina (T3).

Ovi hormoni su po svojoj strukturi jodirane aminokiseline, tako da je za hormonogenezu neophodno da folikularne ćelije aktivno koncentruju jodid iz cirkulacije, koji se nakon enzimske oksidacije inkorporira u tirozinske ostatke visokomolekularnog glikoproteinskog molekula, tiroglobulina (Tg), koji se sintetisuje u tirocitima. Proces organifikacije joda i maturacije tiroglobulina odvija se na spoljašnjoj strani apikalne membrane. Tiroglobulin, koji u svojoj strukturi nosi nastale hormone, izlučuje se u lumen folikula, gde ostaje deponovan, služeći, dakle, i kao prekursor i kao depo tiroidnih hormona. U skladu sa potrebama organizma, tiroglobulin se endocitozom vraća u tirocit, hidrolitički razlaže u lizozomima, a oslobođeni hormoni prelaze u cirkulaciju (Ekholm i sar., 1985).

Dakle, folikularne ćelije štitaste žlezde imaju niz složenih funkcija koje uključuju akumulaciju jodida, sintezu i jodovanje tiroglobulina, njegovo izlučivanje i deponovanje u mešak folikula, proteolizu tiroglobulina i sekreciju hormona.

* * *

Glavni regulator funkcije štitaste žlezde je tireostimulišući hormon hipofize (TSH), koji reguliše nivo hormona u cirkulaciji i tkivima mehanizmom povratne sprege. Nedostatak tiroidnih hormona u ljudskom organizmu dovodi do poremećaja u rastu, razvoju, reprodukciji, ponašanju i metaboličkim procesima. Smanjeno lučenje hormona (hipotireoza) i povećano lučenje hormona (hipertireoza) su osnovni poremećaji funkcije štitaste žlezde.

1.2. Tumori štitaste žlezde

1.2.1. Histološka klasifikacija tumora štitaste žlezde

Nastanak novih ćelija i uklanjanje starih ćelija su procesi su pod strogom kontrolom organizma. Složena i koordinirana regulacija ovih procesa može biti poremećena raznim spoljašnjim ili unutrašnjim činiocima. U tom slučaju, ćelije se nekontrolisano dele i stvaraju tkivnu masu ili izraslinu, zvanu tumor. Prilikom ovakve transformacije ćelija postepeno gubi svoje specifičnosti u različitom stepenu, u zavisnosti od tipa i stadijuma bolesti i stiče nove osobine karakteristične za neoplastično tkivo (autonomnost, nekontrolisane deobe).

Različite vrste tumora koji nastaju u ljudskom organizmu generalno delimo na dve grupe: benigni i maligni, što je određeno njihovim biološkim ponašanjem odnosno kliničkim manifestacijama.

Benigni tumori odlikuju se autonomnim, ali sporim rastom, i nemaju tendenciju širenja na ostale delove tela, tako da nisu pretnja životu.

Maligne tumore (karcinome), osim nekontrolisanog rasta, karakteriše i invazivnost. Odvajanjem kanceroznih ćelija od malignog nodusa i njihovim ulaskom u krvotok ili limfotok, ove ćelije iz originalnog tumora (primarnog tumora) stvaraju nove maligne

tumore na drugim organima (sekundarne tumore ili metastaze). Dakle, invazivnost je sposobnost maligne ćelije da napada i oštećuje okolno tkivo ili udaljene organe.

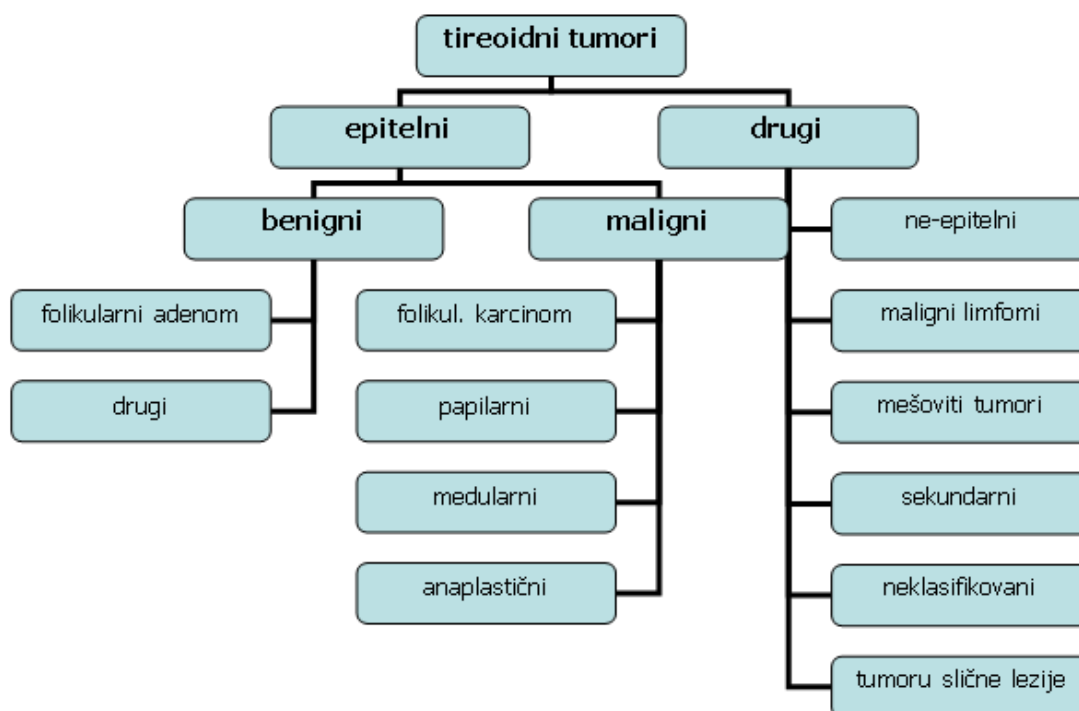
* * *

Tumori štitaste žlezde, u odnosu na druge tumore, pokazuju mnogo veću morfološku varijabilnost, različita biološka ponašanja i kliničke manifestacije. Usled ovoga, a radi davanja što bolje i pouzdanije prognoze, proistekle su potrebe za njihovom klasifikacijom.

Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO), na osnovu rada i iskustva tima velikog broja eksperata u ovoj oblasti prati i usavršava kriterijume klasifikacije tumora štitaste žlezde. Histološka klasifikacija tiroidnih tumora, koja je zadnji put revidirana 2004. godine i koja se danas primenjuje je data na slici 3.

Dakle, kao i tumori ostalih organa, i tiroidni tumori mogu biti: benigni i maligni. Većina tiroidnih tumora su benigni (adenomi). Maligni tumori štitaste žlezde mogu poticati od dve vrste ćelija: od parafolikularnih ćelija, koje daju tzv. medularne karcinome ili od folikularnih (epitelnih) ćelija.

Maligni tumori poreklom od epitelnih ćelija generalno se dele na dobro diferencirane (papilarni i folikularni karcinomi) i nediferencirane (anaplastični karcinomi). Diferencirani karcinomi štitaste žlezde u manjoj ili većoj meri zadržavaju funkcionalne karakteristike zdravog tkiva, dok nediferencirani karcinomi gube funkcionalne i morfološke karakteristike diferencirane ćelije od koje su nastali.



Slika 3. Klasifikacija tumora štitaste žlezde prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2004).

1.2.2. Papilarni karcinom štitaste žlezde: cito-histološke karakteristike, etiologija i prognoza

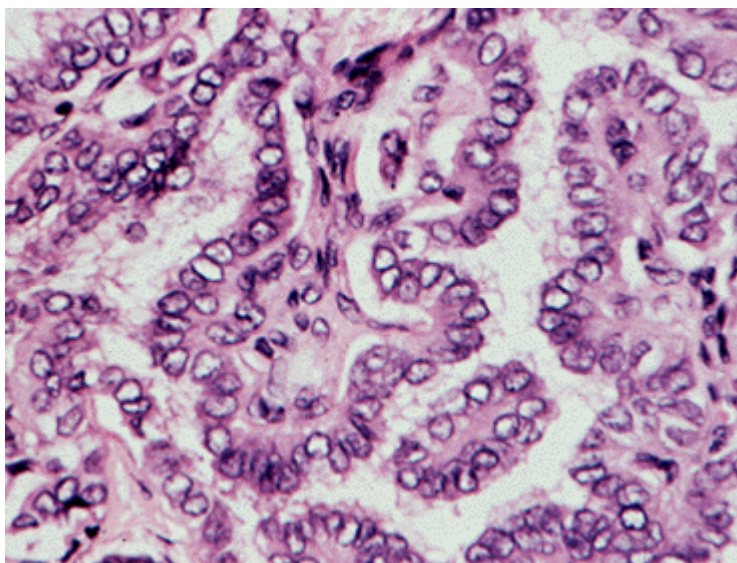
Papilarni tiroidni karcinom (PTC) pripada grupi dobro diferenciranih karcinoma koji nastaju od folikularnih epitelnih ćelija tiroidne žlezde. To je najčešći tip tiroidnog karcinoma i obuhvata oko 80% od svih tiroidnih maligniteta (DeLellis i sar., 2004).

Etiologija PTC je vezana za sredinu, genetske i hormonske faktore (Khan i Nose, 2010; DeLellis i sar., 2004; Hemminiki i Li, 2003).

U poslednjih nekoliko godina povećana je incidenca PTC širom sveta, pa tako i u našoj zemlji. Jednim delom to se može objasniti širokom primenom savremene ultrazvučne dijagnostike. Ostali mogući uzroci povećane incidence maligniteta štitaste žlezde (npr. posledice nuklearnih akcidenata, nutritivni faktori, stres) još uvek nisu dovoljno jasni. Nakon nuklearne katastrofe u Černobilju 1986 godine porastao je stepen u incidenci PTC u Belorusiji i okolnim zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza (DeLellis i sar., 2004). Najupečatljivije povećanje incidence PTC je zapaženo kod dece obzirom da je rast štitaste žlezde najbrži u detinjstvu i opada kod odraslih (DeLellis i sar., 2004).

PTC se obično detektuje kao opipljiv nodus (čvor) u predelu vrata, koji na skeneru nakon primene radioaktivnog izotopa joda ne vezuje jod. To je tzv. “hladni nodus”, koji upućuje na sumnju na malignitet (DeLellis i sar., 2004). Neopipljivi nodusi obično se otkrivaju slučajno nakon ultrazvučnog, CT ili MR ispitivanja, kao i prilikom histološkog pregleda tkiva nakon operacija štitaste žlezde. Mali nodusi PTC-a ili mikrokarcinomi (manji od 1 cm u prečniku), koji se još nazivaju i okultni karcinomi, uglavnom nisu od kliničke važnosti posebno kod mlađih pacijenata. Najčešće imaju odličnu prognozu, mada ponekad daju metastaze u limfnim čvorovima (LNM) (Roti i sar., 2006).

Histološki, tipičan PTC stvara papilarne strukture koje su izdužene i razgranate, a čini ih fibro-vaskularna stroma, obložena malignim epitelnim ćelijama. Ćelije su obično kuboidnog ili pravouganog oblika sa prisutnim citoplazmatskim invaginacijama (DeLellis i sar., 2004). Jedarni hromatin je skoncentrisan uz jedarnu membranu, što daje jedru prozračan izgled, tako da je nalaz staklastih (svetlih) jedara jedan od osnova pravilne dijagnostike papilarnog karcinoma (LiVolsi, 1990; LiVolsi i sar., 2004).



Slika 4. Papilarni karcinoma štitaste žlezde. Preuzeto sa internet adrese www.thyroidmanager.org.

Na jedru se javljaju tzv. jedarni žljebovi ili zaseci. Psamoma telašca, koja predstavljaju kalcifikate sa koncentričnim lamelama, su česta pojava, tipična za PTC. Neki tumori mogu da sadrže multinuklearne gigantske ćelije. Skvamozne metaplazije mogu biti prisutne. Iako su sve ove karakteristike tipične za klasični PTC, često mogu biti prisutne i folikularne strukture koje su često nepravilnog oblika, što zapravo otežava diferencijalnu dijagnostiku papilarnog karcinoma u odnosu na folikularni adenom ili

folikularni karcinom. Pored klasične i folikularne varijante PTC, postoje još i drugi podtipovi PTC, kao što su papilarni mikrokarcinom, inkapsulisana, visokoćelijska varijanta, onkocitna, kolumnarno ćelijska varijanta, dufizno sklerotična varijanta, solidno ćelijska, trabekularna itd. Iako se ove razne varijante PTC histomorfološki razlikuju, zajednički im je izgled jedara i biološko ponašanje.

Molekularnoj patogenezi papilarnog karcinoma posvećena je velika pažnja, mada je još uvek predmet izučavanja. Tipični molekularni marker PTC predstavlja BRAF mutacija (V600E), koja se može detektovati u 35-70% slučajeva PTC i olakšava diferencijalnu dijagnostiku, jer nije prisutna u drugim tipovima tiroidnih karcinoma (folikularni, medularni karcinom). U PTC takođe se često detektuju RET/PTC hromozomski rearanžmani. Mutacije u Ras genu takođe mogu prisutne u PTC, ali sa manjim procentom zastupljenosti nego u folikularnim karcinomima (Nikoforova i Nikiforov, 2008).

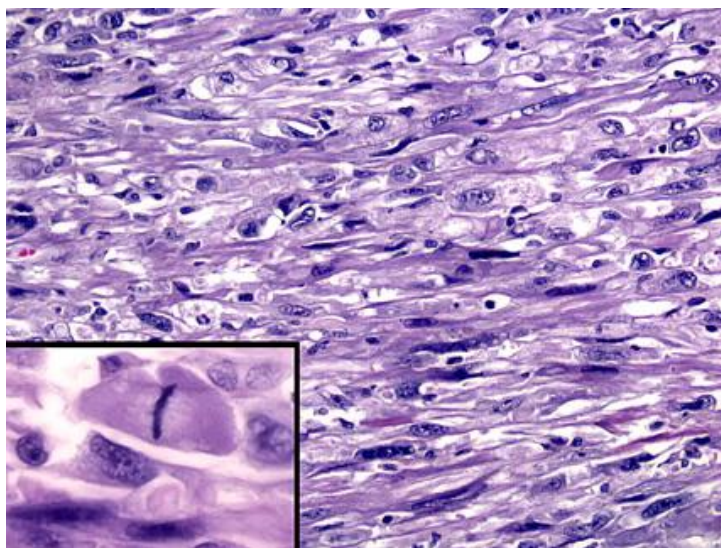
Za papilarni karcinom karakteristično je širenje do regionalnih limfnih čvorova, za razliku od folikularnih karcinoma koji se šire hematogeno i daju udaljene metastaze. Prognoza za PTC je generalno veoma dobra i samo mali broj pacijenata razvija agresivniju varijantu sa čestim recidivima, pa čak i udaljenim metastazama, što vodi lošem toku ishoda bolesti. Najlošiji prognostički faktor predstavlja ekstratiroidna invazija - širenje tumora van kapsule žlezde u okolne strukture.

1.2.3. Anaplastični karcinom štitaste žlezde: cito-histološke karakteristike, etiologija i prognoza

Anaplastični karcinom (ATC) je jedan od najletalnijih maligniteta, sa veoma lošom prognozom i sa rezistencijom na različite tretmane (Smallridge i sar., 2008). Vreme preživljavanja od momenta davanja dijagnoze je svega 5-6 meseci (Are i Shaha, 2006; Smallridge i Copland, 2010). Za sada nema efektnog tretmana ovog oboljenja, mada multimodalni pristupi koji uključuju kombinaciju operacije, radijacije i hemoterapije daju neka obećanja. Ova vrsta karcinoma čini manje od 5% od svih tiroidnih maligniteta (Alin, 1998). Javlja se u šestoj ili sedmoj deceniji života (Smallridge i Copland, 2010), a vrlo retko kod osoba ispod 40 godina (Wein i Weber, 2011). U vreme dijagnoze obično je u poodmakloj fazi, jer se odlikuje brzim lokalnim rastom, sa invazijom u meka tkiva vrata, što ugrožava disajne puteve i jednjak. Od ukupnog broja pacijenata, pri

prezentaciji njih 30-40% ima evidentne metastaze u limfnim čvorovima (Are i Shaha, 2006; Lang i Lo, 2007), a udaljene metastaze su prisutne kod 15-50% pacijenata (LiVolsi, 1990; Kebebew i sar., 2005; Carcangiu i sar., 1985) Dakle, anaplastični karcinom metastazira veoma brzo i to istovremeno i krvnim i limfnim putevima. Faktori rizika za najgoru prognozu predstavljaju godine starosti, vankapsularna invazija, udaljene metastaze i veličina tumora preko 7 cm (Siironen i sar., 2010), dok starost ispod 60 godina i intratiroidni ATC predstavljaju nezavisne faktore za nižu stopu smrtnosti (Kebebew i sar., 2005; Tan i sar., 1995).

Citološka morfologija je varijabilna kod ATC. Mogu se uočiti tri različite morfološke šeme: vretenaste ćelije, gigantske i skvamozne ćelije, mada se često u okviru jednog tumora mogu naći različite varijante ćelija. Jedra su nepravilna i hiperhromatična, "bizarnog" izgleda, a usled čestih mitoza prisutne su i multijedarne anaplastične ćelije (Guarda i sar., 1991).



Slika 5. Anaplastični karcinom štitaste žlezde. Preuzeto sa [sainternet](http://sainternet.adrese.www.atlasgeneticsoncology.org) adrese www.atlasgeneticsoncology.org.

Iako molekularna patogeneza ATC nije do kraja rasvetljena, postoje dokazi koji sugerišu da je ovaj vid karcinoma nastao od prethodno postojećeg dobro diferenciranog karcinoma u procesu dalje malignizacije koja je dovela do dediferencijacije, tj. gubljenja morfoloških i funkcionalnih osobina folikularne ćelije (Wiseman i sar., 2003). Histopatološki dokaz za ovo stanovište predstavlja prisustvo koegzistirajućih fokusa dobro diferenciranog karcinoma uz ATC koji čini 90% od ukupne tumorske mase, dok je molekularni dokaz prisustvo identičnih mutacija ili vrlo slične šeme hromozomskih

aberracija detektovanih i u dobro diferenciranom i u anaplastičnom delu karcinoma, implicirajući na zajedničko poreklo (Nikiforova i sar., 2003; Hunt i sar., 2003).

Neka istraživanja pokazuju da *BRAF* i *RAS* tačkaste mutacije nađene u dobro diferenciranim karcinomima (Nikiforova i sar., 2003; Lemoine i sar., 1989), predstavljaju rani događaj u tiroidnoj tumorogenezi, dok su druge mutacije, kao što je npr. mutacija na *p53* genu (koja je nađena samo u nediferenciranim karcinomima) uključene u tumorsku dediferencijaciju (Fagin i sar., 1993; Garcia-Rostan G i sar., 1999).

Veliki je napor uložen da se okarakterišu molekularne genetske promene u ATC i signalni putevi kao potencijalne nove mete za buduće terapije. Najčešće mutacije su: *BRAF*^{V600E} koja je detektovana u oko 25% (Xing, 2005) slučajeva ATC, zatim izmenjena funkcija tumor supresor gena *p53*, čije su mutacije prisutne u 20-83% slučajeva (Smallridge i sar., 2009). Prisutne su i mutacije na genu *PI3KCA* koji kodira katalitičku subjedinicu PI3K, što vodi aktivaciji Akt proteina.(Santarpia i sar., 2008), kao i mutacija u *PTEN* genu (Santarpia i sar., 2008).

Za tretman ATC sve se više ide na planiranje novih molekularnih terapija koje bi mogle da uključe administraciju tirozin kinaznih inhibitora (Nagaiah i sar., 2009), ciljanje ključnih gena nekih signalnih puteva kao što su RAS/RAF/MAPK (Kojic i sar., 2011; Wunderlich i sar., 2011), PI3K/AKT (Liu i Brown, 2010). Takođe je aktuelan i pristup indukcije apoptotskog puta (Conticello i sar., 2007; Woyach i Shah, 2009) ili indukcije ekspresije *p53* tumor supresorskog proteina (Moretti i sar., 1997; Blagosklonny i sar., 1998).

Iako ne postoji efektivna terapija za ATC u ovom momentu i uprkos tome što se preživljavanje kod pacijenata sa dijagnozom ATC nije promenilo tokom poslednje decenije, postoji nada da će inhibitori tirozin kinaznih receptora i antiangiogenetski agensi u kombinaciji sa operacijom, zračenjem i hemoterapijom dati bolje rezultate u lečenju ovog agresivnog tipa karcinoma.

1.2.4. TNM klasifikacija tumora štitaste žlezde

Papilarni tiroidni karcinom (PTC) je najčešći tip dobro diferenciranog tiroidnog karcinoma (DTC). Iako je prognoza za ovaj tip karcinoma generalno dobra, oko 10%

pacijenata umire, a čak veći procenat pati od recidiva bolesti (Sherman, 2003; Lang i sar., 2007; Mazzaferri i Kloos, 2001). Veoma je važno da se prepoznaju pacijenti kod kojih se može očekivati agresivnije ponašanje tumora i da se prema tome planira klinički tretman. Preduzimane su brojne studije koje su identifikovale različite kliničko-patološke prediktore za PTC na osnovu kojih je osmišljena stratifikacija rizičnih grupa ili gradirajući sistem kako bi se selektovali pacijenti sa visokim rizikom, tj. oni koji bi morali da podlegnu radikalnijoj operaciji i kasnije adekvatnoj terapiji za razliku od pacijenata sa niskim rizikom (Byar i sar., 1979; Hay i sar., 1987; Sherman i sar., 1998;).

Postoji nekoliko kliničko-patoloških parametara koji reflektuju biološko i kliničko ponašanje i utiču na prognozu pacijenta:

Starost pacijenta je u pozitivnoj korelaciji sa agresivnijim ponašanjem tumora.

Pol pacijenta nije nezavisan prognostički faktor, iako neke studije pokazuju da muški pol ima nepovoljniji ishod bolesti

Veličina tumora (T) nije nezavisan prognostički faktor, iako je u nekim studijama dovedena u vezu sa stopom mortaliteta kod PTC (Akslen, 1993).

Ekstratiroidna invazija (Ei) predstavlja loš prognostički faktor i u korelaciji je sa smrtnošću pacijenata (Mazzaferri i Young, 1981; Ito i Miyauchi, 2009).

Metastaze u lokalnim limfnim čvorovima nisu u direktnoj korelaciji sa stopom preživljavanja, mada su neke studije pokazale da je prisustvo metastaza u limfnim čvorovima kod starijih pacijenata loš prognostički faktor (Harwood i sar., 1978; Ito i Miyauchi, 2009).

Udaljene metastaze (M) su loš prognostički pokazatelj za sve histotipove tiroidnih tumora, i u vezi su sa većom smrtnošću.

TNM klasifikacija tiroidnih tumora, koja se bazira na veličini tumora i prisustvu metastaza, je prvi put opisana 1940. godine i smatra se pouzdanim vodičem u donošenju prognoze, odnosno identifikaciji pacijenata sa rizikom za nepovoljniji ishod bolesti. Šesta edicija TNM klasifikacije tumora donesena je 2002. godine (*AJCC Cancer Staging Handbook: TNM Classification of Malignant Tumors*, 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002).

TNM sistem zapravo uzima u obzir anatomske rasprostranjenost tj. veličinu tumora (T), prisustvo/odsustvo metastaza u lokalnim limfnim čvorovima (N), i prisustvo/odsustvo udaljenih metastaza (M).

T klasifikacija primarnih tumora. Klasifikacija primenljiva isključivo za primarne tumore poznatih dimenzija i invazivnosti. Postoje četiri kategorije:

- T₁: tumor manji od 2cm u najvećem promeru, ograničen na štitastu žlezdu
- T₂: tumor veći od 2cm, a manji od 4cm u najvećem promeru, ograničen na štitastu žlezdu
- T₃: svi tumori veći od 4cm, ali ograničeni na štitastu žlezdu
- T₄: svi tumori, bez obzira na njihovu dimenziju, ukoliko se šire van kapsule štitaste žlezde.

N-regionalni limfni čvorovi

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

M-udaljene metastaze

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

TNM klasifikacija tiroidnih tumora je najšire prihvaćen sistem za rangiranje diferenciranog tiroidnog carcinoma i uključuje proširenost primarnog tumora (četiri kategorije T), godine pacijenta, odsustvo/prisustvo metastaza u lokalnim limfnim čvorovima (dva stepena N) i odsustvo/prisustvo udaljenih metastaza (dva stepena M). Prema predlogu od strane International Union Against Cancer i American Joint Committee on Cancer svi pacijenti ispod 45 godina svrstavaju se u nisko rizičnu grupu (stadijum I) bez obzira na odsustvo/prisustvo metastaza u lokalnim limfnim čvorovima. Jedino ukoliko postoje udaljene metastaze ovi pacijenti se svrstavaju u TNM stadijum II.

Svi pacijenti stariji od 45 godina, u zavisnosti od ostalih parametara, mogu pripadati sledećim stadijumima:

- TNM I : $T_1N_0M_0$
- TNM II : $T_2N_0M_0$
- TNM III: $T_3N_0M_0$ ili bilo koji T i N_1M_0
- TNM IV: T_4 , bilo koji N i M_0 ; bilo koji T, bilo koji N i M_1

Svi anaplastični karcinomi se računaju kao stadijum IV.

1.3. Programirana ćelijska smrt - apoptoza

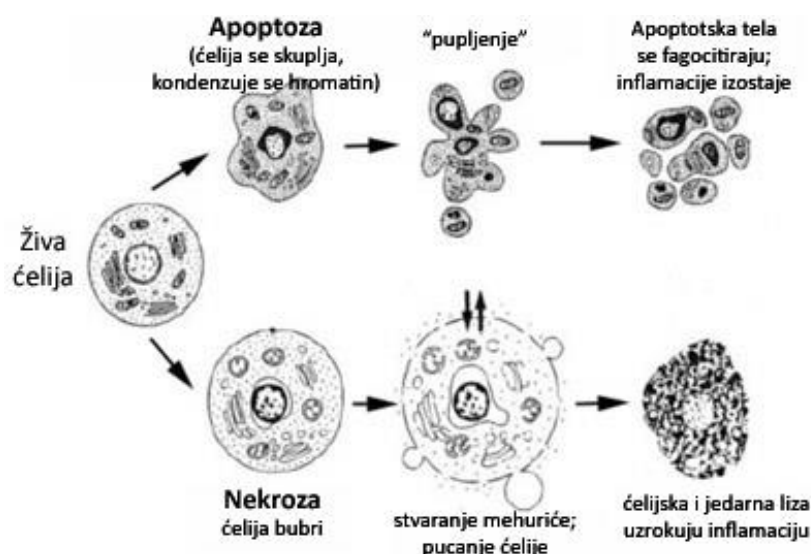
1.3.1. Istorija

Termin apoptoza prvi put spominje J.F.R. Kerr 1972. godine (Kerr i sar., 1972), kako bi definisao fiziološku formu ćelijske smrti koja se bitno razlikuje od nekroze (Searle i sar., 1982). Reč apoptoza potiče od grčke reči koja znači „opadanje” i zapravo opisuje opadanje lišća sa grana i latica sa cvetova. Danas je reč apoptoza ili programirana ćelijska smrt opšte prihvaćena za proces umiranja ćelije fiziološki regulisanim putem.

1.3.2. Definicija, morfološke karakteristike i uloga apoptoze

Apoptoza je genetski kontrolisan proces kojim se nepotrebne ili oštećene ćelije samouništavaju nakon aktivacije apoptotskih gena (Martin, 1993; Earnshaw, 1995).

Svaki multićelijski organizam predstavlja visoko organizovan sistem u kojem je broj ćelija regulisan, i to ne samo kontrolisanjem brzine ćelijske deobe, već i kontrolom stope ćelijske smrti. Ukoliko su ćelije nepotrebne, ili na bilo koji način oštećene, smatraju se opasnim za organizam i eliminišu se suicidalnim programom aktiviranja intraćelijskog programa smrti. Dakle, višćelijski organizmi su evoluirali u tom pravcu da razviju mehanizme koji će genetski oštećenu ćeliju, prvenstveno uništiti, a ne rizikovati da je poštede. Za razliku od nekrotične smrti, apoptotska smrt predstavlja aktivan biološki proces koji pogađa jednu ćeliju, i koji kroz tri različite faze dovodi do hromatinske kondenzacije, jedarne fragmentacije, smanjenja ćelijske zapremine tj. skupljanja ćelije, uvijanja ćelijske membrane, ali bez narušavanja njenog integriteta, i na kraju do fragmentacije same ćelije, pri čemu nastaju apoptotska telašca koja se ubrzo eliminišu iz sistema procesom fagocitoze bez aktiviranja inflamatornog odgovora (Saikumar i sar., 1999).

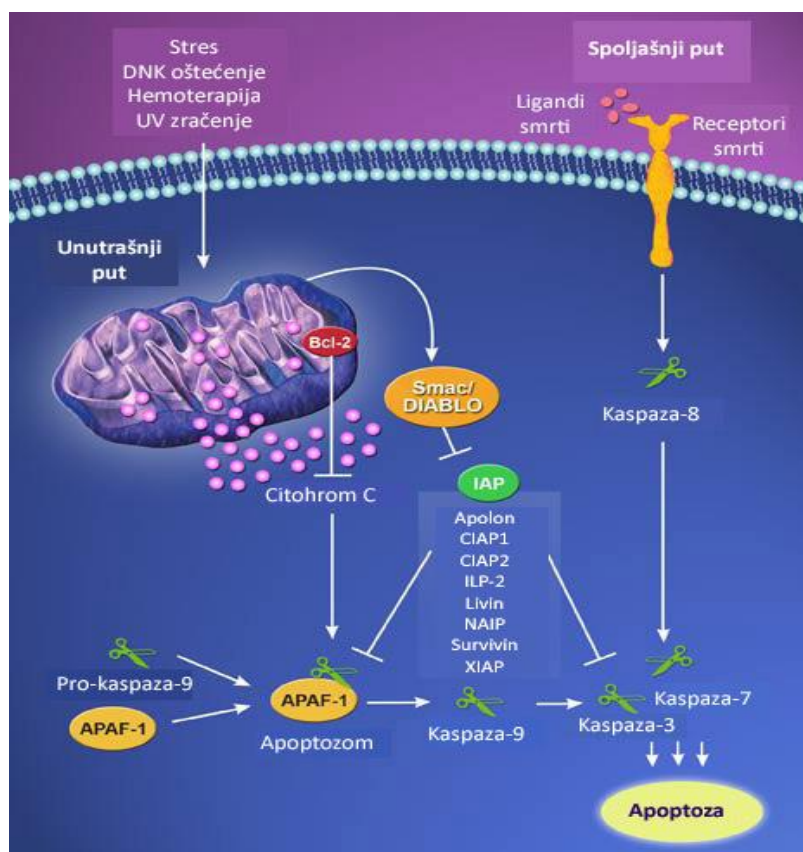


Slika 6. Apoptoza podrazumeva skupljanje ćelije, kondenzaciju hromatina, potom fragmentaciju jedra i ćelije pri čemu ne dolazi do narušavanja integriteta membrane. Ovaj proces se završava fagocitozom apoptotskih telašaca. Kod nekroze se dešava suprotan proces, ćelija bubri, puca i ćelijski sadržaj se izliva napolje što uzrokuje nastanak inflamacije . Preuzeto sa internet adrese <http://linsenbardt.net>

Apoptoza se dešava kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima. Kod zdravih odraslih ljudi, u koštanoj srži i tankom crevu umire bilion ćelija svakog sata. Sa druge strane, poremećaji u kontroli ovog regulisanog procesa mogu dovesti do razvoja različitih oboljenja. Pojačana aktivnost apoptotskog odgovora učestvuje u patogenezi nekih degenerativnih ili hroničnih oboljenja, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest, hronični ulcerativni kolitis, sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS) ili imunski-zavisan (tip1) dijabetes melitus (Saikumar i sar., 1999; Carson i Ribeiro, 1993; Thompson, 1995). Dakle, ukoliko dolazi do promena u regulaciji apoptotskog mehanizma, moguć je nastanak mnogih autoimunih oboljenja, a sa druge strane i onkogeneze, s obzirom da postaje nemoguće zaustaviti replikaciju genetski izmenjene ćelije (Saikumar i sar.,1999; Thompson, 1995; Mountz i sar., 1996).

1.3.3. Indukcija i mehanizam apoptotskog procesa

Nakon izlaganja specifičnom stimulusu, prvi korak je korak „odluke“ koji predstavlja tačku genetske kontrole ćelijske smrti, iza kojeg propagacijom početnog signala dolazi do egzekucije ćelijske smrti.



Slika 7. Putevi indukcije apoptoze. I spoljašnji i unutrašnji put podrazumeva aktivaciju kaspaza. Spoljašnji put se aktivira preko receptora smrti, dok kod stres indukovano unutrašnjeg puta dolazi do povećanja propustljivosti mitohondrijalne membrane (što je regulisano Bcl-2 familijom proteina), pri čemu dolazi do ispuštanja citohroma C u citosol koji u kompleksu sa Apaf-1 aktivira prvo inicijatorne kaspaze koje u narednoj kaskadi aktiviraju egzekutorne kaspaze. Preuzeto sa internet adrese <http://www.imgenex.com>

Apoptoza se može aktivirati kroz dva različita puta, vodeći ka specifičnoj sekvencijalnoj aktivaciji 14 cistein-zavisnih aspartat specifičnih proteaza poznatih kao kaspaze (Thornberry i Lazebnik, 1998):

- ✚ Spoljašnji put aktivacije podrazumeva vezivanje liganada za receptore prisutne na ćelijskoj membrani (npr tumor nekrotični faktor alfa-TNF- α) i signalnom kaskadom vodi aktivaciji prokaspaze-8
- ✚ Unutrašnji put koji je odgovor ćelije na subletalna oštećenja na DNK molekulu izazvana npr. radijacijom, hemoterapijom, reaktivnim kiseoničnim vrstama (kao što su: superoksid, vodonik peroksid, hidroksil radikali itd.) ili čak odsustvom hormona rasta i kontakta sa okolnim ćelijama, što vodi aktivaciji prokaspaze-9

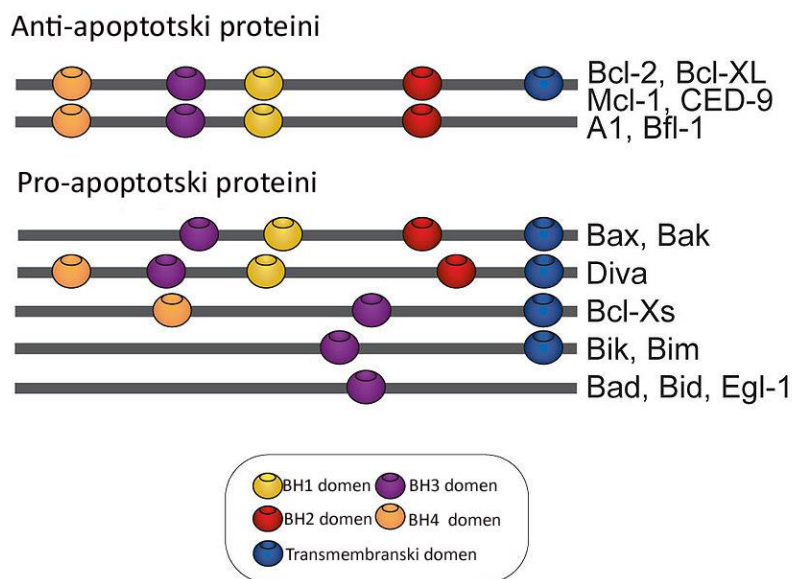
Jednom aktivirane inicijatorne kaspaze (kaspaze -8 i -9) seku tzv. efektore kaspaze (kaspaze -3, -6, -7) koje dalje seku različite ćelijske substrate uključujući komponente citoskeleta (Earnshaw i sar.,1999).

1.3.4. Regulacija apoptotskog procesa

1.3.4.1. Bcl-2 familija proteina

Članovi ove familije proteina poseduju konzerviran Bcl-2 homolog region ili skraćeno BH domen (Yin i sar., 1994; Chittenden i sar., 1995) i dele se na anti-apoptotske (inhibitore apoptoze), čiji je predstavnik **Bcl-2 protein** i pro-apoptotske (aktivatore apoptoze), čiji je predstavnik **Bax protein**. BH3 domeni su zaduženi za stvaranje homo i heterodimera između članova ove familije proteina, pa čak i onih sa suprotnim efektom na proces apoptoze. Nakon signala za otpočinjanje apoptotskog procesa pro-apoptotski članovi podležu konformacionim promenama koje omogućavaju pravilnu inserciju u mitohondrijalnu membranu stvarajući dimere koji predstavljaju kanale kroz koje se izlivaju mitohondrijalni proteini (Wolter i sar., 1997; Hsu i sar., 1997; Goping i sar., 1998; Giffiths i sar., 1999), dok anti-apoptotski članovi stvaranjem heterodimera sa pro-apoptotskim članovima inhibiraju stvaranje kanala, čuvajući na taj način integritet mitohondrijalne membrane. Povišena ekspresija anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije proteina je uočena u velikom broju humanih karcinoma (Reed, 1998) i vezana je za lošu prognozu.

Bcl-2 familija proteina



Slika 8. Šematski prikaz strukturne organizacije Bcl-2 familije proteina. Preuzeto sa internet adrese <http://upload.wikimedia.org>

1.3.4.2. Inhibitorni apoptotski proteini – IAP familija

Signalna kaskada koje reguliše apoptotsku smrt ćelije je u fiziološkim uslovima precizno regulisan proces. Tokom maligne transformacije ćelije mogu se desiti defekti u raznim delovima ovog signalnog mehanizma. Članovi Bcl-2 familije apoptotskih proteina, čiji su predstavnici Bcl-2 (anti-apoptotski protein) i Bax (pro-apoptotski protein) operativni su u mitohondrijalnom (uzvodnom delu) apoptotske signalne kaskade i dugo je vladalo mišljenje da od njihovog odnosa zavisi sudbina ćelije. Nakon toga, otkriveni su i opisani i drugi akteri, operativni nizvodno u ovoj signalnoj kaskadi, koji takođe utiču na apoptotsku smrt ćelije u koraku neposredno pre aktivacije kaspaza, proteolitičkih enzima koji su egzekutori ćelijske smrti.

Novi članovi apoptotskih proteina koji inhibiraju apoptozu (IAP familija, od engleskog: "Inhibitor of Apoptosis Proteins") su prvi put identifikovani 1993. godine u bakulovirusnom genomu utvrdivanjem njihove sposobnosti da suprimiraju apoptotski odgovor ćelije domaćina tokom viralne infekcije (Crook i sar., 1993; Birnbaum i sar., 1994). Članovi ove familije se karakterišu prisustvom najmanje jednog od tri IAP

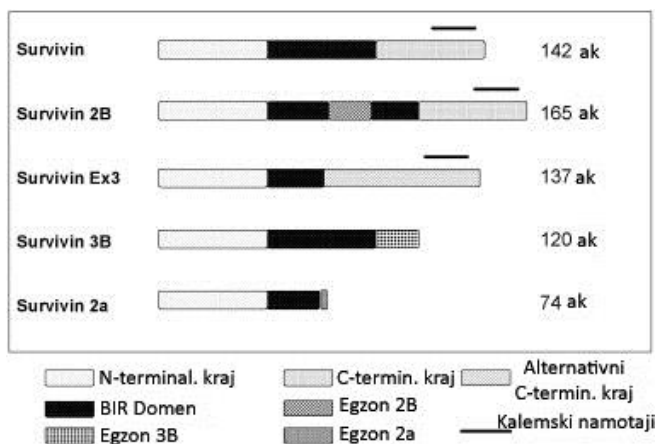
ponovljenog domena (Miller i Thomas, 1994). IAP ponovak ("BIR-baculovirus inhibitory repeat"), je 70-aminokiselinski dug domen, koji koordiniše cinkov jon preko jednog Histidina i tri Cisteina (Hinds i sar., 1999). Kod virusa i životinjskih vrsta je prisutno do 3 tandemske kopije ovog domena (Deveraux, i Reed, 1998).

Sam po sebi, ovaj domen verovatno nije dovoljan za inhibiciju apoptoze, a i proteini ove familije, ostvarujući interakciju preko njega, su evoluirali da služe i u druge svrhe. Isto tako je moguće da "samostalnost" IAP domena u inhibiciji apoptoze zavisi od ćelijskog konteksta, obzirom da je samo jedan BIR (BIR2) kod *baculovirus* dovoljan za inhibiciju apoptoze (Deveraux i Reed, 1999). Pored BIR domena, proteini ove familije mogu da sadrže još i CARD (caspase recruitment domain), UBA (ubiquitin associated domain) i novootkriveni RING domen (Fulda i Vucic, 2012). Do sada je identifikovano 8 humanih IAP proteina: NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, survivin, Apollon/BRUCE, ML-IAP (livin) i ILP-2 (de Almagro i Vucic, 2012). Od svih članova, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP i XIAP direktno utiču na regulaciju apoptoze (Vaux i Silke, 2003).

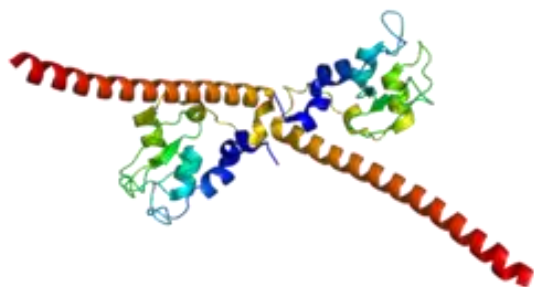
1.4. SURVIVIN

1.4.1. Strukturne i funkcionalne karakteristike survivina

Survivin, sa 16.5 kDa molekulske mase, je najmanji član IAP familije proteina. Kodiran je od strane jednog gena (sa tri introna i dva egzona) lociranog na 17q25 hromozomu (Li i sar., 1998, Abrosini i sar., 1997; Li i Altieri, 1999). On je jedinstven kako po strukturnim, tako i po funkcionalnim karakteristikama. Za razliku od drugih IAP članova, ovaj protein sadrži samo jedan IAP ponovak, i ne sadrži RING finger i CARD (kaspaza-regrutujući) domen (Amrosini i sar., 1997; Li i sar., 1998; Li i sar., 1999). Kristalografskom analizom je utvrđeno da se survivin u rastvoru nalazi u obliku homodimera (Chantalat i sar., 2000). Alternativnim splajsovanjem survivinske pre-iRNK se dobija 5 različitih i-RNK sa različitim potencijalom da kodiraju 5 različitih proteina: survivin, survivin 2 β , survivin Δ Ex3, survivin 3 β , survivin 2 α (Mahotka i sar., 1999; Caldas i sar., 2005; Badran i sar., 2004).



Slika 9. Šematski prikaz strukturne organizacije pet izoformi survivina. Preuzeto sa internet adrese <http://www.nature.com>



Slika 10. Kristalografska struktura humanog molekula survivina. Preuzeto sa internet adrese <http://upload.wikimedia.org>

1.4.2. Uloge survivina

Uloga survivina u ćeliji je višestruka: od ćelijske deobe, preko apoptoze, pa sve do angiogeneze i uloge u metastaskom procesu (Altieri i Marchisio, 2001; Mehrotra i sar., 2010).

Neki istraživači sugerišu da je primarna uloga survivina u kontroli ćelijskog ciklusa, pre nego u inhibiciji apoptoze (Yang i sar., 2004; Okada i Mak, 2004). Zapravo, sinteza i degradacija survivina u normalnom tkivu je regulisana preko ćelijskog ciklusa. Transkripcija survivinskog gena je kontrolisana specifičnom sekvencom u promotorskom regionu, povećava se tokom G₁ faze, i dostiže pik u G₂-M fazi ciklusa (Kobazashi i sar., 1999; Li i Altieri, 1999). Tokom mitoze svoju funkciju ostvaruje u kratkom vremenskom intervalu, tokom metafaze i anafaze, i lokalizovan je u dva glavna ćelijska odeljka. Jedan odeljak je direktno asociran sa polimerizovanim tubulinom, tj. u sastavu je vlakana deobnog vretena. U ovaj odeljak su, osim metafaznih i anafaznih

vlakana, uključeni još i centrozomi i ostatak mitotskog aparata. U okviru ove lokalizacije, survivin učestvuje u stabilizacije mikrotubula i njihovoj dinamici (Li i sar., 1998; Giodini i sar., 2002; Altieri, 2006). Drugi odeljak je u sklopu kinetohora metafaznog hromozoma, i ovde je survivin pridružen regulatorima citokineze, kao što su Aurora B kinaza, INCENP I Borealin/Dasra (Bolton i sar., 2002; Wheatley i sar., 2001; Sampath i sar., 2004), što podržava mišljenje da je survivin subjedinica “chromosomal passenger complex”-a, koji je esencijalan za pravilnu segregaciju hromatida i citokinezu (Lens i sar., 2006). Ukoliko se survivin ukloni iz sistema, kinetohorno-mikrotubularni aparat se ne formira pravilno, ćelijska deoba se ili zaustavlja ili nepravilno dovršava, što konačno rezultuje ćelijskom smrću, tako da eliminacija survivina dovodi do apoptoze ćelije u deobi.

Sa druge strane, uloga survivina u apoptotskom procesu je još uvek predmet kontroverzi. Inicijalno, postavljeni postulati vezani za ulogu survivina, kao i svih članova IAP familije proteina podrazumevali su da se selektivno vezuju i pospešuju degradaciju aktivnih kaspaza-3, -7 i -9 (Altieri, 2003). Kasniji eksperimenti su pokazali da survivin inhibira aktivnu kaspazu-9, ali ne i -3 i -7, i da je za inhibiciju kaspaze-9 neophodna interakcija sa XIAP ili hepatitis B-X interagujućim proteinom (Marusawa i sar., 2003). Prema ovome, sposobnost survivina da inhibira apoptozu predstavlja rezultat njegovih interakcija sa drugim molekulima, a ne direktnu inhibiciju aktiviranja kaspaza.

Smatra se da su različiti podćelijski “pool”-ovi survivina u vezi sa njegovim različitim ulogama. Različite studije su pokazale da jedarni “pool” učestvuje u mitozu, dok je citoplazmatska i mitohondrijalna frakcija odgovorna za antiapoptotsku funkciju survivina (Dohi i sar., 2004; Rodriguez i sar., 2002; Colnaghi i sar., 2006).

Regulacija ekspresije survivina i njegove funkcije je kompleksna i dešava se na različitim nivoima, uključujući transkripciju, različito splajsovanje, post-translacionu regulaciju, degradaciju, intracelularnu sekvencijaciju sa različitim ligandima (Mita i sar., 2008).

1.4.3. Ekspresija survivina u kancerima

Survivin je fiziološki eksprimiran u fetalnom tkivu, a nedetektabilan u većini neoproliferišućeg diferenciranog tkiva (Ambrosini i sar., 1997). S druge strane, survivin je povišeno eksprimiran u transformisanim ćelijama i različitim tipovima humanih karcinoma kao što su: karcinom pluća, dojke, pankreasa, debelog creva, sarkomi mekog tkiva, tumori mozga, melanomi, neuroblastomi, hematološki maligniteti (Waligorska i sar., 2012). Genetska istraživanja su potvrdila razliku u ekspresiji gena za survivin u tumorima u odnosu na normalno tkivo (You i sar., 2004). Ekspresija survivina u karcinomima može biti deregulisana kroz nekoliko mehanizama, uključujući gensku amplifikaciju (Islam i sar., 2000), demetilaciju survivinskog egzona (Hattori i sar., 2001), povećanu promotorsku aktivnost (Li i Altieri, 1999), i pojačanog uzvodnog signalnog PI3-kinaznog i mitogen-aktivirajućeg kinaznog puta (Vaira i sar., 2000). Takođe, poremećaj u regulaciji ekspresije survivina izgleda da je nezavisna od ćelijskog ciklusa, sugerišući pojačanu antiapoptotsku ulogu u poređenju sa normalnom ćelijom, u kojoj je mitotska regulacija survivina predominantna. Povišena ekspresija survivina u karcinomima predstavlja nepovoljan prognostički marker, jer je u korelaciji sa uznapređovalom bolešću, smanjenim preživljavanjem, ubrzanom pojavom recidiva, prisustvom invazije u lokalnim limfnim čvorovima, udaljenih metastaza i rezistencijom na terapiju (Adida i sar., 1998; Marioni i sar., 2006; Osaka i sar., 2006).

1.4.4. Ekspresija survivina u tumorima štitaste žlezde

Survivin je manje izučavan u tumorima štitaste žlezde u odnosu na druge tipove tumora. Dosadašnje studije pokazuju da survivin igra važnu ulogu u patologiji tiroidnog karcinoma. Prvi publikovani rezultati u ovoj oblasti (Ito i sar, 2003) ukazali su na razliku u ekspresiji survivina u diferenciranim i anaplastičnim karcinomima štitaste žlezde i sugerisali da je ekspresija survivina u korelaciji sa stepenom dediferencijacije maligne tiroidne ćelije. Kim i saradnici (Kim i sar., 2012) su pokazali postepen rast survivinske ekspresije idući od hiperplastičnog tkiva, preko papilarnog karcinoma do anaplastičnog, kao i korelaciju ekspresije ovog proteina sa kliničkim stadijumom. Slične rezultate su dobili Zhang i sar. (Zhang i sar., 2009). Oni su pokazali da je značajno povišena ekspresija survivina u tiroidnom karcinomu u odnosu na adenom, a u normalnom tkivu nisu uspjeli da ga detektuju. Dobili su statistički značajnu korelaciju sa

histološkim tipom, kliničkim stadijumom, prisustvom metastaza u limfnim čvorovima, na osnovu čega su sugerisali da je ovaj protein značajan u evoluciji tiroidnog karcinoma i molekulski indikator loše prognoze. Antonaci i sar. (Antonaci i sar., 2008) su pokazali ekspresiju survivina već u papilarnom mikrokarcinomu, što ukazuje da je „up-regulacija“ gena za survivin vezana za ranu fazu tiroidne kancerogeneze.

1.5. ANGIOGENEZA

Kod viših organizama krvna i limfna vaskulatura se formiraju kroz dva različita procesa: vaskulogenezom i angiogenezom. Vaskulogeneza je *de novo* formiranje sudova od hematopojetičnih prekursorskih ćelija i prevashodno se dešava kod razvijajućeg embriona. Angiogeneza, sa druge strane, je formiranje sudova od već postojeće vaskulature (Kurz H i sar., 2003) i predstavlja važan biološki proces kroz život organizma, i u normalnom stanju, a i tokom bolesti. Smanjenje ove funkcije može dovesti do razvoja bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetesna retinopatija, psorijaza, artritis, neurodegenerativna oboljenja i placentalna insuficijencija (eklampsija) (Ferrara, 2004). Suprotno tome, povećana vaskularizacija prisutna je u neoplastičnim tkivima i neophodna je za razvoj i progresiju tumora.

Proces angiogeneze podrazumeva multiplikaciju i migraciju endotelnih ćelija, kao i remodeliranje ekstracelularnog matriksa. Ovaj proces se u fiziološkim uslovima u adultnom organizmu retko dešava (zarastanje rana, menstrualni ciklus) i regulisan je preciznim molekularnim mehanizmima koji uključuju promotore i inhibitore angiogeneze.

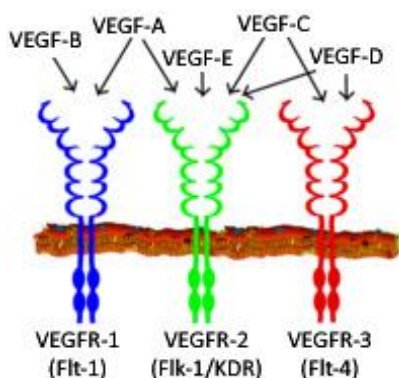
Jedan od najbitnijih faktora koji regulišu formiranje sudova tokom embrionskog razvoja, zarastanja rana i održavanja homeostaze vaskulature kod odraslih organizama je vaskularni endotelni faktor rasta-VEGF (od engl. Vascular endothelial growth factor). Ovaj protein je identifikovan pre više od 30 godina, kada mu je pripisana važna uloga u regulaciji fiziologije endotelnih ćelija, kao i uloga u permeabilizaciji vaskulature, pa je u isto vreme označen i kao VPF (od engl. Vascular permeability factor), (Senger i sar., 1983; Senger i sar., 1986). Sada se zna da VEGF (VPF) pripada familiji polipeptidnih faktora rasta (VEGF familija), koje kodira nekoliko gena. Članovi VEGF familije proteina specifično interaguju sa odgovarajućim receptorima na prekursorskim i zrelim

endotelnim ćelijama i tako aktiviraju signalne puteve kojima regulišu angiogenezu i limfangiogenezu.

1.6. Osnovne karakteristike VEGF familije proteina

VEGF polipeptidi pripadaju PDGF familiji faktora rasta. To su sekretorni, dimerni Cys-vezani glikoproteini približne mase 40kDa. Kod sisara, VEGF familiju čini 5 članova: VEGF-A, -B, -C, -D (Tammela i sar., 2005) i placentalni faktor rasta (“PLGF-placental growth factor”) (Maglione i sar., 1991). Strukturni srodnici VEGF-A su i VEGF-E, kodiran od strane pox virusa Orf familije (Meyer i sar., 1999; Ogawa i sar., 1998) i VEGF-F izolovan iz zmijskog otrova (Takahashi i sar., 2004).

VEGF-A, -B i PLGF se vezuju za VEGFreceptor-1 (VEGFR-1), VEGF-A i -E za VEGFR-2, a VEGF-C i -D za VEGFR-3. Proteolitičkim procesovanjem VEGF-C i -D omogućava se vezivanje za VEGFR-2, ali sa slabijim afinitetom nego za VEGFR-3 (Takahashi i Shibuya, 2005).



Slika 11. Šematski prikaz vezivanja VEGF proteina za VEGF receptore. Preuzeto sa internet adrese <http://upload.wikimedia.org>

1.6.1. VEGF-A

Najizučavaniji član familije VEGF proteina je VEGF-A, koji se prvobitno označavao samo kao VEGF. VEGF-A aktivira signalne puteve preko VEGF receptora-2 (VEGFR-2) i reguliše morfogenezu sudova preko VEGFR-1. Dakle, VEGF-A promoviše proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija krvnih sudova.

Kristalografska struktura VEGF-A otkriva 2 monomera koja su organizovana anti-paralelno da bi formirali dimer sa receptor-vezujućim mestom na svakom polu od

dimera (Muller i sar., 1997). VEGF-A gen organizovan je u osam egzona, koji su podeljeni sa sedam introna, a lociran je na hromozomu 6p21.3 (Houck i sar., 1991).

VEGF-A gen može da da nekoliko različitih iRNK transkripata koji se razlikuju u proteinskim produktima koje kodiraju (Houck i sar., 1992). Ovi različiti transkripti se razlikuju u signalnim karakteristikama (Robinson i Stringer, 2001), a nastaju mehanizmom alternativnog splajsovanja (Smith i sar., 1989), pri čemu je količina različitih transkripata nejednaka, i zavisi od ispitivanog tkiva (Bacic i sar., 1995). Najučestaliji VEGF-A transkripti pronađeni u humanim odraslim tkivima kodiraju proteine od: 121, 165 i 189 aminokiselinskih ostataka (Berkman i sar., 1993). Identifikovane su i druge ređe varijante od 145 i 206 aminokiselinskih ostataka, ali su ove forme pronađene samo u nekim tkivima, pretežno u fetalnim organima (Houck i sar., 1991), humanoj placenti (Cheung i sar., 1995) i humanim endometrijalnim karcinomskim ćelijama (Charnock-Jones i sar., 1993).

Na ekspresiju VEGF-A gena utiču hipoksija, faktori rasta i citokini: epidermalni faktor rasta -EGF, transformišući faktor rasta-TGF- β , interleukin-beta (Takahashi i Shibuya, 2005).

1.6.2. VEGF-B

VEGF-B protein rasprostranjen je u mnogim tkivima, a u najvećoj količini eksprimiran je u srčanom tkivu i skeletnim mišićima (Olofsson i sar., 1999).

Humani VEGF-B ima dve izoforme nastale alternativnim splajsovanjem: proteini od 167 i 186 aminokiselinska ostataka. VEGF-B izoforme vezuju i aktiviraju VEGF R-1. Uloge VEGF-B proteina u angiogenezi i razvoju kardiovaskularnog sistema nisu dovoljno jasne. Studije na miševima deficijentnim za VEGF-B pokazale su da ovi miševi imaju disfunkcionalne koronarne arterije (Bellomo i sar., 2000). Takođe, kod ovakvih miševa pokazana je uloga VEGF-B u patološkom remodeliranju vaskulature u inflamatornom artritisu (Mould i sar., 2003), ali i uloga u zaštiti moždanog tkiva od ishemičnih stanja (Sun i sar., 2004).

1.6.3. VEGF-C i VEGF-D

VEGF-C protein deli strukturnu homologiju sa VEGF-A proteinom u delu od 30% aminokiselinskog lanca, ali je strukturno srodniji VEGF-D proteinu zahvaljujući ekstenziji i na N-terminalnom i na C-terminalnom kraju lanca, koja nije prisutna kod drugih članova VEGF familije (Lohela i sar., 2003). VEGF-C, kao i VEGF-D, vezuje se za VEGFR-2 i VEGFR-3, koji su eksprimirani na endotelnim ćelijama krvnih (VEGFR-2) i limfnih sudova (VEGFR-3) i imaju mitogeni efekat na ove ćelije. VEGF-C, kao i VEGF-D, sintetišu se u vidu prekursorskih proteina, koji nakon proteolitičkog cepanja generišu forme sa umerenim afinitetom za VEGFR-3. Sledeći proteolitički korak je potreban da bi nastali finalno procesovani proteini, sa visokim afinitetom za oba receptora, VEGFR-2 i -3 (Lohela i sar., 2003). Pokazano je da prekomerna ekspresija VEGF-C u epidermisu transgenih miševa dovodi do stvaranja limfne vaskulature (Jeltsch i sar., 1997). In vitro, VEGF-C i VEGF-D stimulišu migraciju i mitogenezu endotelnih ćelija. Pokazano je da su oba alela VEGF-C gena neophodna za razvoj limfne vaskulature u fiziološkim uslovima (Karkkainen i sar., 2004).

VEGF-C smatra se parakrinim faktorom esencijalnim za limfangiogenezu, tako da se naziva faktorom rasta limfnih sudova (engl. lymphatic vessel growth factor). Ovi efekti ostvaruju se interakcijom sa VEGFR-3, dok u interakciji sa VEGFR-2 utiče na endotelne ćelije krvnih sudova.

1.7. VEGF receptori: struktura, distribucija i uloga

Receptori za VEGF proteine (VEGFR) su članovi superfamilije receptora tirozin kinaza (RTK). VEGFR se sastoji od ekstraćelijskog domena (750 aminokiselinskih ostataka), koji je organizovan u 7 imunoglobulinu(Ig)-sličnih sekvenci. Na ekstraćelijski domen se nadovezuje transmembranski domen, potom "juxtamembrane" domen (podeljeni tirozin kinazni domen koji je prekinut sa 70-aminokiselinskim kinaznim insertom) i na kraju C-terminalni domen (Christinger i sar., 2004).

Mutacione analize ekstraćelijskog domena VEGFR-1 i -2 pokazuju da drugi i treći Ig-sličan domen formira visoko-afinitetno vezujuće mesto za VEGF proteine, dok prvi Ig-

sličan domen reguliše vezivanje liganda, a četvrti Ig-sličan domen dimerizaciju receptora (Davis-Smyth i sar., 1998; Fuh i sar., 1998).

Iako je primarna uloga VEGF/VEGFR sistema u vaskulaturi, otkrivena je ekspresija VEGFR i u ne-endotelnim ćelijama. Ovi receptori su eksprimirani na površini mnogih ćelija koje su poreklom iz koštane srži, kao što su hematopojetične ćelije (Kabrun i sar., 1997), takođe na makrofagama i na glatko-mišićnim ćelijama (Ishida i sar., 2001).

Receptori tirozin kinaza (RTK) se aktiviraju nakon ligandom posredovane dimerizacije receptora (Hubbard, 1999; Jiang i Hunter, 1999) što vodi strukturnim promenama koje se prenose na intraćelijski kinazni domen nakon rearanžmana transmembranskog i jukstamembranskog domena (Bell i sar., 2000). Sva tri VEGF receptora sadrže tirozin-fosforilišuća mesta koja zapravo imaju ili regulatornu ili signalnu funkciju. Dok fosforilišuća mesta jukstamembranskog i manjeg reznja kinaznog domena uglavnom utiču na moduliranje strukture receptora i kinazne aktivnosti, drugi predstavljaju mesto uglavljanja (ukotljavanja) signalnih molekula koji sadrže SH2-domene.

1.7.1. VEGF receptor-1

VEGF receptor-1 (VEGFR1) je 180-kDa težak glikoprotein, koji reguliše morfogenezu krvnih sudova. Neophodan je tokom embriogeneze za normalni razvoj krvnih sudova (Fong i sar., 1995).

Nizvodni signalni put aktiviran VEGFR-1 nije potpuno okarakterisan i samo mali proliferativni i migratorni efekat endotelnih ćelija je posredovan ovim receptorom. Funkcija VEGFR-1 je najbolje utvrđena kod migracije i diferencijacije monocita (Barleon i sar., 1996) regrutovanja progenitorskih endotelnih ćelija iz koštane srži (Carmeliet i Luttun, 2001) migracije i invazije karcinomskih ćelija (Wey i sar., 2001) i kod adhezija „natural killer” ćelija za endotelne ćelije (Chen i sar., 2002).

1.7.2. VEGF receptor-2

EGF receptor-2 (VEGFR-2) je 200 kDa težak glikoprotein, eksprimiran na hematopojetičnim i endotelnim ćelijama i glavni je receptor za prenošenje angiogenetskog signala (Kabrun i sar., 1997).

VEGFR-2 promoviše diferencijaciju, proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, ali i permeabilnost i dilataciju krvnih sudova. VEGF-posredovana proliferacija endotelnih ćelija zavisi od aktivacije različitih puteva nizvodno od VEGFR-2. Slično kao i drugi članovi RTK familije, VEGFR-2 aktivira Ras-zavisne signalne kaskade (Meadows i sar., 2001).

VEGFR-2 takođe reguliše organizaciju citoskeleta i ćelijsku migraciju (Abedi i Zachary, 1997).

Nakon interakcije sa ligandom, VEGFR-2 štiti endotelnu ćeliju od apoptoze *in vitro* i *in vivo*, tj. utiče na preživljavanje novoformiranih endotelnih ćelija. Pokazano je da je VEGF-A, ligand za VEGFR-2, neophodan za preživljavanje endotelnih ćelija i razvoj krvnih sudova u ranom postnatalnom životu (Gerber i sar., 1999).

1.7.2. VEGF receptor-3

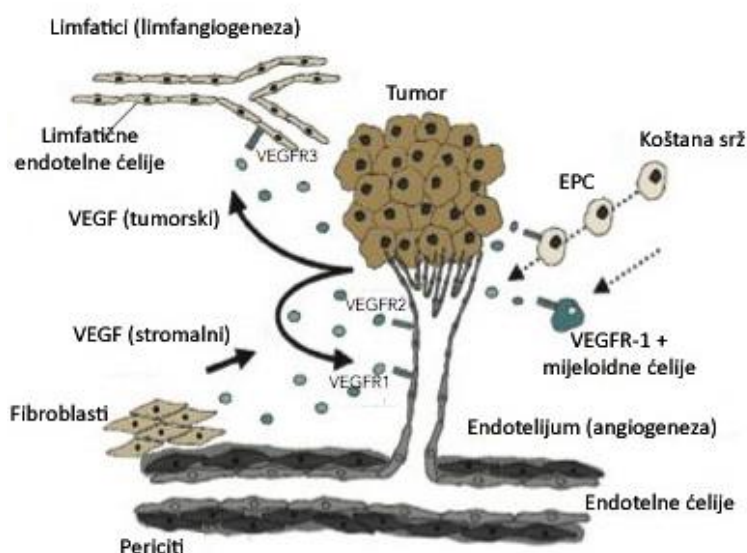
VEGF receptor-3 (VEGFR-3) nakon vezivanja liganda (VEGF-C) reguliše limfangiogenezu.

VEGFR-3 protein se sintetiše kao 175 kDa težak prekursor, koji se sastoji od sedam Ig-sličnih domena, transmembranskog i intraćelijskog kinaznog domena. Protein se proteolitički procesuje na petom Ig domenu dajući 125- i 75-kDa lance koji su spojeni disulfidnim mostom (Pajusola i sar., 1993). Ekspresija ovog receptora počinje tokom razvoja u svim embrionskim endotelnim ćelijama (Jussila i Alitalo, 2002). U adultnom organizmu, ekspresija VEGFR-3 ograničena je na endotelne ćelije limfnih sudova. VEGF-C i VEGF-D-3 aktiviraju ove receptore, a proteolitičko procesovanje ovih liganada omogućava njihovo vezivanje i za VEGFR-2, ali sa manjim afinitetom nego za VEGFR-3. Takođe je uočeno stvaranje heterodimera između VEGFR-2 i -3 u limfnim endotelnim ćelijama proširujući repertoar signalnih puteva aktiviranih ovim receptorima (Dixelius i sar., 2003; Mäkinen i sar., 2001).

1.8. Mehanizam angiogeneze u tumorima

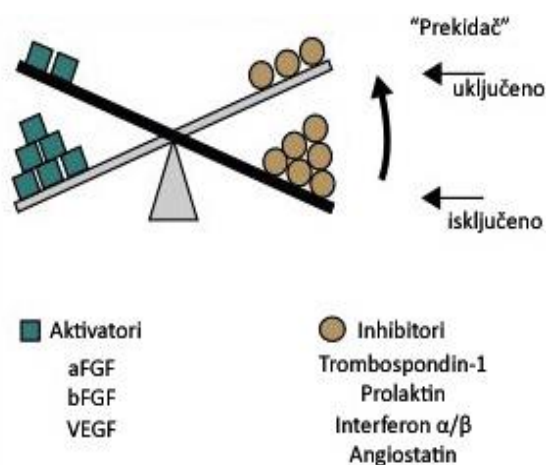
Angiogeneza je proces koji se u fiziološkim i patofiziološkim uslovima sastoji od više koraka i uključuje i endotelne ćelije i ekstraćelijski matriks (Risau, 1997). U tumorskom tkivu ovaj proces uključuje interakciju tumorskih ćelija, endotelnih ćelija, makrofaga, fibroblasta i ekstraćelijskog matriksa. Nakon vezivanja stimulatornih signala (npr. VEGF proteini, produkovani u tumorskim ćelijama), za odgovarajuće receptore na endotelnim ćelijama, ove ćelije otpuštaju proteaze, što vodi degradaciji ekstraćelijskog matriksa koji okružuje krvni sud (Bicknell, 1997), i dalje migraciji i proliferaciji endotelnih ćelija.

Angiogeneza je regulisana faktorima koji podstiču ili inhibiraju ovaj process (**Slika 12**).



Slika 12. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF,) kojeg sintetišu tumorske ćelije ili susedne stromalne ćelije, stimuliše VEGFR-1, -2, -3 koji su eksprimirani na endotelnim i hematopojetičnim ćelijama. Stimulacija VEGFR-1 i -2 aktivira proliferaciju, migraciju, preživljavanje i vaskularnu propustljivost, kao i regrutovanje progenitorskih (EPC) i VEGFR-1 + mijeloidnih ćelija u koštanoj srži do mesta tumorske neovaskularizacije. Preuzeto sa internet adrese <http://www.avastin.net>

U endokrinim organima, koji su značajno vaskularizovani, negativni regulatori angiogeneze koji održavaju endotel u proliferativno mirnom stanju su bitni isto koliko i pojačani induktori angiogeneze, tako da je smanjenje u produkciji inhibitora neophodno za aktiviranje angiogenetskog prekidača (Hanahan i Folkman, 1996).



Slika 13. Odnos proangiogenetskih i antiangiogenetskih faktora reguliše "angiogenetski prekidač". Preuzeto sa internet adrese <http://www.nature.com>

Aktivna angiogeneza se pokazala kao bitan proces kod tumorskog rasta, progresije i širenja. Još sedamdesetih godina prošlog veka Folkman i saradnici (Folkman, 1972) izneli su koncept po kome solidni tumori veličine nekoliko milimetara za dalji rast zahtevaju odgovarajuće povećanje vaskulature. U mnogim humanim tumorima pokazalo se da je povećana angiogeneza u korelaciji sa agresivnijim ponašanjem tumora. Tako je npr. u karcinomu dojke povećana angiogeneza (merena gustinom mikrosudova u tumorskom tkivu) udružena sa razvojem metastaza, lošom prognozom i smanjenim preživljavanjem (Weidner i sar., 1991). S druge strane, inhibitori angiogeneze kao što su angiostatin ili endostatin smanjuju tumorski rast ukoliko se daju u ranoj fazi, sugerišući da je povećana angiogeneza bitna u tumorskoj progresiji (Bergers i sar., 1999).

1.9. Angiogeneza u tumorima štitaste žlezde

Proces angiogeneze je malo izučavan u tumorima štitaste žlezde, za razliku od drugih humanih tumora, gde su VEGF/VEGF-receptorni sistem (ligandi i njihovi receptori na endotelnim ćelijama), signalni mehanizmi koje aktivacija receptora pokreće, kao i patobiološki efekti ovih događaja više izučavani.

Angiogeneza u tiroidnim tumorima izučavana je analizom ekspresije iRNK transkripata VEGF gena (VEGF-A) i analizom sintetisanog VEGF-A proteina u spektru tiroidnih

neoplastičnih lezija (Zhang i sar., 2009). Ovi rezultati su pokazali da normalno tkivo ne ekspresira VEGF, ali se njegova ekspresija na nivou iRNK i proteina postepeno povećava od neoplastičnih ne-malignih lezija, preko dobro diferenciranih karcinoma (papilarni i folikularni), do anaplastičnog (nediferenciranog) karcinoma, gde su ekspresioni nivoi VEGF proteina imali najviše nivoe. Ekspresija VEGF proteina bila je u korelaciji sa kliničko-patološkim pokazateljima agresivnosti karcinoma (prisustvo metastaza, uznapredovali tumorski stadijum, nediferenciran histotip). Ovi rezultati su sugerisali da visoka ekspresija VEGF proteina nije dobar prognostički znak za tiroidno-onkološke pacijente i takođe potkrepili stanovište da je za razvoj i progresiju tumora neophodno formiranje dodatne krvne vaskulature, koja će obezbediti nutritivno snabdevanje tumorskih ćelija, kao i da je visoka ekspresija VEGF proteina uključena u tumorsku angiogenezu.

Polazeći od činjenice da papilarni karcinomi štitaste žlezde imaju tendenciju širenja limfnim putevima, tj. metastaziraju u regionalne limfne čvorove, a da folikularni karcinomi metastaziraju hematogeno dajući udaljene metastaze (Fellmer i sar., 1999) ispitali su ekspresiju VEGF-C proteina in situ hibridizacijom u papilarnom i folikularnom karcinomu štitaste žlezde. Njihovi rezultati su pokazali ekspresiju VEGF-C u tkivu papilarnog, ali ne i folikularnog karcinoma, sugerišući da VEGF-C (koji se smatra parakrinim faktorom esencijalnim za limfangiogenezu, ali ne i za angiogenezu krvnih sudova), ima ulogu u determinaciji limfno-metastatskog fenotipa tiroidnih tumora.

Nakon ovih rezultata, veza između VEGF-C ekspresije, tumorske limfangiogeneze i formiranja metastaza u limfnim čvorovima, postala je predmet interesovanja i drugih istraživača.

Nalaz više ekspresije VEGF-C u primarnim tumorima pacijenata sa papilarnim karcinomom koji imaju prisutne limfne metastaze, u poređenju sa tumorima bez metastaza potvrdilo je više istraživačkih timova (Bunone i sar., 1999; Tanaka i sar., 2002). U ovakvim tumorima nađena je i povećana gustina limfnih sudova („lymph vessel density“) i u tumorskom i u peritumorskom tkivu, što upućuje na limfangiogeni ulogu VEGF-C, koju ovaj protein ostvaruje aktiviranjem VEGF-3 receptora na endotelnim ćelijama limfnih sudova (Yu i sar., 2005).

U isto vreme, ovi rezultati otvorili su pitanje mogućnosti korišćenja evaluacije VEGF-C ekspresije u predikciji metastatskog kapaciteta papilarnog karcinoma.

Uprkos kontinuiranoj akumulaciji korelativnih kliničkih podataka, funkcionalna uloga VEGF-C u tumorskoj limfangiogenezi, kao i u formiranju metastaza u limfnim čvorovima, nije još objašnjena do kraja.

Siironen i saradnici (Siironen i sar., 2006) našli su veće ekspresione nivoe VEGF-C kod starijih pacijenata sa papilarnim karcinomom i prisutnim metastazama, nego kod mlađih pacijenata sa takođe prisutnim metastazama. Ovi autori predložili su zanimljivu hipotezu: kod starijih pacijenata VEGF-C ne promoviše formiranje limfnih metastaza, nego indukuje diseminaciju malignih ćelija kroz limfne čvorove u druge organe.

S obzirom da VEGF-C protein aktivira receptore eksprimirane na endotelnim ćelijama limfnih sudova (VEGFR-3), ali da sa slabijim afinitetom može da se vezuje i aktivira i receptor VEGFR-2 na endotelnim ćelijama krvnih sudova, uloga ovog angiogenog faktora u tiroidnoj tumorogenezi i progresiji tiroidnih tumora nije dovoljno jasna.

Najnoviji podaci u ovoj oblasti (Salajegheh i sar., 2013) pokazali su korelaciju ekspresije VEGF-A i VEGF-C na nivou genskih transkripata i proteina u tiroidnim karcinomima, kao i njihovu korelaciju sa metastatskim statusom tumora i postavili novu hipotezu o „ko-regulatornom“ potencijalu VEGF-A i VEGF-C, tj. njihovim interakcijama tokom tumorske progresije.

Dakle, dosadašnji literaturni podaci ukazuju da formiranje novih krvnih i limfnih sudova ima važnu ulogu u razvoju i progresiji tumora štitaste žlezde, kao i determinaciji njihovog metastatskog fenotipa, a time i kliničkog toka tumorske bolesti.

Dalja istraživanja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi angiogeneze i limfangiogeneze u tiroidnim tumorima, neophodna su da bi se identifikovala ciljna mesta za molekularnu terapiju usmerenu ka inhibiciji angiogenetskih faktora pokrenutih malignom transformacijom ćelije štitaste žlezde.

2. CILJ

Progresija malignih tumora štitaste žlezde od dobro diferenciranih (papilarni karcinom) u nediferencirane, agresivne forme (anaplastični karcinom) praćena je različitim promenama na molekularnom nivou, koje omogućavaju malignoj ćeliji kontinuiranu aberantnu stimulaciju rasta i izbegavanje apoptotske smrti, što uz neoangiogenezu (formiranje novih krvnih i limfnih sudova) predstavlja preduslove tumorskog rasta i širenja.

Predmet i cilj ovog rada je izučavanje molekularnih promena koje prate dediferencijaciju papilarnog u anaplastični karcinom štitaste žlezde, tj. ispitivanje promena ekspresionih profila apoptotskih molekula (Bcl-2, Bax, survivin) i limfangiogenog faktora (VEGF-C), njihova uloga u biologiji tumora i korelacija sa kliničkim parametrima tokom progresije maligniteta tumora štitaste žlezde.

Na osnovu postavljenih ciljeva planirani su sledeći istraživački zadaci:

- imunohistohemijska analiza ekspresionih profila apoptotskih molekula Bcl-2 familije, koja je operativna na mitohondrijalnom delu apoptotske signalne kaskade (Bcl-2, anti-apoptotski molekul i Bax, pro-apoptotski molekul) i analiza promena u njihovim međusobnim odnosima tokom progresije maligniteta od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde
- imunohistohemijska ekspresija survivina, člana IAP (Inhibitor of apoptosis proteins) familije, koji je operativan nizvodno od Bax-a, (na nivou aktivacije kaspaza, proteolitičkih enzima) uporedno u papilarnom i anaplastičnom karcinomu
- analiza međusobnih odnosa ekspresionih profila apoptotskih molekula Bcl-2 familije i survivina tokom progresije maligniteta
- *in situ* detekcija stepena apoptotske smrti ćelija TUNEL metodom (čiji je princip detekcija dvolančanih prekida DNK molekula tokom apoptotske smrti) u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde u korelaciji sa ekspresijom apoptotskih molekula
- korelacija imunohistohemijske ekspresije apoptotskih molekula sa kliničkim parametrima koji su vezani za agresivno biološko i kliničko ponašanje tiroidnih

karcinoma (prisustvo limfnih metastaza, ekstratiroidna invazija, uznapredovali stadijum tumorske bolesti: stadijum I/II vs. stadijum III/IV)

- uporedna analiza ekspresije VEGF-C (limfangiogeni faktor) u papilarnom i anaplastičnom karcinomu u korelaciji sa kliničkim parametrima
- analiza ekspresije survivina i VEGF-C proteina u malignom i nemalignom tkivu imunohistohemijskom metodom i imunoblotom
- uporedna analiza ekspresije survivina i VEGF-C u tkivu primarnog tumora papilarnog karcinoma i u pripadajućem metastatskom tkivu (metastaza u limfnom čvoru) istog pacijenta, da bi se dobio uvid u ekspresione promene ovih molekula i analizirala njihova moguća sinhronizovana ekspresija tokom metastatskog procesa.

Istraživanja predviđena izradom ove doktorske disertacije, kao i slična istraživanja u svetu, trebala bi da budu most između osnovnih istraživanja na molekularnom nivou i njihove primene u tiroidnoj onkologiji.

Bolje razumevanje molekularne patogeneze razvoja i progresije tiroidnih tumora otvoriće mogućnosti za razvoj i primenu uspešnijih i optimalnijih terapijskih postupaka u lečenju malignih oboljenja štitaste žlezde, u kojima će indukcija apoptotske smrti i inhibicija angiogeneze sigurno biti integralni deo.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Reagensi

a) Za imunohistohemijsku analizu i imunoblot analizu odabranih proteina korišćena su sledeća komercijalno dostupna antitela i kompleti reagenasa:

- Monoklonsko antitelo koje specifično prepoznaje Bcl-2 (klon Bcl 2-100, Sigma, Germany)
- Zečje poliklonsko antitelo prema Bax (Dako, Carpinteria, California, USA)
- Monoklonsko antitelo koje specifično prepoznaje survivin (clone EP2880Y, Abcam plc, Cambridge, UK)
- Zečje poliklonsko antitelo prema VEGF-C (Abcam plc, Cambridge, UK)
- Sekundarno biotinilizovano antitelo, konjski anti-mišji IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Sekundarno biotinilizovano antitelo, kozji anti-zečji IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- DAB: 3,3'-diaminobenzidinhidrohlorid (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- ABC: Vectastain Avidin-biotin complex kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- BCA: Bicinchoninic acid kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)
- ECL: Enzyme chemoluminescence kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)
- ColourBurst™ Electrophoresis standard, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA.

b) Za in situ detekciju apoptotske smrti u tkivnim odsečcima korišćen je:

- TASCTM TdT Kit: TdT In Situ Apoptosis Detection Kit (R&D Systems Europe, Ltd. 19 Barton Lane Abington Science Park, Abington, OX 14 3NB, United Kingdom)

c) Za imunoblot analizu, kao čvrsta faza korišćeno je sledeće:

- Nitrocelulozna membrana (GE Healthcare Life Sciences, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- PVDF membrana (Millipore, Billerica, MA, USA)
- KODAK Medicinski rendgenski film (Carestream Health, Inc. 150 Verona Street, Rochester, N.Y 14608 USA)

3.1.2. Klinički materijal

U radu su korišćeni uzorci tkiva štitaste žlezde pacijenata koji su podvrgnuti hirurškom zahvatu zbog sumnje na malignitet u periodu od 1996. do 2012.godine. Pacijenti su operisani u Centru za endokrinu hirurgiju, Instituta za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije, Beograd. Na Odeljenju za endokrinu i kardiovaskularnu patologiju odstranjeno tumorsko tkivo je fiksirano u formalinu i ukalupljeno u parafin, čime se dobijaju trajni histološki preparati i nakon patohistološke analize odlažu kao arhivski materijal. Patohistološka analiza i postavljanje dijagnoze obavljena je od strane patologa, a u skladu sa kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2004); (DeLellis i sar., 2004).

Iz arhivskog materijala odabrana su tkiva pacijenata sa dijagnozom papilarnog karcinoma i dijagnozom anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde.

Radi poređenja ekspresije analiziranih proteina u tumoru i metastatskom tkivu, iz arhivskog materijala prikupljena su i metastatska tkiva (ukalupljene metastaze u limfnim čvorovima) sparene sa tkivom primarnog tumora istog pacijenta.

Arhivski klinički materijal (tkivo fiksirano u formalinu i ukalupljeno u parafin), nakon sečenja na mikrotomu na rezove debljine 4-5 μm i fiksiranja na mikroskopske pločice, korišćen je za imunohistohemijsku analizu i *in situ* detekciju apoptotske smrti.

Tačan broj uzoraka koji je korišćen u pojedinim eksperimentima dat je uz konkretne tabele u sekciji Rezultati.

U drugom delu studije kao polazni materijal korišćeno je sveže tiroidno tkivo dobijeno nakon operacije pacijenata sa malignim tumorom štitaste žlezde. Uz tumorsko tkivo preuzimali smo i deo zdravog ili hiperplastičnog tkiva odstranjenog uz primarni tumor. Sveže tiroidno tkivo je podeljeno u više delova i odmah zamrznuto u tečnom azotu i čuvano na -80°C do upotrebe.

Sveže tiroidno tkivo korišćeno je za imunoblot analize.

Takođe su prikupljeni i svi dostupni podaci o ličnim i kliničko-patološkim parametrima pacijenata: starost, pol, veličina tumora, histološki tip, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima/broj izolovanih limfnih čvorova, prisustvo ekstratiroidne invazije.

Svi slučajevi su klasifikovani prema stadijumu bolesti (stadijumi I-IV) na osnovu TNM klasifikacije tiroidnih tumora (UICC, 2002) što je detaljnije objašnjeno u sekciji UVOD- 1.2.4.

Klinički materijal (post-operativno dostupna tkiva) i podaci o pacijentima sakupljeni su sa dozvolom Etičkog komiteta Centra za endokrinu hirurgiju Kliničkog centra Srbije, Beograd, uz pismenu saglasnost obolelih.

3.2. METODE

3.2.1. Detekcija ekspresije proteina imunohistohemijskom metodom

Imunohistohemijskom metodom smo u uzorcima malignog tkiva štitaste žlezde analizirali prisustvo ili odsustvo traženih antigena, kao i njihovu unutarćelijsku lokalizaciju.

Princip metode

ABC sistem (Avidin-Biotin-Complex) je široko prihvaćena i jedna od najpouzdanijih danas dostupnih imunohistohemijskih metoda (Hsu i Raine, 1981). To je trostepena metoda u kojoj je osetljivost povećana zahvaljujući trećoj komponenti-kompleksu avidina i biotina. Nakon vezivanja primarnog antitela za antigen, u sistem se ubacuje sekundarno antitelo obeleženo peroksidazom i konjugovano biotinom, za koji se dalje

vezuje makromolekulski kompleks avidina i biotinilovane peroksidaze iz rena. S obzirom da avidin poseduje visoki afinitet i četiri vezujuća mesta za vitamin biotin, ova metoda pojačava signal i omogućava veću specifičnost i osetljivost, pri čemu se održava postojanost signala zahvaljujući ireverzibilnoj interakciji između avidina i biotina. Na kraju se dodaje hromogen DAB (3,3'-diaminobenzidinhidrohlorid) koji u prisustvu vodonik peroksida prelazi u nerastvoran proizvod braon boje.

Postupak

Mikroskopske pločice sa parafinskim odsečcima fiksiranog tkiva se deparafinizuju u ksilolu 5 do 10 minuta, a potom prebace u čist ksilol još 5-10 min.

Rezovi se potom rehidrišu u apsolutnom etanolu, pri čemu se postupak ponavlja još jednom.

Blokiranje endogene peroksidaze se odvija inkubiranjem rezova u 0.3% H₂O₂ u etanolu tokom 30 min.

Nakon toga sledi trostepeno ispiranje 3 u PBS-u (0.05 M natrijum fosfatni pufer i 0.14 M NaCl, pH=7.4).

Nespecifično vezivanje se blokira inkubacijom odsečaka sa neimunizovanim konjskim serumom tokom 20 min.

Inkubacija sa primarnim antitelom (u sledećim razblaženjima u PBS-u: 1:200 za Bcl-2, 1:25 za Bax, 1:300 za survivin, 1:50 za VEGF-C) se vrši preko noći na 4°C, nakon čega sledi inkubacija sa biotinilizovanim sekundarnim antitelom u razblaženju 1:200 u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi.

Signal se pojačava inkubacijom u ABC reagensu 30 minuta, pri čemu slede tri sukcesivna ispiranja u PBS-u, zatim desetominutna inkubacija sa DAB-om na sobnoj temperaturi, posle čega sledi ispiranje pod mlazom česmenske vode.

Kontrastno bojenje se vrši hematoksilinom do pojave plave boje na rezu, iza čega sledi ponovno ispiranje pod mlazom česmenske vode.

Potom sledi postepena dehidratacija rezova u rastućim koncentracijama etanola (70% do 100%), inkubiranje dva puta u ksilolu i montiranje VectaMount Permanent Mounting gelom (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i pokrovnim stakalcima.

Po završetku bojenja preparati su analizirani pod svetlosnim mikroskopom Axio Imager 1.0 Carl Zeiss, koji je povezan sa automatskim kamera sistemom za fotografisanje (Canon PowerShot A640 camera).

U cilju provere specifičnosti signala, kontrolni odsecci su inkubirani sa PBS-om umesto primarnih antitela, pri čemu se ti odsecci nisu bojili. Ovo ukazuje da se u odsustvu primarnih antitela ostale komponente unete u sistem ne vezuju za tkivnu strukturu, a takođe ukazuje i na specifičnost reakcije između primarnog antitela i traženog antigena.

Ocenjivanje intenziteta imunohistohemijskog bojenja

Rezultati imunohistohemijskog bojenja su ocenjivani nezavisno od strane dva istraživača, nakon čega su finalno usaglašeni rezultati. Imunoreaktivnost je određivana semikvantitativno, kombinovanom ocenom procenta obojenih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija i intenzitet obojenosti.

Citoplazmatsko bojenje za Bcl-2, Bax, survivin i VEGF-C protein je ocenjivano na sledeći način:

0 - Odsustvo bojenja

1 - Slabo difuzno ili fokalno bojenje (do 40%)

2 - Umereno bojenje u više od 40% tumorskih ćelija

3 - Intenzivno bojenje u više od 40% tumorskih ćelija

3.2.2. In situ detekcija apoptoze TUNEL-kitom (TdT In Situ Apoptosis Detection Kit)

Princip metode

Za *in situ* detekciju apoptotskih ćelija koristili smo tzv. TUNEL metodu (terminal-mediated deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end- labeling), koja omogućava da se ćelije koje su podlegle apoptozi detektuju na osnovu dvolančanih prekida DNK u tim ćelijama.

Metoda se zasniva na karakteristici apoptotske ćelije da degraduje sopstvene DNK molekule. Ovaj proces otpočinje nastajanjem velikih fragmenata DNK od 300 kb i 500 kb, koji se produkuju endonukleaznom degradacijom hromatinskih strukturnih organizacija. Međutim, aktivacija Ca^{2+} i Mg^{2+} -zavisnih endonukleaza, ove velike

fragmente dodatno skraćuje isecajući DNK na "linker" regionima između nukleozoma. Konačni DNK fragmenti su multimeri od oko 180 bp. Da bi dvolančani prekidi bili dostupni za detekciju, ćelijska membrana se permeabilizuje proteinazom K ili citonin reagensom (citonin je optimizovan za permeabilizaciju ćelija, a proteinaza K za permeabilizaciju tkiva). S obzirom da je ovo peroksidazna metoda (tj. u detekcioni sistem je uključen enzim-peroksidaza), neophodno je da se endogene peroksidaze inhibiraju povećanom koncentracijom vodonik peroksida, kako se ne bi dobio lažno pozitivan odgovor. Dvolančani prekidi se detektuju enzimskim obeležavanjem slobodnog 3'-OH terminalnog kraja modifikovanim nukleotidima. Modifikovani nukleotidi su zapravo biotinilizovani nukleotidi koji se vezuju za 3'-OH kraj DNK fragmenta pomoću terminalne deoksinukleotidil transferaze (TdT), a detektuju se streptavidin-peroksidaznim konjugatom i hromogenom (DAB). Ovi novi krajevi DNK koji su generisani nakon fragmentacije su lokalizovani u morfološki uočljivom jedru i apoptotskim telašcima. Za razliku od apoptotskog jedra, normalna ili proliferativna jedra imaju beznačajan broj slobodnih 3'-OH krajeva, i oni se obično ne detektuju kitom. Hemijskim agensima indukovano oštećenje DNK se ne identifikuje TUNEL-metodom, ukoliko ono nije kuplovano sa apoptotskim odgovorom. Ovom tehnikom se mogu detektovati rani stupnjevi apoptoze u sistemu u kojem je otpočela kondenzacija hromatinskog materijala, kao i lančani prekidi koji ne moraju biti znatni, čak i pre nego što jedro podlegne velikim morfološkim promenama.

Postupak

Tkivni rezovi na pločicama su grejani 1h na 57°C u inkubatoru radi otapanja parafina, nakon čega je usledila dalja deparafinizacija inkubiranjem dva puta po 10 min u ksilolu. Preparati su rehidratirani dva puta u apsolutnom alkoholu, i jednom u 70% alkoholu, sa vremenom inkubacije od po 5 min.

Potom je usledilo ispiranje u dH₂O, dva puta po dva minuta, i ispiranje u puferu (PBS, 0.05M natrijum fosfatni pufer-0.14M NaCl, pH=7.4), 10 min na sobnoj temperaturi.

Tkivni isečci se zatim permeabilišu rastvorom proteinaze K (razblaženje 1:50 sa dH₂O) tokom 45 min na 37°C u vlažnoj komori, a potom ispiraju dva puta po 2 min u dH₂O.

Za pozitivnu kontrolu, koju smo svaki put u eksperimentu koristili, vršili smo isecanje dvolančane DNK nukleazama. U ovom koraku se dodaje rastvor TASC-nukleaze

(razblaženje 1:50 sa TASC nukleaznim puferom) i inkubira na 37°C tokom 25 min u vlažnoj komori.

Uzorak se nakon tretmana ispira PBS-om kako bi se reakcija zaustavila.

Kontrola tretirana nukleazama zapravo potvrđuje uspešnost permeabilizacije i reakcije obeležavanja, ali i daje informaciju o optimizaciji uslova postupka obeležavanja i bojenja. Većina ćelija kontrolnog uzorka bi trebalo da pokaže blede braon jedarno bojenje, koje je bleđe od bojenja pravih apoptotskih ćelija. Razlog ovome je razlika u hromatinskoj strukturi između ćelija tretiranih nukleazama i apoptotskih ćelija analiziranog tkiva.

U sledećem koraku se inhibiraju endogene peroksidaze 30% rastvorom H_2O_2 u metanolu; razblaženje 1:10) u kadici tokom 4 minuta na sobnoj temperaturi. Vremenski interval inkubiranja uzoraka sa rastvorom za gašenje treba poštovati iz razloga što prekovremenim inkubiranjem može doći do uništavanja DNK molekula i njegovog isecanja, što može dati lažno pozitivne rezultate.

Potom sledi jednominutno ispiranje u PBS-u, nakon čega ide inkubacija u kadici sa TdT puferom za obeležavanje (obezbeđen kitom) tokom 5 minuta, a onda i obeležavanje dvolančanih prekida reagensom za obeležavanje koji sadrži: smeša TdT dNTP, divalentne katjone (Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} -služe za modulaciju enzimske aktivnosti), TdT enzim, i TdT pufer za obeležavanje, tokom 1h u vlažnoj komori. Sve komponente ovog rastvora su obezbeđene kitom, i redosled dodavanja komponenti treba poštovati kako bi se uspostavila najbolja efikasnost obeležavanja. Postupak dodavanja komponenti se radi na ledu.

Reakcija obeležavanja se zaustavlja puferom za zaustavljanje (stop buffer), na sobnoj temperaturi tokom 5 min, posle čega sledi ispiranje 2 puta po 2 minuta u PBS-u.

Kako bi se detektovali biotinizirani nukleotidi vazani za dvolančane prekide apoptotske DNK, uzorci se inkubiraju sa streptavidin-HRP (streptavidin-horseradish peroxidase) rastvorom (analogno avidin/biotin reakciji u imunohistohemijskoj metodi) na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta.

Iza ovog koraka sledi 2 puta po 2 minuta ispiranje PBS-om, a zatim inkubiranje sa hromogenom (DAB-diaminobenzidin; u razblaženju 1:200 i 30% H_2O_2 u razblaženju

1:1000) tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci ne bi trebalo da se drže duže u rastvoru zbog moguće pojave nespecifičnog bojenja.

Uzorci se zatim ispiraju prvo u dH₂O, a zatim u česmenskoj vodi, po 15 minuta. Kontrastno bojenje se izvodi metil-zelenom bojom ili hematoksilinom 5 sekundi do 5 minuta (interval inkubacije zavisi od tipa tkiva i mora se utvrditi empirijski).

Opet sledi prvo ispiranje u dH₂O, a zatim u česmenskoj vodi.

Uzorci se dehidratiraju inkubacijom u 70% etanolu tokom 5 minuta, a zatim se postupak ponavlja dva puta u apsolutnom etanolu, nakon čega slede dve inkubacije od po 10 minuta u ksilolu.

Uzorci se na kraju montiraju medijumom za montiranje i pokrovnim stakalcima. Rezultati se vizuelizuju koristeći svetlosni mikroskop.

Ocenjivanje stepena apoptotske smrti

Pregledom najmanje pet različitih mikroskopskih polja najvećeg uvećanja (x40) na svetlosnom mikroskopu utvrđen je apoptotski indeks datog tkivnog uzorka izražen kao procenat apoptotskih (TUNEL tehnikom označenih ćelija) u odnosu na ukupan broj ćelija u pregledanim vidnim poljima.

3.2.3. Homogenizacija tkiva štitaste žlezde

Uzorci postoperativnog tkiva mase 0.1 g su homogenizovani na ledu u 1 ml pufera za homogenizaciju (20mM Tris, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 1% nonidet P-40, pH 8) sa dodatkom 10 µl koktela inhibitora proteaza (P8340, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA). Homogenati su centrifugirani na 12000 rpm na 4°C tokom 30 minuta, a supernatant nakon centrifugiranja je alikvotiran i zamrznut do daljeg korišćenja. Koncentracija proteina u homogenatima je određena uz pomoć BCA kita.

3.2.4. Detekcija ekspresije proteina imunoblotom

Priprema uzoraka: 100 µg svakog homogenata (čije su koncentracije prethodno utvrđene BCA kitom) rastvoreno je u istoj zapremini pufera za uzorke (0.125M Tris, 10% SDS, 20% glicerol, 10% β merkaptioetanol) i inkubirano 5 minuta na 100°C. Uz uzorke su nanošeni i proteinski standardi poznatih molekulskih masa (ColourBurstTM Electrophoresis standard, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA). Proteini iz homogenata

su elektroforetski razdvojeni na 10% (za razdvajanje VEGF-C) i 15% (za razdvajanje survivina) poliakrilamidnom gelu sa strujom od 120V, 50 mA , 8W za jedan gel ili 150V, 80mA, 12W za dva gela. Proteini su preneti na nitroceluloznu (za VEGF-C) i PVDF (za survivin) membranu upotrebom polu suvog sistema za transfer uz pufer za blot (25 mM Tris, 152 mM glicin, 20% metanol). Membrana je blokirana inkubacijom u 5% kazeinu u TBST-u (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20, pH 7.4) u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi, a potom inkubirana sa primarnim antitelima na 4°C preko noći uz blago mućkanje. Primarna antitela su rastvorena u 1% kazeinu u TBST-u u razblaženju 1:300 (za VEGF-C) i 1:5000 (za survivin). Nakon inkubacije u sekundarnim antitelima u razblaženju 1:2500 i za anti-mišji i anti-zečji IgG , sledila je inkubacija u ABC reagensu 30 minuta na sobnoj temperaturi. Vizuelizacija signala je vršena na medicinskom rendgenskom filmu ECL kitom. Izmedju svakog koraka vršeno je ispiranje TBST-om 5 puta po 5 minuta.

3.2.5. Kvantifikacija proteinskih traka (denzitometrija)

Razvijeni filmovi sa dobijenim trakama su skenirani i izvršena je kvantifikacija odgovarajućih traka denzitometrijom, uz pomoć TotalLab softvera (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, UK). Za svaki imunoblot korišćen je interni standard poznate molekulske mase (koji je nanošen u istoj koncentraciji kao i uzorci: 100µg). Nakon kvantifikacije traka u gore navedenom programu, vrednosti smo normalizovali u odnosu na interni standard, kako bi smanjili male varijacije tokom razvijanja filma, tako da je konačna vrednost predstavljala količnik denzitometrijskih podataka uzoraka i internog standarda.

3.3. Statističke analize

Statistička analiza je rađena uz pomoć programa SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) za Windows. Vrednost $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom za sva poređenja. Normalnost distribucije podataka je proveravana Kolmogorov-Smirnov testom. Obzirom da grupe podataka nisu pratile normalnu raspodelu, poređene su Mann-Whitney U testom i χ^2 ili Fisher-ovim testom tačne verovatnoće, u zavisnosti od broja analiziranih slučajeva. Koeficijenti korelacije između grupa i njihove statističke

značajnosti su računati Spearman korelacionim testom. Za poređenje denzitometrijskih podataka između tumorskog i peritumorskog uzorka istog pacijenta korišćen je Wicoxon-ov test za vezane uzorke.

4. REZULTATI

4.1. Ekspresija anti-apoptotskog proteina Bcl-2 i pro-apoptotskog proteina Bax u tkivu papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde

U ovom delu ispitivanja analizirali smo imunohistohemijsku ekspresiju molekula koji pripadaju BCL-2 familiji proteina, operativnih u početnom delu signalne kaskade koja reguliše programiranu smrt ćelije (apoptozu). Predstavnici ove familije su Bcl-2 (anti-apoptotski molekul), koji čuva integritet mitohondrijalne membrane i Bax (pro-apoptotski molekul), koji omogućava dezintegraciju mitohondrijalne membrane i time obezbeđuje dalju propagaciju signala koji vodi apoptotskoj smrti ćelije. Promene u odnosu anti-apoptotskih i pro-apoptotskih molekula ukazuju na poremećaje u regulatornim mehanizmima apoptotske smrti.

U ovim ispitivanjima koristili smo arhivski materijal, tj. uzorke malignog tkiva koje je hirurški odstranjeno pacijentima, fiksirano u formalinu i ukalupljeno u parafin, čime su dobijeni trajni tkivni preparati. Ispitivanu seriju predstavljalo je 69 uzoraka tkiva pacijenata sa dijagnozom papilarnog karcinoma (PTC) i 30 uzoraka tkiva pacijenata sa anaplastičnim karcinomom (ATC).

Kliničko-patološki podaci ovih pacijenata, prikupljeni su iz baze podataka Centra za endokrinu hirurgiju Kliničkog centra Srbije i uključili su informacije o godinama i polu, veličini tumora, prisustvu/odsustvu limfnih metastaza i ekstratiroidne invazije, kao i o stadijumu tumorske bolesti, prema TNM klasifikaciji tumora predloženoj od AJCC (American Joint Comitee on Cancer) 2002. godine, koju je usvojila i Svetska zdravstvena organizacija (WHO) 2004. godine. Ovi podaci prikazani su u **Tabeli 1**.

Tabela 1. Kliničko-patološki podaci za 69 slučajeva papilarnog (PTC) i 30 slučajeva anaplastičnog karcinoma štitastе žlezde (ATC).

Kliničko-patološki podaci		PTC (n=69)	ATC (n=30)
Starost (godine)	Srednja vrednost (opseg)	57.42 (20-80)	61.63 (31-85)
	<45	14 (20.29%)	5 (16.67%)
	≥45	55 (79.71%)	25 (83.33%)
Pol	Ž:M	58:11	19:11
LNM	Prisustvo	15 (21.74%)	19 (63.33%)
EI	Prisustvo	18 (26.09%)	23 (76.67%)
Veličina tumora (mm)	Srednja vrednost (opseg)	25.41 (3-100)	63.37 (30-120)
pT	T1a	27	0
	T1b	13	0
	T2	10	1
	T3	2	6
	T4	17	23
pTNM	I	46	0
	II	3	0
	III	7	0
	IV	13	30
Početni stadijumi	I/II	49	0
Uznapredovali stadijumi	III/IV	20	30
LNM: metastaze u limfnim čvorovima			
EI: ekstratiroidna invazija			
pT i pTNM status: prema AJCC (American Joint Committee on Cancer), detaljnije u Materijalu i Metodama			

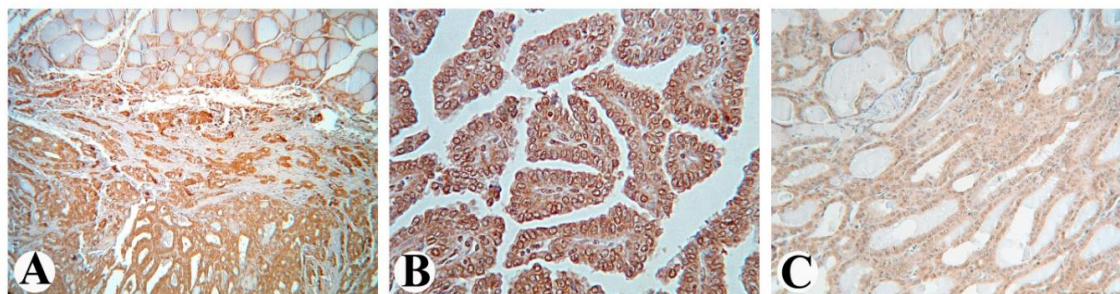
Uzorci malignog tkiva ovih pacijenata analizirani su imunohistohemijskom metodom, uz korišćenje monoklonskih antitela (za Bcl-2) i poliklonskih antitela (za Bax), specifičnih za ove proteine. Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije Bcl-2 proteina u papilarnom i anaplastičnom karcinomu prikazani su u **Tabeli 2.**

Tabela 2. Imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 u papilarnom (PTC) i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (ATC).

Analizirano tkivo	Bcl-2			
PTC (n=69)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	6	8	36	19
		63/69 (91.3%)		
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	14		55 (79.71%)	
ATC (n=30)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	6	16	8	0
		24/30 (80%)		
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	22		8 (26.67%)	

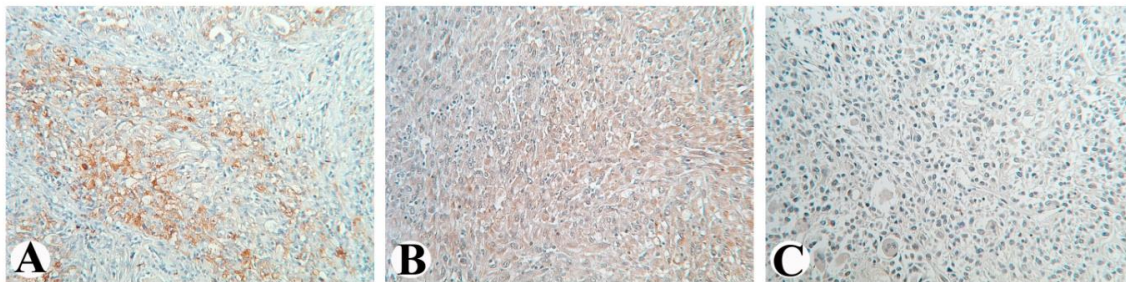
Intenzitet obojenosti: - (0) izostanak bojenja; +/- (1) slabo ili fokalno bojenje; + (2) umereno bojenje u većini ćelija; ++ (3) jako bojenje u većini ćelija.

Imunohistohemijskom metodom detektovali smo pozitivnu citoplazmatsku imunoreakciju koja ukazuje na prisustvo Bcl-2 proteina u većini slučajeva papilarnog karcinoma (**Slika 14**). Normalno tkivo štitaste žlezde susedno malignom tkivu (peritumorsko tkivo) takodje je pokazivalo imunopozitivnost u bojenju na Bcl-2 protein (**Slika 14A**), što je u skladu sa literaturnim podacima.

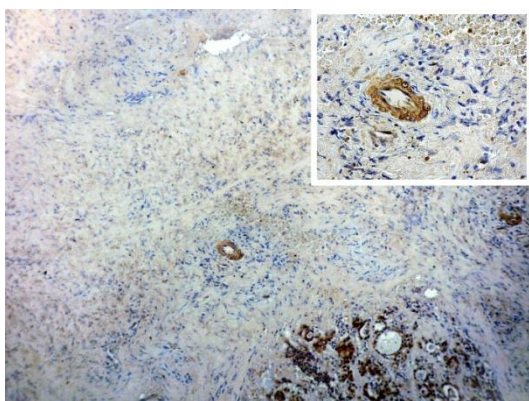


Slika 14. Imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma štitaste žlezde. Intenzivno imunohistohemijsko bojenje na Bcl-2 (**A,B**) i umereno imunohistohemijsko bojenje (**C**).

U uzorcima malignog tkiva anaplastičnog karcinoma nađena je značajno smanjena ekspresija Bcl-2 proteina u poređenju sa papilarnim karcinomom, tj. samo 8 od 30 slučajeva (26.7%) pokazivalo je visoku ekspresiju Bcl-2 proteina (ocene obojenosti 2 i 3), nasuprot 55 od 69 slučajeva (79.7%) sa visokom ekspresijom Bcl-2 u papilarnom karcinomu.



Slika 15. Imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 u uzorcima tkiva anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Fokalno bojenje (**A**), bojenje slabog intenziteta (**B**), odsustvo imunohistohemijskog bojenja, tj. odsustvo sinteze Bcl-2 proteina (**C**).



Slika 16. Imunohistohemijsko bojenje na Bcl-2 u anaplastičnom karcinomu, koji sadrži ostatke folikularne strukture. Bcl-2 pozitivnost očuvana je u ostacima folikula, ali se gubi u ćelijama anaplastičnog karcinoma. Ova slika pokazuje takođe da je anaplastični karcinom ovog pacijenta nastao od prethodno-postojećeg diferenciranog karcinoma daljom progresijom maligniteta.

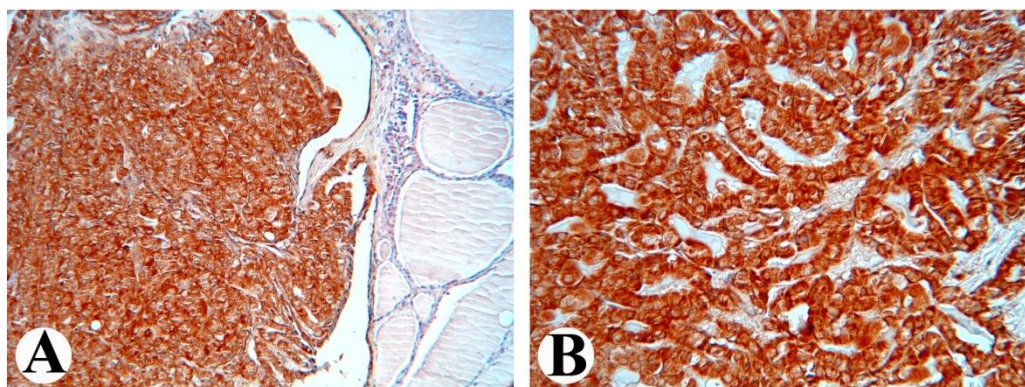
Rezultati analize imunohistohemijske ekspresije Bax proteina u tkivu papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde prikazani su u **Tabeli 3.** i na **Slikama 17 i 18.**

Bax protein nije eksprimiran u normalnom tkivu žlezde, ali je eksprimiran u većini slučajeva papilarnog karcinoma (87%), kao i u anaplastičnom karcinomu (96.7%). Broj slučajeva sa visokom ekspresijom Bax proteina bio je sličan u papilarnom (78.3%) i anaplastičnom karcinomu (80%).

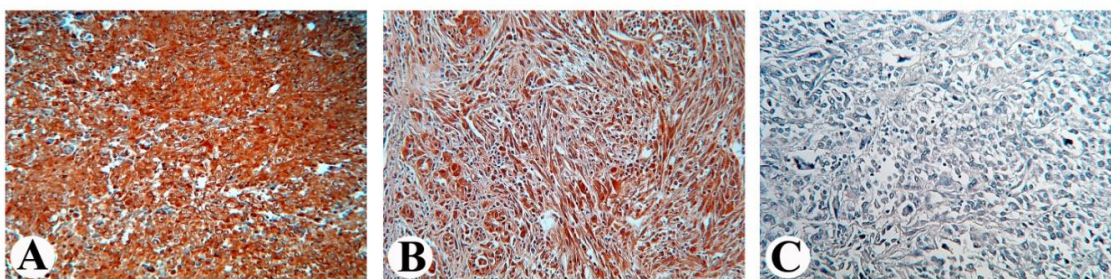
Tabela 3. Imunohistohemijska ekspresija Bax u papilarnom (PTC) i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (ATC).

Analizirano tkivo	Bax			
PTC (n=69)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	9	6	18	36
	60/69 (87%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	15		54 (78.26%)	
ATC (n=30)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	1	5	10	14
	29/30 (96.7%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	6		24 (80.00%)	

Intenzitet obojenosti: - (0) izostanak bojenja; -/+ (1) slabo ili fokalno bojenje; + (2) umereno bojenje u većini ćelija; ++ (3) jako bojenje u većini ćelija.



Slika 17. Intenzivno imunohistohemijsko bojenje na Bax protein u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma štitaste žlezde (**A,B**). Normalno tkivo žlezde susedno malignom tkivu (**A, desno**) ne sintetizira Bax protein, tj. ne pokazuje bojenju reakciju.



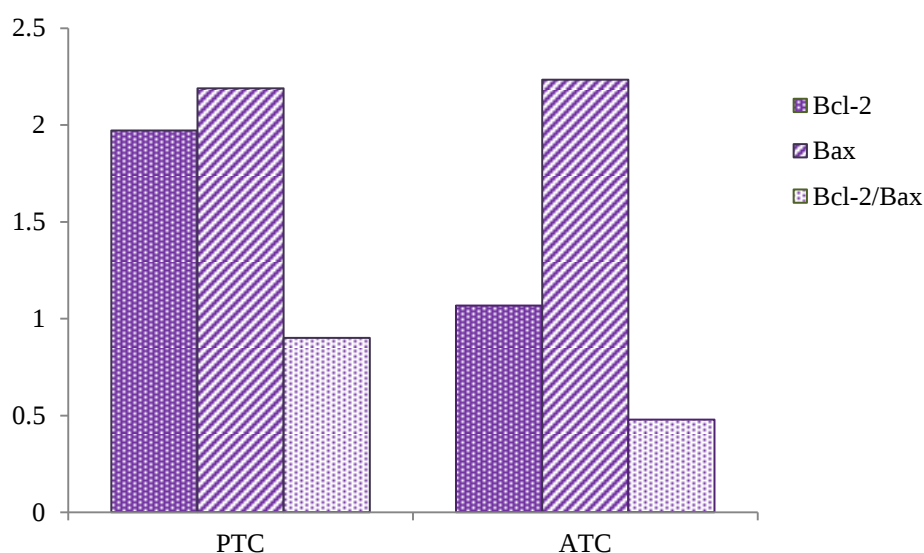
Slika 18. Imunohistohemijsko bojenje na Bax protein u uzorcima tkiva anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde. Intenzivno bojenje na Bax (**A,B**) i odsustvo bojenja (**C**).

U **Tabeli 4** prikazane su srednje vrednosti ocena imunohistohemijske ekspresije dobijene iz ocena pojedinačnih slučajeva (ocene 0-3) za grupe pacijenata sa papilarnim i

anaplastičnim karcinomom. Ova tabela, kao i grafički prikaz ovih rezultata dat u **Histogramu 1**, pokazuju smanjenje (down-regulaciju) ekspresije gena za Bcl-2 u uzorcima pacijenata sa anaplastičnim karcinomom u poređenju sa grupom papilarnih karcinoma. Takođe, prikazan je i odnos srednjih vrednosti ekspresija Bcl-2 i Bax proteina, koji pokazuje veći udeo Bax proteina (pro-apoptotskog molekula) u tkivu anaplastičnog karcinoma.

Tabela 4. Srednje vrednosti intenziteta ekspresije za Bcl-2 i Bax i odnos njihovih srednjih vrednosti u papilarnom (PTC) i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (ATC).

Analizirano tkivo	Bcl-2 srednja vrednost $\pm$ SD	Bax srednja vrednost $\pm$ SD	Bcl2/Bax odnos
PTC	1.971 $\pm$ 0.857	2.188 $\pm$ 1.061	0,900
ATC	1.067 $\pm$ 0.691	2.233 $\pm$ 0.858	0,478



Histogram 1. Srednje vrednosti intenziteta ekspresije za Bcl-2 i Bax protein, i količnik njihovih srednjih vrednosti za papilarni karcinom štitaste žlezde (PTC) i anaplastični karcinom štitaste žlezde (ATC).

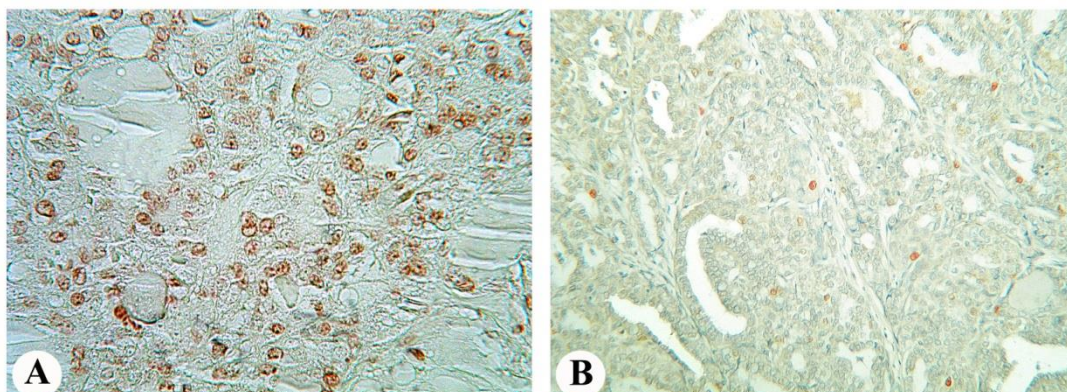
Zaključak ovih eksperimenata je da tokom progresije od diferenciranog ka nediferenciranom (anaplastičnom) karcinomu dolazi do molekularnih promena koje se ogledaju u izmenjenoj ekspresiji anti-apoptotskih i pro-apoptotskih proteina. S obzirom da odnos anti-apoptotskog molekula (Bcl-2) i pro-apoptotskog molekula (Bax) „ide u korist“ Bax molekula, trebalo bi očekivati da će povećani proliferativni kapacitet, koji je

odlika veoma agresivnog karcinoma kakav je anaplastični, biti kompenzovan adekvatnim odgovorom organizma, tj. aktivacijom signalne kaskade koja vodi apoptotskoj smrti maligne ćelije.

4.2. Detekcija apoptotske smrti ćelija u tkivu papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde

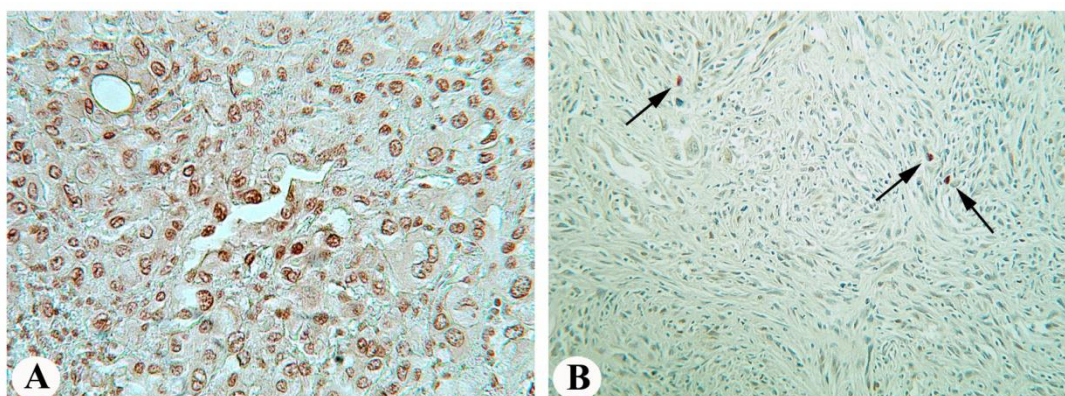
Apoptoza je kompleksan genski regulisan proces u kojem regulatorne uloge imaju anti-apoptotski i pro-apoptotski molekuli, uz dodatne medijatore. Ovim mehanizmom se u normalnim fiziološkim uslovima otklanjaju suvišne ili nepoželjne ćelije i čuva tkivna homeostaza. Odlika maligne ćelije je „izbegavanje“ apoptoze.

Stepen apoptotske smrti u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma određivali smo tzv-TUNEL metodom (terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling method) koristeći Apop Tag kit za in situ detekciju apoptoze. Metoda se zasniva na detekciji dvolančanih prekida DNK molekula, koji se dešavaju pri proteolitičkoj degradaciji ćelije.



Slika 19. In situ apoptotska smrt u papilarnom karcinomu štitaste žlezde, (**A**-kontrolni uzorak, **B**-ispitivani uzorak).

Na **Slici 19A** prikazan je kontrolni uzorak detekcije apoptotske smrti u tkivu papilarnog karcinoma, koji je dobijen veštački izazvanim dvolančanim prekidima DNK, čime je proverena ispravnost metode i reagenasa. Na **Slici 19B** prikazan je uzorak tkiva papilarnog karcinoma u kojem se vidi detektovana apoptotska smrt na osnovu bojene reakcije jedara apoptotskih ćelija.



Slika 20. In situ apoptotska smrt u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde, (**A**-kontrolni uzorak, **B**-ispitivani uzorak).

Takođe, na **Slici 20A** prikazan je kontrolni uzorak detekcije apoptotske smrti ćelija na uzorku anaplastičnog karcinoma, a na **Slici 20B** vidi se detektovane apoptotske ćelije u jednom od ispitivanih slučajeva anaplastičnog karcinoma.

Analiza stepena apoptotske smrti, iskazanog kao apoptotski indeks, (**Tabela 5**) u ispitivanim slučajevima papilarnog i anaplastičnog karcinoma, pokazala je nizak stepen apoptoze u tiroidnim karcinomima, čak nešto niži u anaplastičnom nego u papilarnom karcinomu.

Tabela 5. Apoptotski indeks (AI) za papilarni (PTC) i anaplastični karcinom štitaste žlezde (ATC).

Analizirano tkivo	Apoptotski indeks (%)	p*
PTC (n=50)	0.626 ± 0.587	<0.05
ATC (n=30)	0.267 ± 0.438	

AI: detaljno opisani u Materijalu i Metodama
 * Mann-Whitney U-test

Zaključak ovih eksperimenata je da odnos Bax molekula i Bcl-2 molekula, ne obezbeđuje propagaciju signala do finale faze (aktivacije proteolitičkih enzima), što ukazuje na postojanje drugih defekata duž signalne kaskade nizvodno od mesta delovanja Bax proteina.

4.3. Poređenje ekspresije Bcl-2 i Bax proteina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde

Kliničko-patološki parametri pacijenata sa papilarnim karcinomom (n=69) dati su u **Tabeli 1**, u početnom delu sekcije Rezultati. Ovi podaci obuhvatili su informacije o godinama i polu, veličini tumora, prisustvu/odsustvu limfnih metastaza i ekstratiroidne invazije, kao i o stadijumu tumorske bolesti, prema TNM klasifikaciji tumora.

Tabela 6. Poređenje između kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije Bcl-2 proteina u 69 slučajeva papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

PTC (n=69) Kliničko-patološki podaci		Bcl-2 ekspresija		p*
		niska ekspresija	visoka ekspresija	
LNM	Prisutne (n=15)	4 (26.67%)	11 (73.33%)	>0.05
	Odsutne (n=54)	10 (18.52%)	44 (81.84%)	
EI	Prisutna (n=18)	2 (11.11%)	16 (88.89%)	>0.05
	Odsutna (n=51)	12 (23.53%)	39 (76.47%)	
pT	T1a (n=27)	6 (22.22%)	21 (77.78%)	>0.05
	T1b (n=13)	3 (23.08%)	10 (76.92%)	
	T2 (n=10)	3 (30.00%)	7 (70.00%)	
	T3 (n=2)	0	2 (100%)	
	T4 (n=17)	3 (17.65%)	14 (82.35%)	
pTNM	I (n=46)	9 (19.57%)	37 (80.43%)	>0.05
	II (n=3)	1 (33.33%)	2 (66.67%)	
	III (n=7)	2 (28.57%)	5 (71.43%)	
	IV (n=13)	2 (15.38%)	11 (84.62%)	
Početni stadijumi	I/II	10 (20.41%)	39 (79.59%)	>0.05
Uznapredovali stadijumi	III/IV	4 (20.00%)	16 (80.00%)	

LNM: metastaze u limfnim čvorovima
pT i pTNM status: prema AJCC (American Joint Comittee on Cancer), detaljnije u Materijalu i Metodama
* Fisher's exact test

Poređena je visoka imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 proteina uzoraka pacijenata sa papilarnim karcinomom (ocene imunohistohemijskog bojenja 2 i 3) sa kliničko-patološkim parametrima ovih pacijenata (**Tabela 6**). Parametri koji ukazuju na teži

klinički tok bolesti, kao što je prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, ekstratiroidna invazija (širenje tumora van kapsule žlezde u okolne strukture vrata) i status uznapredovale tumorske bolesti (stadijumi III i IV), nisu pokazali statistički značajnu korelaciju sa visokom ekspresijom Bcl-2 proteina.

Tabela 7. Poređenje između kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije Bax proteina u 69 slučajeva papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

PTC (n=69)		Bax ekspresija		p*
Kliničko-patološki podaci		niska ekspresija	visoka ekspresija	
LNM	Prisutne (n=15)	4 (26.67%)	11 (73.33%)	>0.05
	Odsutne (n=54)	10 (18.52%)	44 (81.48%)	
EI	Prisutna (n=18)	2 (11.11%)	16 (88.89)	>0.05
	Odsutna (n=51)	13 (25.49%)	38 (74.51%)	
pT	T1a (n=27)	9 (33.33%)	18 (66.67%)	>0.05
	T1b (n=13)	2 (15.38%)	11 (84.62%)	
	T2 (n=10)	2 (20.00%)	8 (80.00%)	
	T3 (n=2)	0	2 (100%)	
	T4 (n=17)	2 (11.76%)	15 (88.24%)	
pTNM	I (n=46)	12 (26.09%)	34 (73.91%)	>0.05
	II (n=3)	0	3 (100%)	
	III (n=7)	1 (14.29%)	6 (85.71%)	
	IV (n=13)	2 (15.38%)	11 (84.62%)	
Početni stadijumi	I/II	12 (24.49%)	37 (75.51%)	>0.05
Uznapredovali stadijumi	III/IV	3 (15.00%)	17 (85.00%)	

LNM: metastaze u limfnim čvorovima
pT i pTNM status: prema AJCC (American Joint Comittee on Cancer), detaljnije u Materijalu i Metodama
* Fisher's exact test

Takođe, i visoka ekspresija Bax proteina poređena je sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom (**Tabela 7**). Rezultati ovog poređenja nisu pokazali statistički značajnu korelaciju visoke ekspresije Bax proteina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata uključenih u ovu studiju.

Zaključak ovih eksperimenata je da apoptotski molekuli Bcl-2 i Bax nemaju prognostički značaj u predviđanju toka bolesti tiroidno-onkoloških pacijenata, kao što i nemaju presudnu ulogu u finalizaciji apoptotske smrti ćelija tokom progresije maligniteta tiroidnih tumora.

4.4. Analiza imunohistohemijske ekspresije survivina u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde

Survivin je član IAP familije proteina (IAP-Inhibitor of apoptosis protein), koji su operativni u nizvodnom delu apoptotske signalne kaskade, u finalnom koraku koji prethodi aktivaciji kaspaza, proteolitičkih enzima, koji razgrađuju sve ćelijske strukture i dovode do apoptotske smrti ćelije. Survivin, osim inhibicije apoptoze, ima i ulogu u promovisanju ćelijskog ciklusa (proliferacija), kao i angiogenezi, tako da se njegovo aktiviranje smatra važnim za nastanak, razvoj i progresiju humanih tumora.

U ovom delu eksperimentalnog rada analizirali smo imunohistohemijsku ekspresiju survivina u papilarnom i anaplastičnom karcinomu.

Serijski uzorci pacijenata sa papilarnim karcinomom koja je korišćena u ovim eksperimentima sastojala se od 104 uzorka arhivskog tkivnog materijala. Kliničko-patološki podaci ovih pacijenata prikazani su u **Tabeli 8**. Iz ovih podataka se vidi da je od ukupno 104 pacijenata, njih 25 imalo prisutne metastaze u limfnim čvorovima, 31 pacijent je imao prisutnu ekstratiroidnu invaziju, a 34 je bilo u uznapredovalim stadijumima bolesti (stadijumi III/IV).

Tabela 8. Kliničko-patološki podaci za 104 slučaja papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

Kliničko-patološki podaci		PTC (n=104)
Starost (godine)	Srednja vrednost (opseg)	49.75 (20-76)
	<45	33 (31.73%)
	≥45	71 (68.27%)
Pol	Ž:M	89:15
LNM	Prisustvo	25 (24.04%)
EI	Prisustvo	31 (29.81%)
Veličina tumora (mm)	Srednja vrednost (opseg)	21.81 (3-100)
pT	T1	51
	T2	19
	T3	4
	T4	30
pTNM	I	64
	II	6
	III	11
	IV	23
Početni stadijumi	I/II	70
Uznapredovali stadijumi	III/IV	34
LNM: metastaze u limfnim čvorovima		
EI: ekstratiroidna invazija		
pT i pTNM status: prema AJCC (American Joint Committee on Cancer), detaljnije u Materijalu i Metodama		

Serijski uzorci tkiva pacijenata sa anaplastičnim karcinomom su isti kao i u prethodnim eksperimentima (n=30), u kojima su korišćeni za analizu ekspresije Bcl-2 i Bax proteina. Podaci za ove pacijente dati su **Tabeli 1**, u početnom delu sekcije Rezultati.

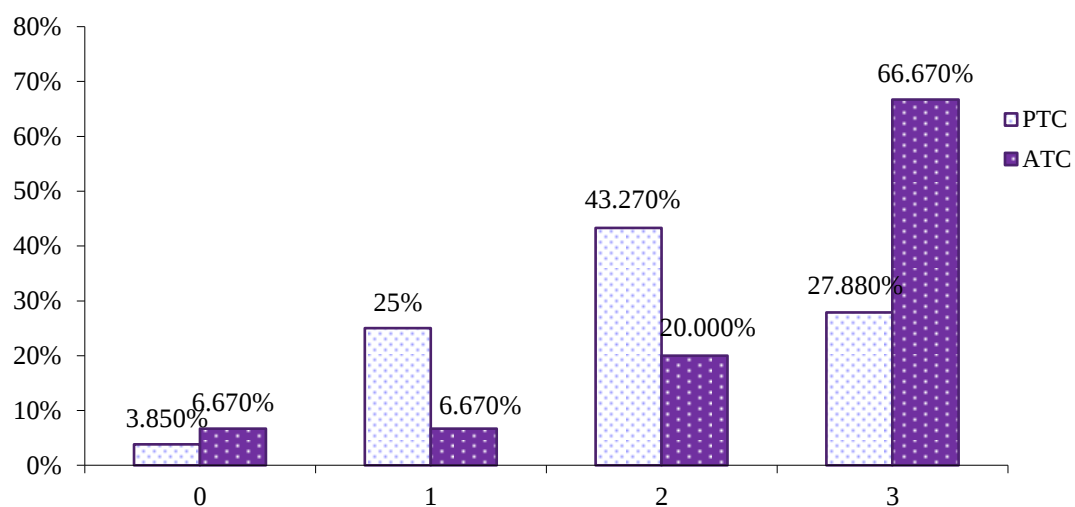
Rezultati analize imunohistohemijske ekspresije survivina u uzorcima papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde prikazani su u **Tabeli 9**.

Tabela 9. Imunohistohemijska ekspresija survivin proteina u papilarnom (PTC) i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (ATC).

Analizirano tkivo	survivin			
PTC (n=104)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	4	26	45	29
	100/104 (96.15%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	30		74 (71.15%)	
ATC (n=30)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	2	2	6	20
	28/30 (93.33%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	4		26 (86.67%)	

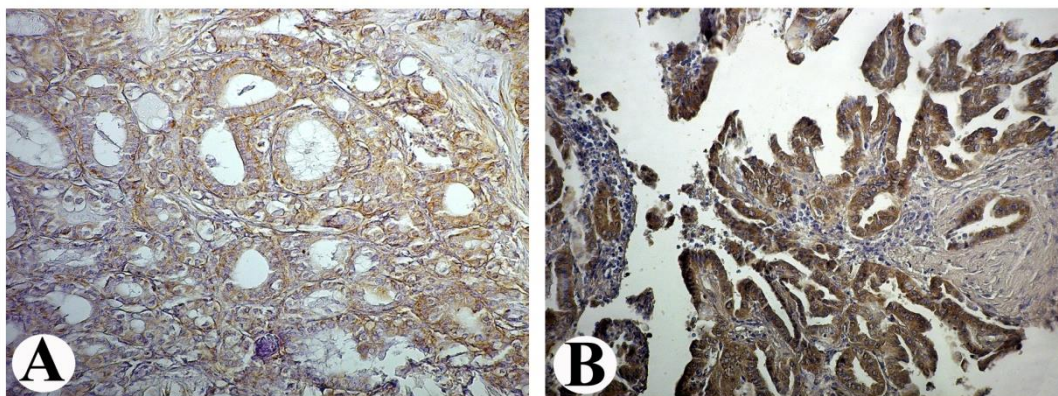
Intenzitet obojenosti: - (0) izostanak bojenja; +/- (1) slabo ili fokalno bojenje; + (2) umereno bojenje u većini ćelija; ++ (3) jako bojenje u većini ćelija.

Ekspresija survivina je nađena u citoplazmi malignih ćelija velikog broja uzoraka papilarnog (96.2%) i anaplastičnog karcinoma (93.3%). U normalnom tkivu žlezde, susednom malignom tkivu, survivin se nije mogao imunohistohemijski detektovati. Broj uzoraka papilarnog karcinoma sa visokom ekspresijom survivina iznosio je 71.2%, a u anaplastičnom karcinomu 86.7%, međutim u visokoj ekspresiji survivina u papilarnom karcinomu bilo je dominantno umereno bojenje (ocena 2), a u anaplastičnom karcinomu bilo je dominantno intenzivno bojenje (ocena 3). Ovaj porast u intenzitetu bojenja na survivin u anaplastičnom karcinomu jasno je vidljiv iz grafičke ilustracije distribucije ocena intenziteta imunohistohemijskog bojenja, što je prikazano u **Histogramu 2**.

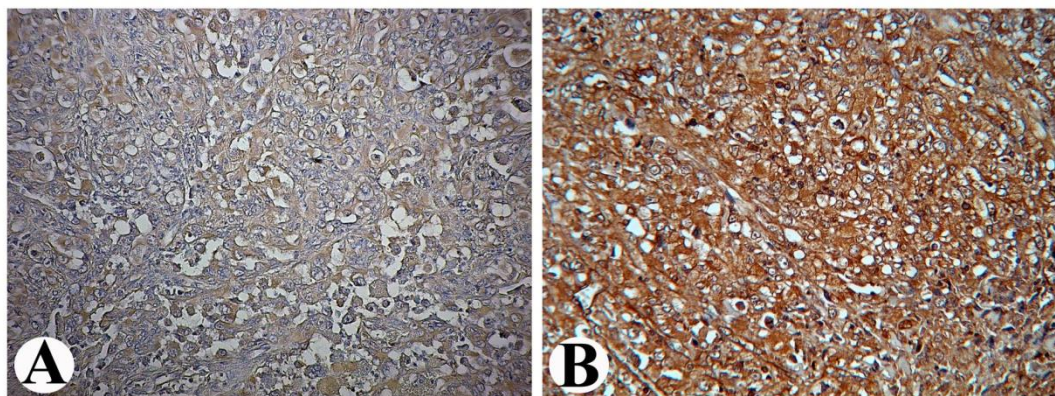


Histogram 2. Procentualni udeo slučajeva sa intenzitetom obojenosti 0, 1, 2 i 3 za survivin u papilarnom (PTC) i anaplastičnom (ATC) karcinomu štitaste žlezde.

Imunohistohemijska ekspresija survivina u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde prikazana je na **Slikama 21 i 22**.



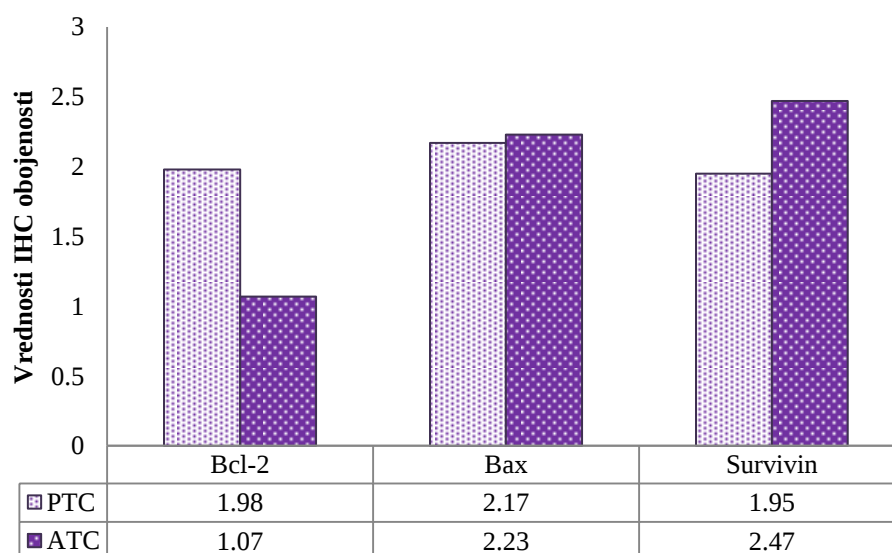
Slika 21. Ekspresija survivina u papilarnom karcinomu štitaste žlezde. **A)** Umereno imunohistohemijsko bojenje u citoplazmi malignih ćelija **B)** Intenzivno imunohistohemijsko bojenje u citoplazmi malignih ćelija.



Slika 22. Ekspresija survivina u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde. **A)** Slabo imunohistohemijsko bojenje u citoplazmi malignih ćelija **B)** Intenzivno imunohistohemijsko bojenje u citoplazmi malignih ćelija.

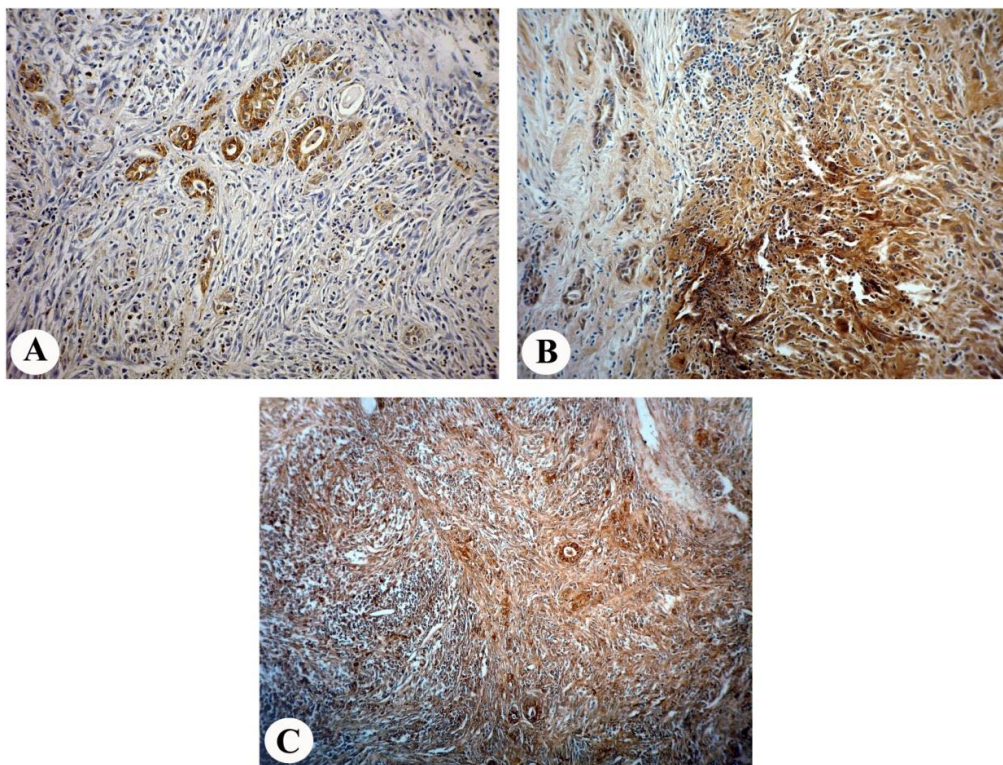
4.5. Poređenje imunohistohemijske ekspresije survivina i članova Bcl-2 familije (Bcl-2, Bax) u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde

Poređenje srednjih vrednosti ocenjivanja imunohistohemijskog bojenja na Bcl-2, Bax i survivin u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde prikazano je u **Histogramu 3.**



Histogram 3. Srednje vrednosti ocena imunohistohemijske obojenosti za Bcl-2, Bax i survivin u papilarnom (PTC) i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (ATC).

Iz ovog histograma se jasno vidi da tokom progresije od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu dolazi do smanjenja ekspresije Bcl-2, anti-apoptotskog proteina, što je praćeno povećanjem ekspresije survivina, proteina koji inhibira apoptozu, uz konstantnu visoku ekspresiju Bax proteina.



Slika 23. Anaplastični karcinom štitaste žlezde sa ostacima folikularne strukture diferenciranog karcinoma. **A)** Imunohistohemijsko bojenje na Bcl-2 pokazuje pozitivnost u ostacima folikula i negativno bojenje anaplastičnog karcinoma. **B)** Imunohistohemijsko bojenje na Bax i **C)** imunohistohemijsko bojenje na survivin, pokazuju intenzivno bojenje u folikulima i u zonama anaplastičnog karcinoma.

Ova slika pokazuje trend promena u ekspresiji apoptotskih molekula tokom progresije maligniteta, a takođe dokazuje da je anaplastični karcinom ovog pacijenta nastao od prethodno-postojećeg diferenciranog karcinoma daljom progresijom, tj. dediferencijacijom tumora.

4.6. Korelacija imunohistohemijske ekspresije survivina i apoptotske smrti ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde

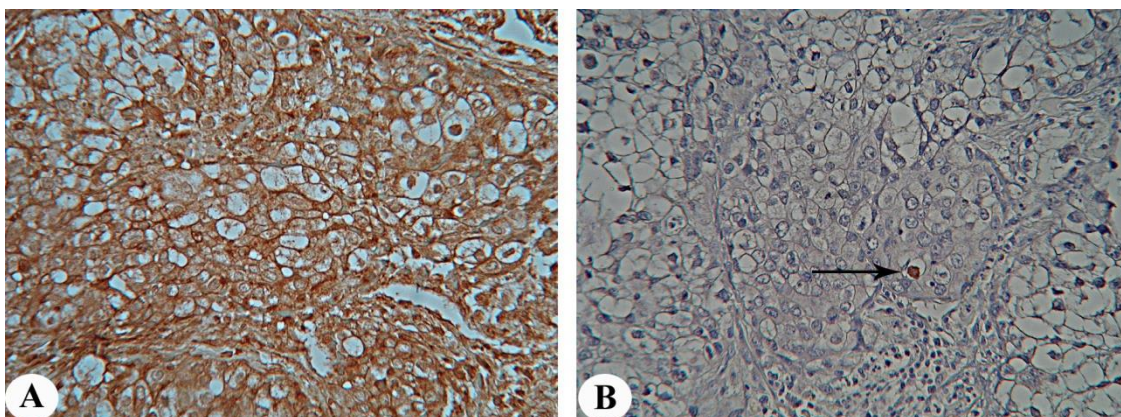
S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da u anaplastičnom karcinomu dolazi do povećanja ekspresije survivina, proteina koji inhibira apoptozu, u ovom delu eksperimentalnog rada korelisali smo imunohistohemijsku ekspresiju survivina u uzorcima tkiva anaplastičnog karcinoma sa stepenom apoptotske smrti ćelija u ovim uzorcima.

Stepen apoptotske smrti u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma određivali smo TUNEL metodom, koristeći Apop Tag kit za in situ detekciju apoptoze.

Tabela 10. Korelacija između ekspresije survivina i apoptotske smrti ćelija izražene apoptotskim indeksom u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (ATC).

apoptotskim indeksom u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (AIC).			
	Broj slučajeva	Apoptotski indeks (%)	p*
Uzorci sa niskom ekspresijom survivina	4	0.691 ± 0.139	<0.05
Uzorci sa visokom ekspresijom survivina	26	0.202 ± 0.204	
AI: detaljno opisani u Materijalu i Metodama			
* Mann-Whitney U-test			

U **Tabeli 10** prikazana je korelacija između uzoraka tkiva anaplastičnog karcinoma sa niskom i visokom ekspresijom survivina i detektovanog stepena apoptotske smrti u ovim uzorcima, iskazanog kao apoptotski indeks. Rezultati pokazuju da je u uzorcima tkiva sa visokom ekspresijom survivina apoptotski indeks bio značajno manji nego u uzorcima tkiva sa niskom ekspresijom survivina.



Slika 24. Anaplastični karcinom sa intenzivnim imunohistohemijskim bojenjem na survivin **(A)** i detekcija in situ apoptotske smrti samo u jednoj ćeliji u istoj zoni tkivnog uzorka karcinoma **(B)**.

Zaključak ovih eksperimenata je da tokom progresije maligniteta tumora štitaste žlezde dolazi do smanjenja ekspresije Bcl-2 proteina i do povećanja ekspresije survivina. Pro-apoptotski protein Bax, aktivira se u početnoj fazi maligne transformacije i ostaje na visokom nivou tokom tumorske progresije. Međutim, visoka ekspresija Bcl-2 (anti-apoptotskog proteina) u papilarnom karcinomu, a zatim visoka ekspresija survivina (takode anti-apoptotskog proteina) u anaplastičnom karcinomu, onemogućavaju propagaciju apoptotskog signala, odnosno finalnu egzekuciju smrti ćelije. Na ovaj način maligna ćelija izbegava apoptotsku smrt.

4.7. Poređenje ekspresije survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde

S obzirom da je u prethodnim eksperimentima pokazano da se ekspresija survivina povećava tokom progresije maligniteta od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu i da povećana ekspresija survivina koreliše sa smanjenom apoptozom malignih ćelija, u sledećem delu eksperimentalnog rada poredili smo ekspresiju survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim i anaplastičnim karcinomom.

U **Tabeli 11** prikazana je korelacija između ekspresije survivina i kliničko-patoloških parametara pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde.

Tabela 11. Poređenje između kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije survivina u 104 slučaja papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

PTC (n=104) Kliničko-patološki podaci		survivin ekspresija		p ^a	p ^b
		niska ekspresija	visoka ekspresija		
Starost	<45	10	23	0,823	
	≥45	20	51		
Pol	Ženski	26	63	1.000 ^c	
	Muški	4	11		
Veličina tumora	≤2 cm	19	46	0,911	
	>2 cm	11	28		
LNM	Prisutne	2	23	0.010^c	0,009
	Odsutne	28	51		
EI	Prisutna	5	26	0.062 ^c	0,063
	Odsutna	25	48		
pT	T1	18	33	0.209 ^c	
	T2	5	14		
	T3	2	2		
	T4	5	25		
	T1-T2	23	47	0,195	
	T3-T4	7	27		
pTNM	I	23	41	0.153 ^c	
	II	2	4		
	III	2	9		
	IV	3	20		
Početni stadijumi	I/II	25	45	0,027	0,027
Uznappedovali stadijumi	III/IV	5	29		

LNM: metastaze u limfnim čvorovima

EI: ekstratiroidna invazija

pT i pTNM status: prema AJCC (American Joint Committee on Cancer), detaljnije u Materijalu i Metodama

^aChi-square test

^bMann-Whitney test

^cFisher's exact test

Rezultati pokazuju da je primenom navedenih statističkih testova (Chi-square test, Mann-Whitney U-test i Fischer Exact test) pokazana statistički značajna korelacija visoke ekspresije survivina sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima i uznapredovalim stadijumom tumorske bolesti (stadijumi III/IV prema TNM klasifikaciji). Korelacija visoke ekspresije survivina sa prisustvom ekstratiroidne invazije (širenje tumora van kapsule žlezde) bila je na granici statističke značajnosti ($p=0.062$, odnosno $p=0.063$, u zavisnosti od primenjenog statističkog testa). Ostali kliničko-patološki parametri nisu pokazali statistički značajnu korelaciju sa ekspresijom survivina.

Da bismo proverili vrednost statističke značajnosti korelacije dobijene između visoke ekspresije survivina i navedenih kliničko-patoloških parametara prikazanih u prethodnih eksperimentima, takođe smo primenili i Spearman-korelacioni test (koji poredi korelaciju vrednosti parametarskih karakteristika između pojedinačnih slučajeva, a ne između vrednosti za grupe uzoraka).

Rezultati primene Spearman-korelacionog testa u analizi korelacije između ekspresije survivina i kliničko-patoloških parametara odabranih prema prethodnoj statističkoj analizi, prikazani su u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Korelacioni koeficijent prema Spearman-u između ekspresije survivina i kliničko-patoloških parametara za 104 slučaja papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

Spearman-ov test	LN	EI	pTNM I,II,III,IV	pTNM I,II/III,IV
Rs (Korelacioni koeficijent)	0.259**	0,183	0.213*	0.218*
p	0,008	0,063	0,030	0,027
*korelacioni koeficijent za nivo značajnosti 0.05				
**korelacioni koeficijent za nivo značajnosti 0.01				

Rezultati prikazani u ovoj tabeli pokazuju dodatnim statističkim testom (Spearman-korelacioni test) da je visoka ekspresija survivin molekula u statistički značajnoj korelaciji sa prisustvom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i uznapredovalim stadijumima karcinoma, tj. stadijumima III/IV, dok se korelacija sa ekstratiroidnom invazijom ponovo pokazala na nivou granične statističke značajnosti.

4.8. Poređenje ekspresije survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde

U seriji od 30 arhivskih tkivnih uzoraka pacijenata sa anaplastičnim karcinomom, koja je korišćena u prethodnim eksperimentima (čiji su kliničko-patološki podaci dati u **Tabeli 1** u uvodnom delu sekcije Rezultati), analizirana je imunohistohemijska ekspresija survivina. (**Tabela 8**).

Rezultati poređenja ekspresije survivina sa kliničko-patološkim parametrima anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde dati su u **Tabeli 13**.

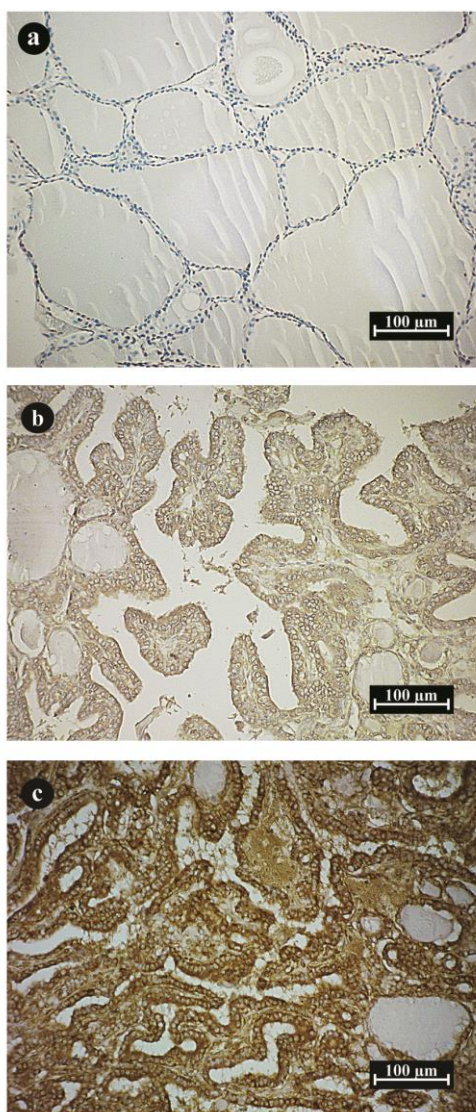
Tabela 13. Poređenje između kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije survivina u 30 slučajeva anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (ATC).

ATC (n=30)		survivin ekspresija		p [*]
Kliničko-patološki podaci		niska ekspresija	visoka ekspresija	
LNM	Prisutne (n=19)	0	19	0,012
	Odsutne (n=11)	4	7	
EI	Prisutna (n=23)	4	19	0,548
	Odsutna (n=7)	0	7	
LNM: metastaze u limfnim čvorovima				
EI: ekstratiroidna invazija				
*Fisher's exact test				

Rezultati poređenja kliničko-patoloških parametara pacijenata sa dijagnozom anaplastičnog karcinoma sa imunohistohemijskom ekspresijom survivina pokazali su statistički značajnu razliku između visoke ekspresije survivina u tumorima sa prisutnim limfnim metastazama u odnosu na tumore sa odsustvom limfnih metastaza ($p=0.012$). Visoka ekspresija survivina nije bila u korelaciji sa prisustvom ekstratiroidne invazije.

4.9. Poređenje imunohistohemijske ekspresije survivina u uzorcima pacijenata sa papilarnim karcinomom sa prisustvom/odsustvom metastaza u limfnim čvorovima

U ovom delu eksperimenata analizirali smo razliku u imunohistohemijskoj ekspresiji survivina u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma sa prisustvom i odsustvom metastaza u limfnim čvorovima.

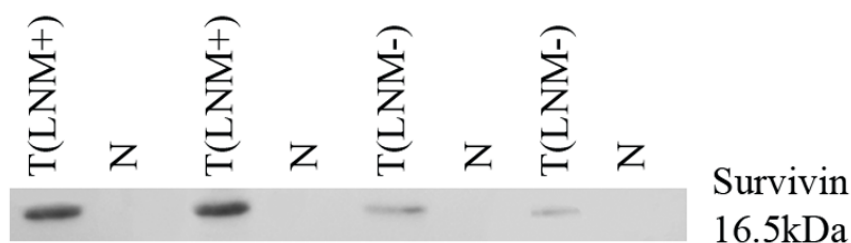


Slika25. Imunohistohemijska ekspresija survivina. **A)** Negativno bojenje na survivin u nemalignom tkivu štitaste žlezde. **B)** Umereno imunohistohemijsko bojenje na survivin u tkivu papilarnog karcinoma koji nema prisutne metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. **C)** Intenzivno bojenje na survivin u tkivu papilarnog karcinoma koji ima prisutne (evidentirane) metastaze u regionalnim limfnim čvorovima.

4.10. Imunoblot analiza ekspresije survivina u uzorcima pacijenata sa papilarnim karcinomom sa prisustvom/odsustvom metastaza u limfnim čvorovima

Hirurški odstranjeno tkivo pacijenata sa karcinomom štitaste žlezde preuzeto je neposredno posle operacije i čuvano zamrznuto do upotrebe. Ako je bilo dostupno, preuzeto je i normalno tkivo žlezde iz suprotnog lobusa.

Od ovih uzoraka pripremljeni su tkivni homogenati, u kojima je nakon elektroforetskog razdvajanja proteina urađen imunoblot („Western blot“), uz primenu specifičnih antitela na survivin, na način kako je detaljno opisano u sekciji Materijal i metode.



Slika 26. Imunoblot analiza ekspresije survivina u uzorcima papilarnog karcinoma sa prisutnim limfnim metastazama (T LNM+), sa odsustvom limfnih metastaza (T LNM-) i u normalnom tkivu žlezde (N).

Ovi rezultati su pokazali da tkivo papilarnog karcinoma koji ima prisutne limfne metastaze sadrži veću količinu sintetisanog survivin proteina, nego tkivo papilarnog karcinoma koji nema prisutne limfne metastaze, kao i da normalno tkivo žlezde ne sintetizuje survivin. Rezultati dobijeni imunoblotom bili su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim imunohistohemijskom analizom, a takođe su potvrdili i specifičnost antitela na survivin, jer je detektovana traka odgovarala molekularnoj masi survivin proteina (16.5kDa).

4.11. Analiza imunohistohemijske ekspresije survivina u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma u poređenju sa metastatskim tkivom u limfnim čvorovima istog pacijenata

Karakteristika papilarnog karcinoma je limfogeno širenje, za razliku od drugih tipova karcinoma štitaste žlezde (folikularni i medularni karcinom) koji se šire hematogenim putevima kroz krvne sudove dajući udaljene metastaze.

Dakle, maligne ćelije papilarnog karcinoma putem limfnih sudova dospevaju u regionalne limfne čvorove. To je česta i rana pojava kod pacijenata sa dijagnozom papilarnog karcinoma (otprilike 30% pacijenata pri prezentaciji lekaru ima prisutne metastaze u limfnim čvorovima).

U ovom delu eksperimentalnog rada ispitivali smo imunohistohemijskom metodom da li postoji razlika u ekspresiji survivina između primarnog tumora i njegovog metastatskog tkiva u limfnom čvoru.

U tu svrhu, iz baze arhivskog materijala Centra za endokrinu hirurgiju KCS, odabrali smo 15 uzoraka ukalupljenog tkiva papilarnog karcinoma sa ukalupljenim metastatskim tkivom iz limfnih čvorova istog pacijenta.

U **Tabeli 14** dati su podaci o imunohistohemijskoj analizi ovih uzoraka.

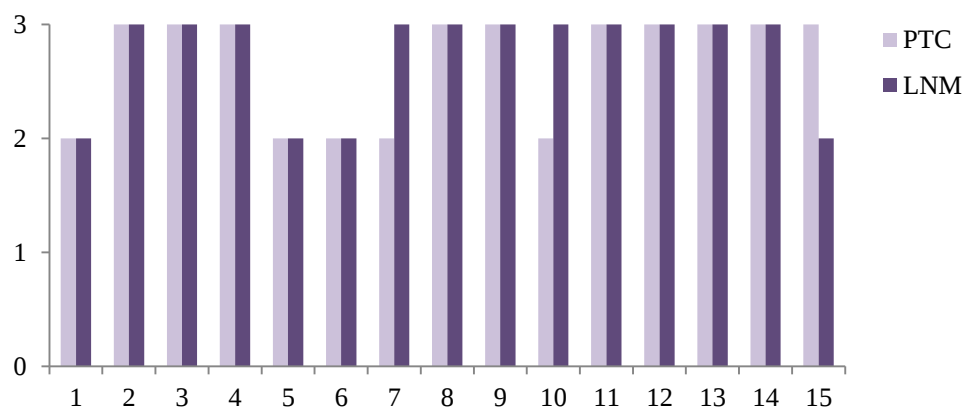
Tabela 14. Imunohistohemijska ekspresija survivina u primarnim karcinomima (PTC) i njihovim metastazama u limfnim čvorovima (LNM).

Analizirano tkivo	survivin			
PTC (n=15)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	0	0	5	10
	15/15 (100%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	0		15 (100%)	
LNM (n=15)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	0	0	4	11
	15/15 (100%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	0		15 (100%)	

Intenzitet obojenosti: - (0) izostanak bojenja; -/+ (1) slabo ili fokalno bojenje; + (2) umereno bojenje u većini ćelija; ++ (3) jako bojenje u većini ćelija.

Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije survivina prikazani u ovoj tabeli pokazuju da svi odabrani slučajevi uzoraka tkiva pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde imaju visoku ekspresiju survivina (ocene imunohistohemijskog bojenja: 2 i 3). U metastatskom tkivu ovih primarnih papilarnih karcinoma, takođe je nađena visoka ekspresija survivina.

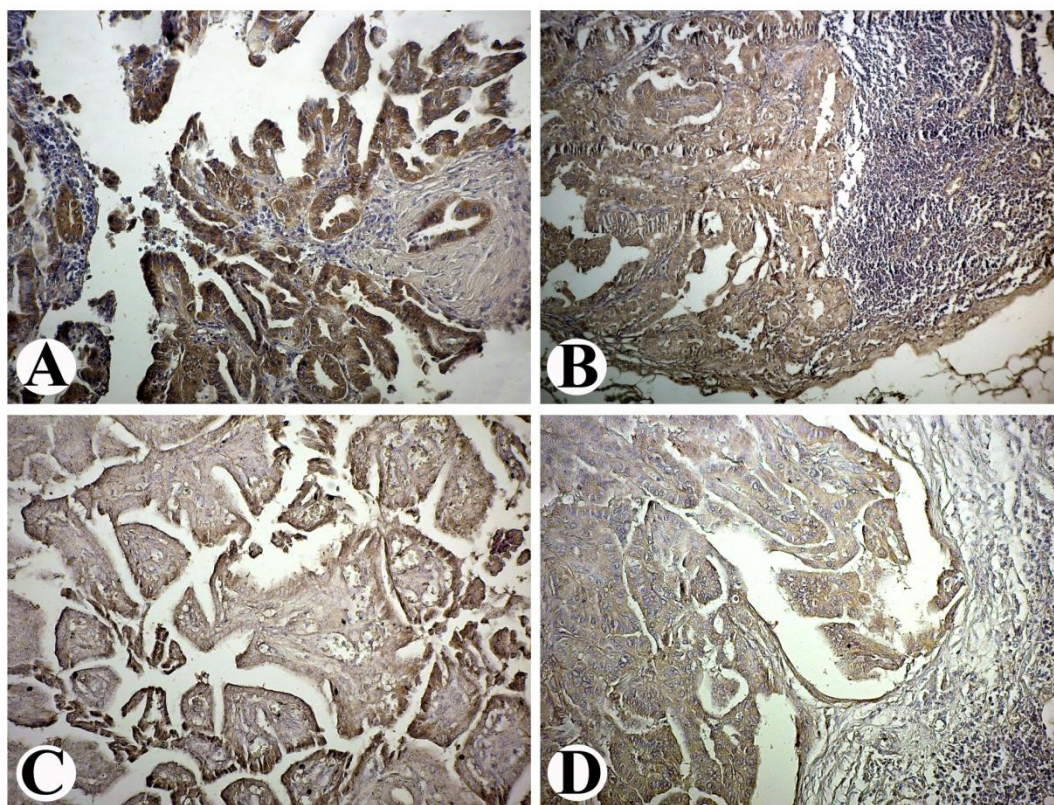
Histogram 4 prikazuje poređenje imunohistohemijskog ocenjivanja ekspresije survivina u primarnim papilarnim karcinomima i njihovom sparenom metastatskom tkivu u limfnim čvorovima.



Histogram 4. Grafička ilustracija pojedinačnih ocena imunohistohemijske ekspresije survivina za primarne papilarne karcinome štitaste žlezde i njihova metastatska tkiva u limfnim čvorovima.

Ovaj histogram pokazuje da je visoka imunohistohemijska ekspresija survivina, koja je dokumentovana u primarnim papilarnim karcinomima štitaste žlezde, takođe očuvana u metastatskom tkivu. Iako svi uzorci limfnih metastaza imaju visoku ekspresiju survivin proteina, tri slučaja metastatskog tkiva su odstupala dajući u dva slučaja nižu ekspresiju u primarnom tumoru, a u jednom slučaju višu ekspresiju survivina.

Na **Slici 27** prikazana je imunohistohemijska ekspresija survivina u primarnim tumorima (papilarni karcinom štitaste žlezde) u poređenju sa metastatskim tkivom u limfnom čvoru istog pacijenta. Ove slike dokumentuju da je visoka ekspresija survivina prisutna i u metastatskom tkivu. Takođe, ove slike pokazuju da maligne ćelije dospele u limfni čvor počinju ovde da „grade“ istu histološku strukturu (papilarne formacije) kao i u primarnom tumoru.



Slika 27. Imunohistohemijska ekspresija survivina u tkivu papilarnog karcinoma i metastatskom tkivu u regionalnom limfnom čvoru istog pacijenta .Intenzivno bojenje na survivin u primarnom tumoru **(A)** i u metastatskom tkivu u limfnom čvoru **(B)**. Umereno bojenje na survivin u primarnom tumoru **(C)** i u metastatskom tkivu u limfnom čvoru **(D)**.

Zaključak ovih eksperimenata je da je „up-regulacija“ gena za survivin rani događaj u tiroidnoj tumorogenezi (ekspresija survivina prisutna je već u pT1 tumorima, tj.

tumorima manjim od 2 cm, koji nisu razvili ni limfne, niti udaljene metastaze (**Tabela 11**). Ekspresija survivina postepeno se povećava tokom progresije maligniteta od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu i u korelaciji je sa prisustvom limfnih metastaza i uznapredovalim stadijumima tumorske bolesti. U metastatskim karcinomima, visoka ekspresija survivina u primarnim tumorima prisutna je i u ćelijama karcinoma koje su metastazirale u limfne čvorove.

4.12. Analiza imunohistohemijske ekspresije VEGF-C proteina u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde

VEGF-C (od engleskog: Vascular endothelial growth factor-C, tj. faktor rasta endotela krvnih sudova) je protein koji podstiče formiranje novih limfnih sudova od prethodno-postojećih, što znači da ima „limfangiogenu“ ulogu. Nakon vezivanja VEGF-C proteina za odgovarajuće receptore na endotelnim ćelijama limfnih sudova, dolazi do njihove proliferacije i migracije, što je preduslov za stvaranje novih limfnih sudova i diseminaciju malignih ćelija limfnim putevima.

U ovom delu eksperimentalnog rada odabrali smo seriju od 75 uzoraka arhivskih trajnih preparata papilarnog karcinoma štitaste žlezde. Kliničko-patološki parametri ove grupe pacijenata dati su u **Tabeli 15**.

Tabela 15. Kliničko-patološki podaci za 75 slučajeva papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

Kliničko-patološki podaci		PTC (n=75)
Starost (godine)	Srednja vrednost (opseg)	48.24 (11-76)
	<45	29 (38.67%)
	≥45	46 (61.33%)
Pol	Ž:M	59:16
LNM	Prisustvo	27 (36.00%)
EI	Prisustvo	28 (37.33%)
Veličina tumora (mm)	Srednja vrednost (opseg)	27.09 (3-100)
pT	T1	25
	T2	14
	T3	9
	T4	27
pTNM	I	41
	II	4
	III	9
	IV	21
Početni stadijumi	I/II	45
Uznapredovali stadijumi	III/IV	30
LNM: metastaze u limfnim čvorovima		
EI: ekstratiroidna invazija		
pT i pTNM status: prema AJCC (American Joint Committee on Cancer), detaljnije u Materijalu i Metodama		

U ovoj seriji tkivnih uzoraka papilarnog karcinoma (n=75), kao i u seriji uzoraka tkiva anaplastičnog karcinoma (n=30), koja je korišćena u prethodnim ispitivanjima, analizirali smo imunohistohemijskom metodom ekspresiju VEGF-C proteina. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u **Tabeli 16.**

Tabela 16. Imunohistohemijska ekspresija VEGF-C proteina u papilarnom (PTC) i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde (ATC).

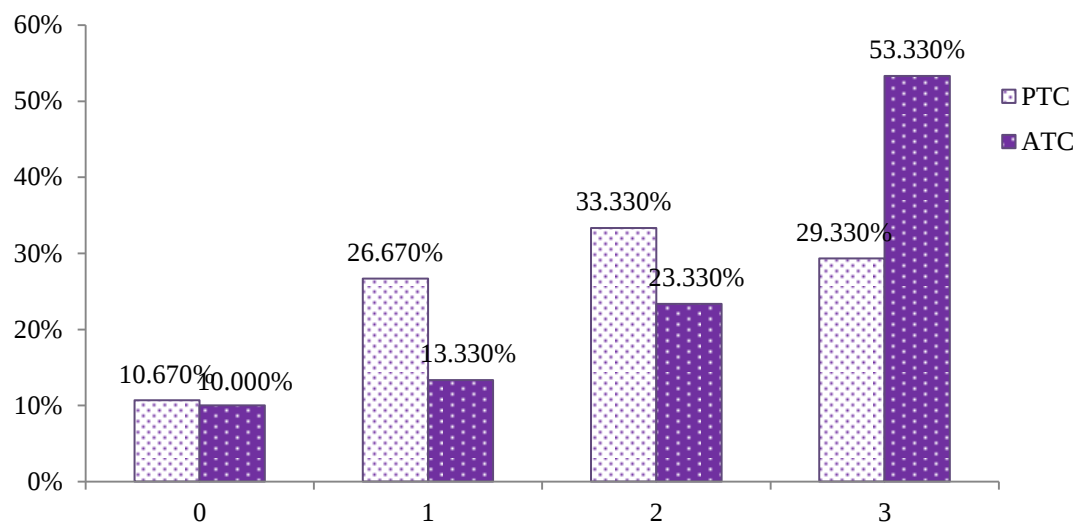
Analizirano tkivo	VEGF-C			
PTC (n=75)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	8	20	25	22
	67/75 (89.33%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	28		47 (62.67%)	
ATC (n=30)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	3	4	7	16
	27/30 (90.00%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	7		23 (76.67%)	

Intenzitet obojenosti: - (0) izostanak bojenja; +/- (1) slabo ili fokalno bojenje; + (2) umereno bojenje u većini ćelija; ++ (3) jako bojenje u većini ćelija.

Citoplazmatska ekspresija VEGF-C proteina detektovana je u 67 od 75 uzoraka tkiva papilarnog karcinoma, pri čemu je 47 uzoraka (62.7%) pokazivalo visoku ekspresiju (ocena intenziteta imunohistohemijske ekspresije 2 i 3).

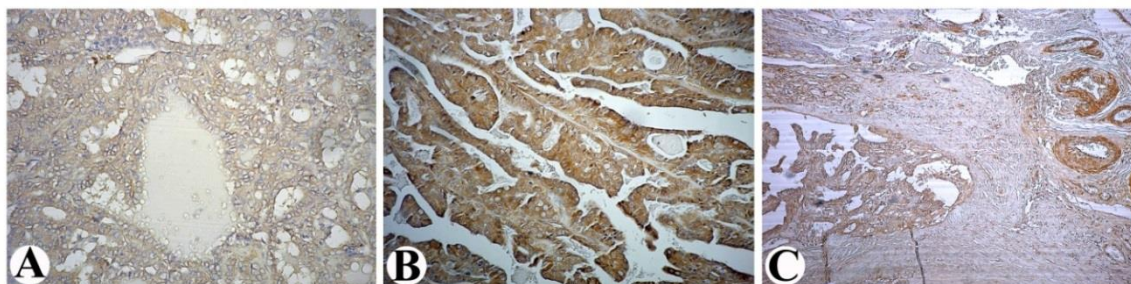
U tkivnim uzorcima anaplastičnog karcinoma citoplazmatska ekspresija VEGF-C proteina detektovana je u 27 od 30 slučajeva, pri čemu je visoka ekspresija bila prisutna u 23 (76.7%) slučajeva.

Grafička ilustracija distribucije ocena intenziteta imunohistohemijskog bojenja na VEGF-C u uzorcima papilarnog i anaplastičnog karcinoma prikazana je u **Histogramu 5.**

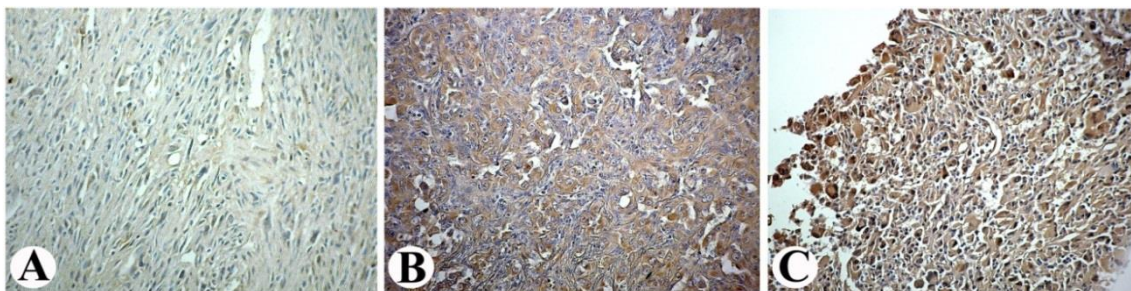


Histogram 5. Distribucija ocena intenziteta imunohistohemijskog bojenja na VEGF-C u uzorcima papilarnog (PTC) i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (ATC).

Imunohistohemijska ekspresija VEGF-C u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde prikazana je na **Slikama 28 i 29**.



Slika 28. Imunohistohemijska ekspresija VEGF-C u papilarnom karcinomu štitaste žlezde. **A)** Umerena ekspresija VEGF-C u malignim ćelijama tkiva papilarnog karcinoma. **B)** Intenzivna ekspresija VEGF-C u malignim ćelijama tkiva papilarnog karcinoma. **C)** Osim u malignim ćelijama, VEGF-C protein detektovan je i u endotelu vaskulature u peritumorskom tkivu (okolnom nemalignom tkivu koje je susedno tumorskoj masi).



Slika 29. Imunohistohemijska ekspresija VEGF-C u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde. **A)** Negativna ekspresija VEGF-C (odsustvo imunohistohemijskog bojenja). **B)** Umerena ekspresija VEGF-C u malignim ćelijama tkiva anaplastičnog karcinoma. **C)** Intenzivna ekspresija VEGF-C u malignim ćelijama tkiva anaplastičnog karcinoma.

4.13. Poređenje ekspresije VEGF-C proteina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde

Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije VEGF-C proteina u uzorcima pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde poređeni su sa kliničko-patološkim parametrima ovih pacijenata (n=75, prikazanih u **Tabeli 15**).

Tabela 17. Poređenje između kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije VEGF-C u 75 slučajeva papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

PTC (n=75) Kliničko-patološki podaci		VEGF-C ekspresija		p ^a	p ^b
		niska ekspresija	visoka ekspresija		
Starost	<45	13	16	0,226	
	≥45	14	32		
Pol	Ženski	20	39	0,560	
	Muški	7	9		
Veličina tumora	≤2 cm	14	19	0,340	
	>2 cm	13	29		
LNM	Prisutne	2	25	<0.001 ^c	<0.001
	Odsutne	25	23		
EI	Prisutna	4	24	0.003 ^c	0,002
	Odsutna	23	24		
pT	T1	11	14	0.025 ^c	
	T2	7	7		
	T3	5	4		
	T4	4	23		
	T1-T2	18	21	0,091	0,033
	T3-T4	9	27		
pTNM	I	18	23	0.071 ^c	
	II	3	1		
	III	2	7		
	IV	4	17		
Početni stadijumi	I/II	21	24	0,027	0,001
Uznapredovali stadijumi	III/IV	6	24		

LNM: metastaze u limfnim čvorovima

EI: ekstratiroidna invazija

pT i pTNM status: prema AJCC (American Joint Committee on Cancer), detaljnije u Materijalu i Metodama

^aChi-square test

^bMann-Whitney test

^cFisher's exact test

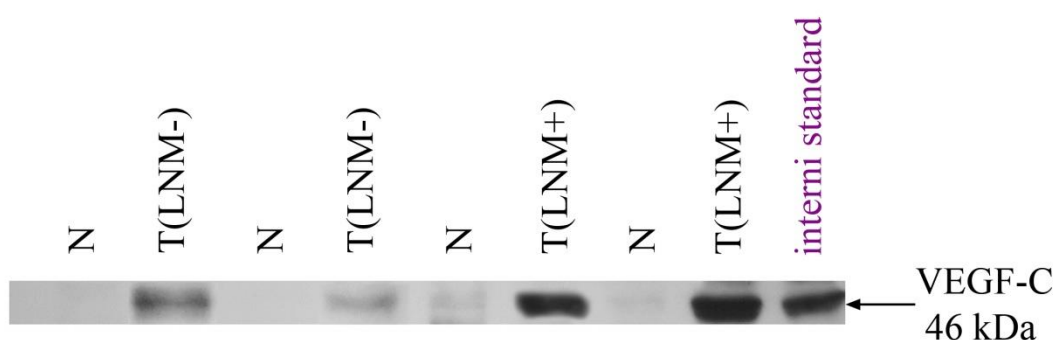
Poređenje između ekspresije VEGF-C i kliničko-patoloških parametara pacijenata sa papilarnim karcinomom pokazalo je (uz primenu navedenih statističkih testova) da je visoka ekspresija VEGF-C bila statistički značajno veća kod pacijenata koji su imali prisutne limfne metastaze u limfnim čvorovima i prisustvo ekstratiroidne invazije. Statistički značajne razlike nađene su i u poređenju pT statusa tumora, mada bez linearne korelacije između ovih grupa. Uznapredovali stadijumi tumorske bolesti (stadijumi III/IV) pokazali su statistički značajnu razliku u imunohistohemijskoj ekspresiji VEGF-C u odnosu na početne stadijume (stadijumi I/II).

4.14. Imunoblot analiza i denzitometrijska kvantifikacija traka koje odgovaraju VEGF-C proteinu iz tkivnih uzoraka pacijenata sa papilarnim karcinomom sa prisustvom/odsustvom metastaza u limfnim čvorovima

Hirurški odstranjeno tkivo pacijenata sa karcinomom štitaste žlezde preuzeto je neposredno posle operacije i čuvano zamrznuto do upotrebe. Ako je bilo dostupno, preuzeto je i normalno tkivo žlezde iz suprotnog lobusa.

Od ovih uzoraka pripremljeni su tkivni homogenati, u kojima je nakon elektroforetskog razdvajanja proteina urađen imunoblot („Western blot“), uz primenu specifičnih antitela na VEGF-C protein, na način kako je detaljno opisano u sekciji Materijal i metode.

Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na **Slici 30**.



Slika 30. Imunoblot analiza ekspresije VEGF-C u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma sa prisustvom (T LNM+) ili odsustvom metastaza u limfnim čvorovima (T LNM-), i normalno tkivo istog pacijenta (N).

Rezultati imunoblot analize tkivnih homogenata pacijenata sa dijagnozom papilarnog karcinoma, koji imaju podatke o prisustvu/odsustvu metastaza u limfnim čvorovima, nakon elektroforetskog razdvajanja proteina iz tkivnih homogenata i uz primenu specifičnih antitela na VEGF-C, pokazali su razliku u ekspresiji VEGF-C između tumora sa prisustvom i odsustvom limfnih metastaza. Metastatski papilarni karcinomi (T LNM+) imali su veću ekspresiju VEGF-C proteina u poređenju sa nemetastatskim karcinomima (T LNM-). Takođe, interesantan podatak, koji se vidi iz ovih rezultata, je da se u peritumorskom tkivu (nemaligno tkivo susedno tumorskoj masi), imunoblotom detektuje prisutnost VEGF-C.

Wilcoxon-ov statistički test za vezane uzorke koristili smo za poređenje ekspresije VEGF-C proteina (određene denzitometrijskom kvantifikacijom) između uzoraka papilarnog karcinoma i uzoraka peritumorskog tkiva poreklom od istog pacijenta. Rezultati su prikazani u **Tabeli 18**.

Tabela 18. Osnovni statistički podaci i Wilcoxon-ov statistički test za vezane uzorke. Poređenje ekspresije VEGF-C proteina (određene denzitometrijskom kvantifikacijom) između uzoraka papilarnog karcinoma i uzoraka peritumorskog tkiva poreklom od istog pacijenta.

Statistički podaci	Analizirano tkivo	
	Tumorsko tkivo	Peritumorsko tkivo
Broj slučajeva	9	9
Medijana	0,436	0,048
Standardna devijacija	0,433	0,096
Opseg	1,080	0,270
Minimum	0,000	0,000
Maksimum	1,080	0,270
Percentili		
	25	0,367
	75	0,929
Wilcoxon-ov test	0,018	

Ovi rezultati pokazuju da je u tumorskom tkivu prisutna statistički značajno veća količina sintetisanog VEGF-C proteina nego u okolnom peritumorskom tkivu istog pacijenta.

Mann-Whitney statistički test smo koristili za poređenje ekspresije VEGF-C proteina (određene denzitometrijskom kvantifikacijom) između uzoraka papilarnog karcinoma koji imaju prisutne metastaze u limfnim čvorovima i uzoraka koji nemaju limfne metastaze.

Tabela 19. Osnovni statistički podaci i Mann-Whitney statistički test za poređenje ekspresije VEGF-C proteina (određene denzitometrijskom kvantifikacijom) između uzoraka papilarnog karcinoma koji imaju prisutne metastaze u limfnim čvorovima i uzoraka koji ih nemaju.

Statistički podaci	Analizirano tkivo	
	PTC (LNM+)	PTC (LNM-)
Broj slučajeva	7	24
Medijana	0,858	0,055
Standardna devijacija	0,690	0,184
Opseg	2,140	0,820
Minimum	0,150	0,000
Maksimum	2,290	0,820
Percentili		
	25	0,436
	75	1,000
Mann-Whitney test	p<0,001	

Ovi rezultati pokazuju da je ekspresija VEGF-C proteina statistički značajno veća u metastatskim nego u nemetastatskim tumorima.

4.15. Analiza imunohistohemijske ekspresije VEGF-C u uzorcima tkiva papilarnog karcinoma u poređenju sa metastatskim tkivom u limfnim čvorovima istog pacijenta

U ovom delu eksperimentalnog rada ispitivali smo imunohistohemijskom metodom da li postoji razlika u ekspresiji VEGF-C proteina između primarnog tumora i njegovog metastatskog tkiva u limfnom čvoru.

Uzorci ukalupljenog tkiva papilarnog karcinoma sa sparenim ukalupljenim metastatskim tkivom iz limfnih čvorova istog pacijenta, koji su preuzeti iz baze arhivskog materijala Centra za endokrinu hirurgiju KCS (n=15), i korišćeni u analizi ekspresije survivina između primarnog tumora i metastatskog tkiva istog pacijenta, korišćeni su takođe u ovom delu eksperimentalnog rada. Rezultati ispitivanja imunohistohemijske ekspresije VEGF-C u primarnim tumorima i njihovom metastatskom tkivu dati su u **Tabeli 20**.

Tabela 20. Imunohistohemijska ekspresija VEGF-C u primarnim karcinomima (PTC) i njihovim metastazama u limfnim čvorovima (LNM).

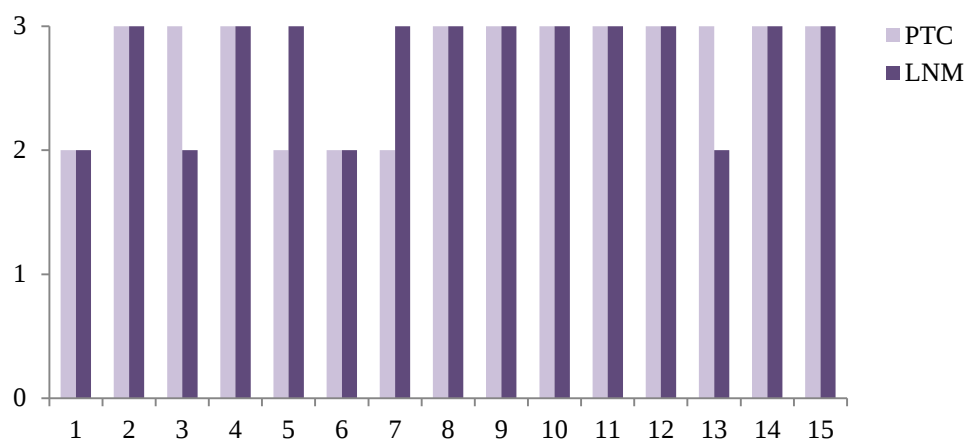
Analizirano tkivo	VEGF-C			
PTC (n=15)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	0	0	4	11
	15/15 (100%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	0		15 (100%)	
LNM (n=15)	- (0)	-/+ (1)	+	++ (3)
	0	0	4	11
	15/15 (100%)			
	niska ekspresija		visoka ekspresija	
	0		15 (100%)	

Intenzitet obojenosti: - (0) izostanak bojenja; -/+ (1) slabo ili fokalno bojenje; + (2) umereno bojenje u većini ćelija; ++ (3) jako bojenje u većini ćelija.

Analiza imunohistohemijske ekspresije VEGF-C u primarnim karcinomima (PTC) i njihovim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima istog pacijenta, pokazala je da je visoka ekspresija VEGF-C proteina prisutna u svim analiziranim primarnim tumorima papilarnog karcinomima (svih 15 uzoraka imalo je visoku ekspresiju VEGF-C, pri čemu je 4 uzorka imalo umereno, a ostali intenzivno bojenje na VEGF-C). U

metastatskom tkivu papilarnog karcinoma takođe su svi uzorci imali visoku ekspresiju VEGF-C, sa malim razlikama u intenzitetu imunohistohemijskog bojenja.

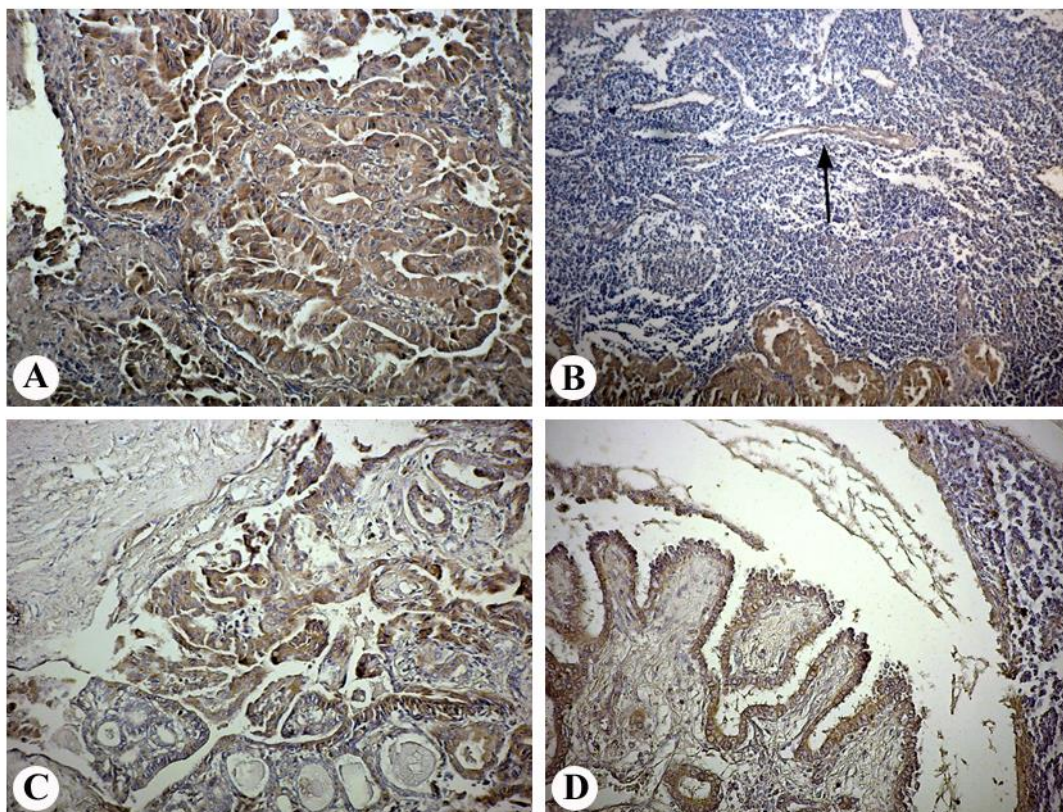
U Histogramu 6 prikazano je poređenje imunohistohemijskog ocenjivanja ekspresije VEGF-C u primarnim papilarnim karcinomima i njihovom sparenom metastatskom tkivu u limfnim čvorovima.



Histogram 6. Grafička ilustracija pojedinačnih ocena imunohistohemijske ekspresije VEGF-C proteina za primarne papilarne karcinome štitaste žlezde i njihova metastatska tkiva u limfnim čvorovima.

Ovaj histogram pokazuje da je visoka imunohistohemijska ekspresija VEGF-C, koja je dokumentovana u primarnim papilarnim karcinomima štitaste žlezde, takođe očuvana u metastatskom tkivu. Iako svi uzorci limfnih metastaza imaju visoku ekspresiju VEGF-C proteina, dva slučaja metastatskog tkiva su imala nižu ekspresiju, a dva višu ekspresiju VEGF-C proteina u odnosu na njihov primarni tumor (imunohistohemijsko ocenjivanje 2 ili 3).

Na **Slici 31** prikazana je imunohistohemijska ekspresija VEGF-C proteina u primarnim tumorima (papilarni karcinom štitaste žlezde) u poređenju sa metastatskim tkivom u limfnom čvoru istog pacijenta. Ove slike dokumentuju da je visoka ekspresija VEGF-C prisutna i u metastatskom tkivu.



Slika 31. Imunohistohemijska ekspresija VEGF-C u tkivu papilarnog karcinoma i metastatskom tkivu u regionalnom limfnom čvoru istog pacijenta. Intenzivno bojenje na VEGF-C u primarnom tumoru **(A)** i u metastatskom tkivu u limfnom čvoru **(B)**. Na ovoj slici strelicom je označen limfni sud koji pokazuje pozitivno bojenje na VEGF-C. Umereno bojenje na survivin u primarnom tumoru **(C)** i u metastatskom tkivu u limfnom čvoru **(D)**.

Zaključak ovih eksperimenata je da je visoka ekspresija VEGF-C proteina prisutna i u primarnim tumorima i u ćelijama karcinoma koje su metastazirale u limfne čvorove.

4.16. Korelacija imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma

U seriji tkivnih uzoraka pacijenata sa papilarnim karcinomom štitaste žlezde (n=75), čiji su kliničko-patološki podaci dati u **Tabeli 15**, u prethodnom delu eksperimentalnog rada analizirana je ekspresija VEGF-C imunohistohemijskom metodom (rezultati dati u **Tabeli 16**). Da bismo proverili da li postoji korelacija između ekspresije survivina i VEGF-C, ovu seriju uzoraka papilarnog karcinoma, uz imunohistohemijsko bojenje na VEGF-C, obojili smo uporedno i na survivin, što je omogućilo poređenje ekspresije ova dva proteina u malignom tkivu istog pacijenta.

Rezultati uporedne analize imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C u papilarnom i anaplastičnom karcinomu dati su **Tabeli 21**.

Ovi rezultati pokazuju da je u tkivu papilarnog karcinoma visoka ekspresija survivina nađena u 47 od 75 slučajeva (62.7%), a visoka ekspresija VEGF-C u 48 od 75 slučajeva (64%), dok je u tkivu anaplastičnog karcinoma visoka ekspresija survivina bila prisutna u 26 od 30 slučajeva (86.7%), a VEGF-C proteina u 23 od 30 (76.7%).

Tabela 21. Imunohistohemijska ekspresija survivina i VEGF-C proteina za 75 slučajeva papilarnog (PTC) i 30 slučajeva anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (ATC).

PTC (n=75)	survivin ekspresija			
	0	1	2	3
	7	21	19	28
	VEGF-C ekspresija			
	0	1	2	3
	7	20	26	22
ATC (n=30)	survivin ekspresija			
	0	1	2	3
	2	2	6	20
	VEGF-C ekspresija			
	0	1	2	3
	3	4	7	16

Intenzitet obojenosti: - (0) izostanak bojenja; -/+ (1) slabo ili fokalno bojenje; + (2) umereno bojenje u većini ćelija; ++ (3) jako bojenje u većini ćelija.

U sledećem koraku primenili smo Spearman-korelacioni statistički test da bismo proverili postojanje korelacije imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C

proteina u uzorcima tkiva istog pacijenta sa papilarnim karcinomom. Rezultati ove analize dati su u **Tabeli 22**.

Tabela 22. Korelacioni koeficijent prema Spearman-u između ekspresije survivina i VEGF-C proteina za 75 slučajeva papilarnog karcinoma štitaste žlezde (PTC).

	survivin
VEGF-C	Rs=0.878** p<0.001

**korelacioni koeficijent za nivo značajnosti 0.01

Primenom Spearman-korelacionog testa, ovi rezultati su pokazali da postoji statistički značajna korelacija između imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C proteina u uzorcima tkiva istih pacijenata sa dijagnozom papilarnog karcinoma.

Spearman-korelacioni statistički test takođe smo primenili da bismo proverili postojanje korelacije imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C proteina u uzorcima tkiva istog pacijenta sa anaplastičnim karcinomom.

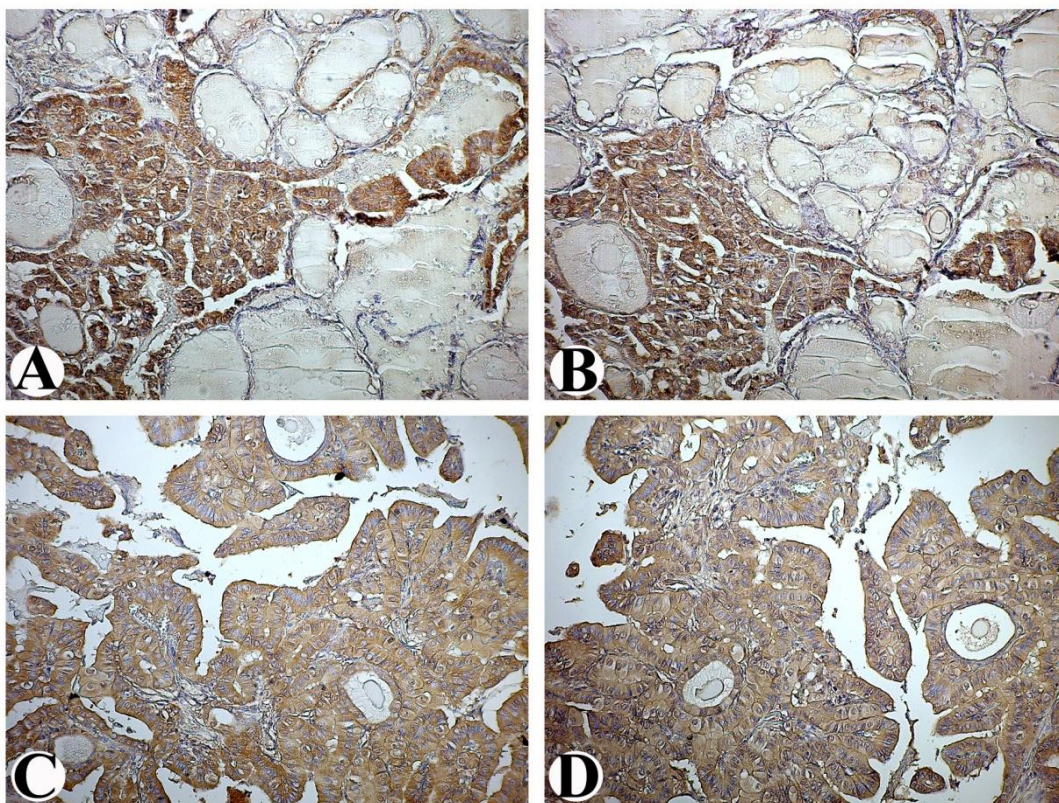
Tabela 23. Korelacioni koeficijent prema Spearman-u između ekspresije survivina i VEGF-C proteina za 30 slučajeva anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde (ATC).

	survivin
VEGF-C	Rs=0.647** p<0.001

**korelacioni koeficijent za nivo značajnosti 0.01

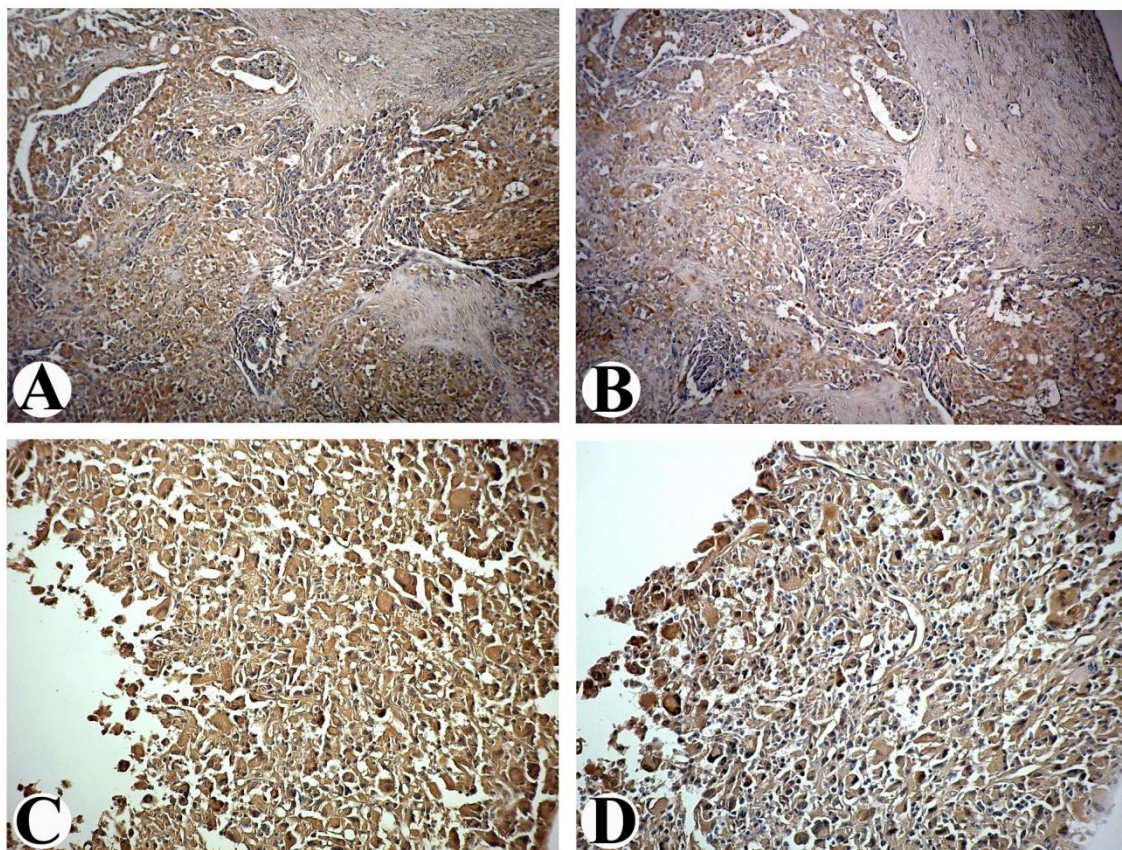
Spearman-korelacioni test je pokazao postojanje korelacije između ekspresije survivina i VEGF-C proteina u uzorcima istih pacijenata sa anaplastičnim karcinomom.

Ilustracija korelacije imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C u papilarnom karcinomu štitaste žlezde prikazana je na **Slici 32**.



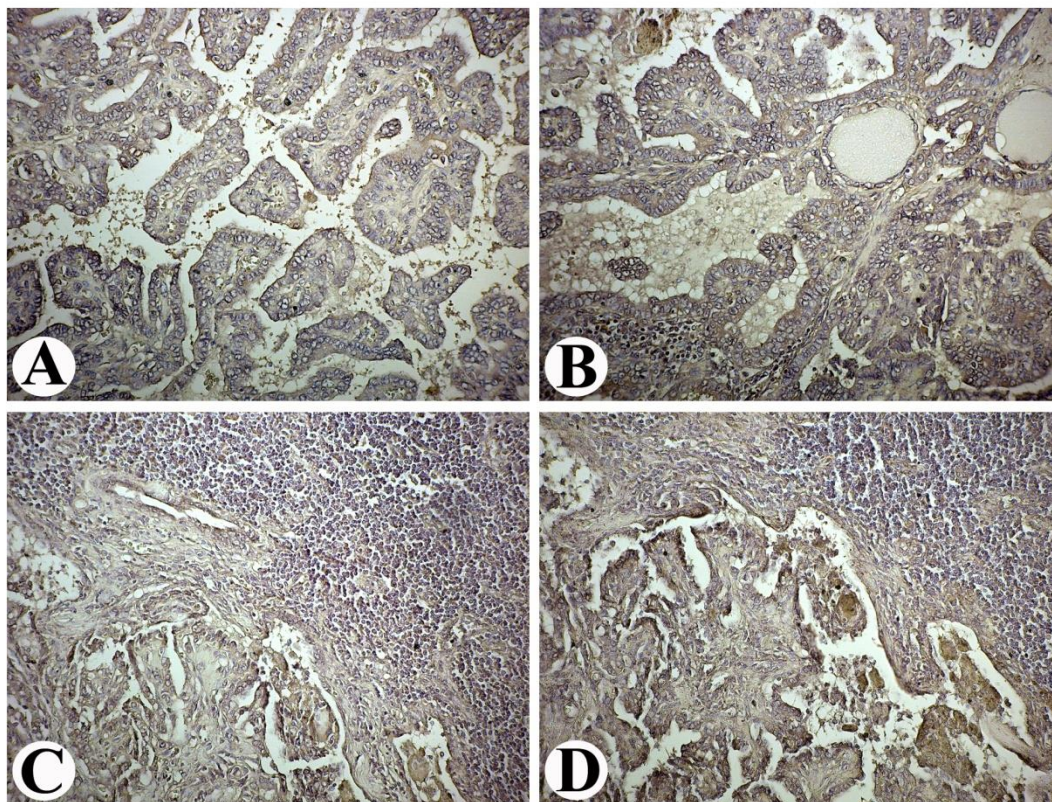
Slika 32. Korelacija imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C u papilarnom karcinomu štitaste žlezde. Visoka ekspresija survivina **(A)** i VEGF-C proteina **(B)** u papilarnom karcinomu istog pacijenta. Visoka ekspresija survivina **(C)** i VEGF-C proteina **(D)** u papilarnom karcinomu drugog pacijenta.

Ilustracija korelacije imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde prikazana je na **Slici 33**.



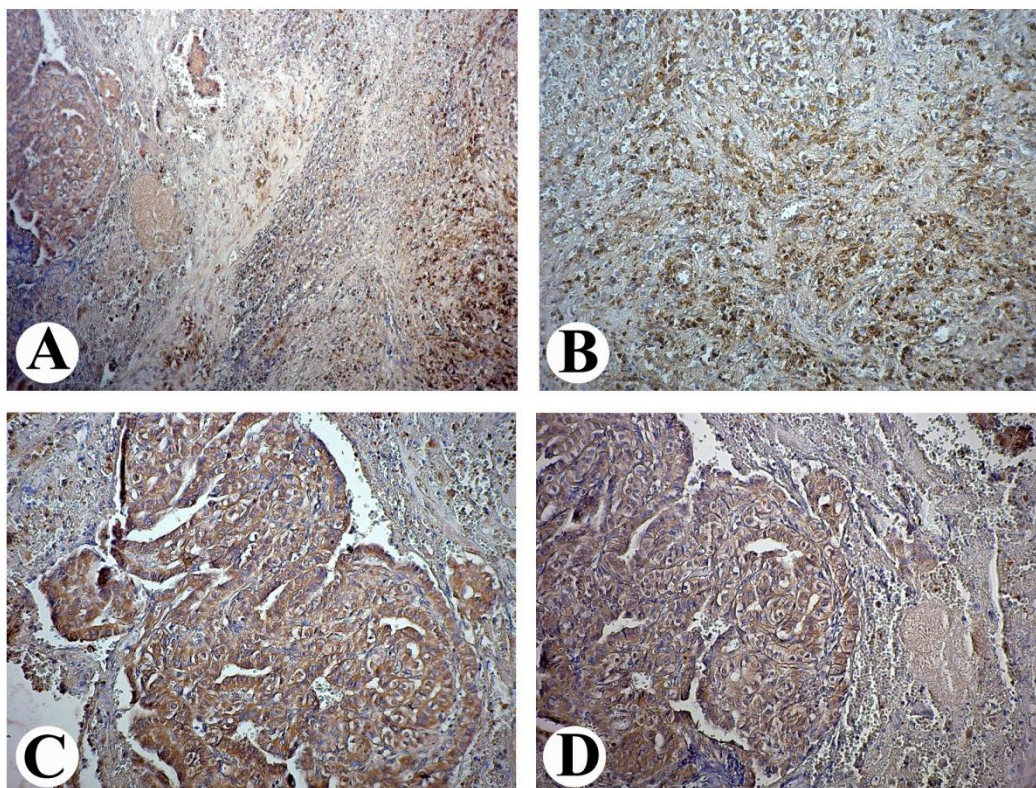
Slika 33. Korelacija imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C u anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde. Uporedno imunohistohemijsko bojenje na survivin **(A)** i VEGF-C protein **(B)** u anaplastičnom karcinomu istog pacijenta. Uporedno imunohistohemijsko bojenje na survivin **(C)** i VEGF-C protein **(D)** u anaplastičnom karcinomu istog pacijenta.

Na **Slici 34** prikazano je tkivo pacijenta sa papilarnim karcinomom koje je uporedno obojeno na survivin i VEGF-C u primarnom tumoru i njegovoj limfnoj metastazi.



Slika 34. Korelacija imunohistohemijske ekspresije survivina (**A**) i VEGF-C proteina (**B**) u primarnom tumoru pacijenta sa papilarnim karcinomom i njegovom metastatskom tkivu u limfnom čvoru (**C**-survivin, **D**-VEGF-C).

Na **Slici 35** prikazan je anaplastični karcinom sa ostatkom prethodno-postojećeg papilarnog karcinoma.



Slika 35. Anaplastični karcinom sa ostatkom papilarnog karcinoma. **(A)** Pozitivno imunohistohemijsko bojenje na survivin prisutno je u papilarnom karcinomu (levo) i u anaplastičnom karcinomu (desno). **(B)** Imunohistohemijsko bojenje na survivin u anaplastičnoj zoni karcinoma. Uporedno bojenje na survivin **(C)** i VEGF-C protein **(D)** u zoni papilarnog karcinoma, koje pokazuje korelaciju ekspresije ova dva proteina u istom tkivnom uzorku.

5. DISKUSIJA

Malignom transformacijom folikularne epitelne ćelije štitaste žlezde nastaju karcinomi koji se generalno svrstavaju u dve kategorije: diferencirani (papilarni i folikularni karcinomi) i nediferencirani (anaplastični) karcinom, koje se razlikuju u biološkim karakteristikama i kliničkom ponašanju.

Papilarni karcinomi štitaste žlezde čine oko 80% ukupnih tiroidnih maligniteta, rastu sporo, imaju tendenciju ka stvaranju regionalnih limfnih metastaza i uglavnom imaju dobru prognozu. Nasuprot tome, anaplastični karcinom, koji čini manje od 5% tiroidnih maligniteta, odlikuje se brzim lokalnim rastom, uz istovremeno stvaranje regionalnih limfnih i udaljenih hematogenih metastaza. Anaplastični karcinom neizostavno završava brzim letalnim ishodom. Nekada se smatralo da anaplastični karcinom nastaje *de novo* transformacijom tiroidnog folikularnog epitela u ovu vrstu karcinoma, međutim danas preovladava mišljenje da anaplastični karcinom nastaje postepeno od prethodno postojećeg diferenciranog karcinoma daljom progresijom uz gubitak morfološke i funkcionalne diferencijacije.

Molekularni mehanizmi maligne transformacije epitelnih tiroidnih ćelija, i pored brojnih napora istraživača u ovoj naučnoj oblasti, još uvek nisu potpuno razjašnjeni, pa je teško razumeti kako od veoma dobro diferencirane specijalizovane tiroidne ćelije, koja se u adultnom organizmu odlikuje niskim mitotičkim indeksom, nastaje strukturno i funkcionalno nediferencirana ćelija, programirana za neprestane deobe i neosetljiva na normalne kontrolne mehanizme.

Maligna ćelija, da bi ostvarila svoju misiju (neprestana multiplikaciju i preživljavanje), mora da „nadmudri“ kontrolne mehanizme koje je organizam razvio da bi regulisao kontrolu ćelijskog ciklusa i programiranu ćelijsku smrt- apoptozu. Apoptoza je genski strogo kontrolisan mehanizam kojim se otklanjaju ostarele, suvišne i nepoželjne ćelije.

Misija maligne ćelije je i zauzimanje novih prostora, a za to je potrebno dodatno snabdevanje tumorskog tkiva nutritivnim faktorima i stvaranje nove vaskulature, koja će to obezbediti.

Promene na molekularnom nivou koje omogućavaju malignoj ćeliji kontinuiranu aberantnu stimulaciju rasta i izbegavanje apoptotske smrti, uz formiranje novih krvnih i limfnih sudova, predstavljaju preduslov tumorskog rasta i širenja, tj. progresije maligniteta.

Predmet ovog rada bio je izučavanje molekularnih promena koje prate dediferencijaciju papilarnog u anaplastični karcinom štitaste žlezde, tj. ispitivanje promena ekspresionih profila apoptotskih molekula (Bcl-2, Bax, survivin) i limfangiogenog faktora (VEGF-C), njihova uloga u biologiji tumora i korelacija sa kliničkim parametrima tokom progresije maligniteta tumora štitaste žlezde.

* * *

Dosadašnja izučavanja procesa programirane ćelijske smrti, apoptoze, u različitim humanim tumorima, pokazala su da u ovom složenom procesu važnu ulogu ima Bcl-2 familija strukturno homologih proteina, od kojih neki imaju anti-apoptotsku (predstavnik Bcl-2 protein), a neki pro-apoptotsku ulogu (predstavnik Bax). Bcl-2 molekul čuva integritet mitohondrijalne membrane, a Bax protein omogućava njenu dezintegraciju i sledstveno oslobađanje citohroma C, čime se obezbeđuje dalja propagacija signala koji vodi aktivaciji kaspaza, proteolitičkih enzima koji su finalni egzekutori ćelijske smrti (Cory i Adams, 2002; Burlacu, 2003; Kirkin i sar., 2004).

Da bismo dobili uvid u moguće defekte u apoptotskom putu, u prvom delu eksperimentalnog rada analizirali smo ekspresione profile apoptotskih molekula, Bcl-2 i Bax, u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde. Rezultati imunohistohemijske analize pokazali su visoku ekspresiju Bcl-2 proteina u tkivu papilarnog karcinoma, dok je u anaplastičnom karcinomu ekspresija ovog proteina značajno manja u odnosu na papilarni. Visoke ekspresione nivoe Bax proteina, koji nije prisutan u normalnom tkivu, našli smo i u papilarnom i u anaplastičnom karcinomu, što pokazuje da je „up-regulacija“ Bax gena rani događaj u tiroidnoj tumorogenezi.

U nekim humanim malignitetima nastalim od epitelних tkiva, kao što su karcinomi jajnika, prostate, pluća, gastrointestinalnog trakta, mokraćne bešike, nađeni su povećani nivoi Bcl-2, anti-apoptotskog proteina (Thompson, 1995), koji mogu da znače lošu prognozu, jer ovi tumori ne odgovaraju adekvatno na primenjenu terapiju (izostaje efekat apoptotske smrti ćelija). Međutim, prognostička vrednost povećane Bcl-2 ekspresije izgleda da zavisi od tipa tumora i u nekim slučajevima nije u korelaciji sa progresijom bolesti. Tako je npr. u metastatskom karcinomu dojke niska ekspresija Bcl-2 povezivana sa lošijom prognozom (Chang i sar., 2003).

Ekspresija Bcl-2 proteina izučavana je i u tiroidnom tkivu. Ovi radovi pokazali su da normalno tkivo štitaste žlezde eksprimira visoke nivoe Bcl-2 proteina, što je objašnjeno time da se tiroidne ćelije u normalnim fiziološkim uslovima (adekvatno snabdevanje jodom i nutritivnim faktorima, uz funkcionisanje svih regulatornih mehanizama koji kontrolišu njihovu funkciju i rast), na ovaj način štite od apoptotske smrti ćelija (Moore i sar., 1998).

Zapažanja slična našim, tj. inverzna korelacija između ekspresije Bcl-2 proteina i stepena diferencijacije tiroidnih karcinoma, objavili su i drugi istraživači koji su se bavili ovom problematikom (Pilotti i sar., 1994; Pollina i sar., 1996).

Iz ovoga se može izvesti zaključak da je, suprotno nekim drugim humanim tumorima, opadanje sinteze anti-apoptotskog proteina, Bcl-2, u malignim tiroidnim tumorima, znak njihove progresije i lošije prognoze.

Bax, predstavnik pro-apoptotskih faktora Bcl-2 familije proteina, manje je izučavan u modelu tiroidne kancerogeneze, nego Bcl-2 protein. Povećana ekspresija Bax proteina nađena je u nekim humanim tumorima, što bi ukazivalo na njihovu sposobnost da aktivacijom apoptotskog procesa otklanjaju transformisane ćelije. To bi značilo da je visok nivo Bax proteina zaslužan za “dobru biologiju” tumora i dobar odgovor pacijenta na terapiju koja indukuje DNK oštećenja, kao što je radioterapija. Sledstveno tome, defekti u ekspresiji Bax-a, nađeni u metastatskom kolorektalnom kanceru (Sturm i sar., 1999), dovode se u vezu sa lošom prognozom ovih pacijenata.

Radovi koji su izučavali ekspresiju Bax proteina u tiroidnim tumorima su malobrojni i do sada su dali kontraverzne rezultate. Poređenjem ekspresije Bax-a u benignom i malignom tiroidnom tkivu, konstatovano je smanjenje ekspresije ovog proteina u karcinomima (Brockner i sar., 1996), dok su drugi istraživači našli povećane nivoe ovog proteina u karcinomima u odnosu na benigne tumore (Hermann i sar., 2001), ali su se složili u tome da Bax nije prisutan u normalnom tiroidnom tkivu.

Nalazi različitog trenda u promenama ekspresije Bcl-2 i Bax-a naveli su nas da uporedimo njihov odnos (Bcl-2/Bax) u papilarnim i anaplastičnim tiroidnim karcinomima.

Odnos antiapoptotskih i proapoptotskih molekula, prema osnovnim postulatima u ovoj oblasti, ima glavnu ulogu u odlučivanju sudbine ćelije, tj. da li će krenuti putem

samoubistva apoptotskom smrću ili nastaviti da živi kao izmenjena, transformisana ćelija. Bcl-2/Bax odnos, koji je predstavljen kao odnos srednjeg stepena intenziteta njihove ekspresije u analiziranim karcinomima, pokazao je značajno smanjenje u anaplastičnom, u poređenju sa papilarnim karcinomom.

Zaključak ovog dela naših eksperimenata je da tokom progresije od diferenciranog ka nediferenciranom (anaplastičnom) karcinomu dolazi do molekularnih promena koje se ogledaju u izmenjenoj ekspresiji anti-apoptotskih i pro-apoptotskih proteina. S obzirom da odnos anti-apoptotskog molekula (Bcl-2) i pro-apoptotskog molekula (Bax) „ide u korist“ Bax molekula, trebalo bi očekivati da će povećani proliferativni kapacitet, koji je odlika veoma agresivnog karcinoma kakav je anaplastični, biti kompenzovan adekvatnim odgovorom organizma, tj. aktivacijom signalne kaskade koja vodi apoptotskoj smrti maligne ćelije.

U sledećem koraku, da bismo proverili kako se promene u odnosu anti-apoptotskih i pro-apoptotskih proteina reflektuju na programiranu ćelijsku smrt-apoptozu, određivali smo stepen apoptotske smrti u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma, tzv. TUNEL metodom (terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling method) koristeći Apop Tag kit za in situ detekciju apoptoze. Metoda se zasniva na detekciji dvolančanih prekida DNK molekula, koji se dešavaju pri proteolitičkoj degradaciji ćelije.

Analiza stepena apoptotske smrti, iskazanog kao apoptotski indeks, u ispitivanim slučajevima papilarnog i anaplastičnog karcinoma, pokazala je nizak stepen apoptoze u tiroidnim karcinomima, čak nešto niži u anaplastičnom nego u papilarnom karcinomu.

Zaključak ovih eksperimenata je da odnos Bcl-2 molekula i Bax molekula ne obezbeđuje propagaciju signala do finale faze (aktivacije proteolitičkih enzima), što ukazuje na postojanje drugih defekata duž apoptotske signalne kaskade nizvodno od mesta delovanja Bax proteina.

Osim što nemaju presudnu ulogu u finalizaciji apoptotske smrti ćelija tokom progresije maligniteta tiroidnih tumora, nego ostavljaju transformisanu ćeliju da preživljava i reprodukuje se, Bcl-2 i Bax nemaju niti prognostički značaj u predviđanju toka bolesti tiroidno-onkoloških pacijenata, na što ukazuje odsustvo korelacije njihove ekspresije sa

kliničko-patološkim parametrima agresivnog ponašanja tumora (limfne metastaze, ekstratiroidna invazija, uznapredovali stadijum bolesti).

* * *

S obzirom da su rezultati prvog dela našeg eksperimentalnog rada pokazali nizak stepen apoptoze u tkivima tiroidnih karcinoma uprkos visoke ekspresije pro-apoptotskog Bax proteina, u sledećem delu rada pokušali smo da identifikujemo druge molekulske defekte u apoptotskoj signalnoj kaskadi.

Nakon strukturne i funkcionalne karakterizacije članova Bcl-2 familije apoptotskih proteina, otkrivena je još jedna grupa regulatora apoptoze - IAP familija proteina (Inhibitor of apoptosis proteins). Članovi ove grupe proteina deluju nizvodno od Bax-a u apoptotskoj signalnoj kaskadi, tako što sprečavaju aktivaciju kaspaza, proteolitičkih enzima koji su finalni egzekutori apoptotske smrti. Survivin, najmanji član IAP familije, je prvo identifikovan kao bifunkcionalan protein, koji ima ulogu u inhibiciji apoptoze i u regulaciji ćelijskog ciklusa, gde je prisutan u G2-M fazi i učestvuje u formiranju deobnog vretena. Sledstveno tome, ovaj protein prisutan je u dva subćelijska odeljka, jedarnom i citoplazmatskom, tj. mitohondrijalnom, koji ima ulogu u njegovoj anti-apoptotskoj ulozi. Tačan mehanizam inhibitornog efekta survivina na apoptotsku smrt bio je predmet kontroverzi. Prvobitni rezultati u ovoj oblasti istraživanja sugerisali su da se survivin direktno vezuje za prokaspaze i onemogućava njihovu proteolitičku aktivaciju (Tamm i sar., 1998). Međutim, kasniji radovi pokazali su da nema direktne interakcije između survivina i kaspaza, nego da međusobne interakcije između članova IAP familije imaju regulatornu ulogu u apoptotskom procesu. Dakle, molekulske interakcije survivina i XIAP proteina, drugog člana IAP familije, dovode do inhibitornog efekta na aktivaciju kaspaza (Dohi i sar., 2004).

Tokom protekle decenije survivin je privukao veliku pažnju istraživača u ovoj oblasti. Naime, ovaj protein je eksprimiran tokom embrionalnog i fetalnog razvika, dok je u odraslom organizmu njegova ekspresija neznatna u većini organa. Međutim, utvrđeno je da mnogi humani tumori eksprimiraju survivin i da je nivo te ekspresije u korelaciji sa lošim prognostičkim faktorima pacijenata.

U našem radu analizirali smo ekspresiju survivina u tkivu papilarnog i anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde koristeći imunohistohemijsku i imunoblot (Western blot) metodu.

Imunohistohemijskim bojenjem detektovali smo ekspresiju survivina u citoplazmi malignih ćelija u velikom broju slučajeva (preko 90% kod oba tipa karcinoma), bez detekcije ekspresije u okolnom uslovno nemalignom tkivu. Visoka ekspresija (koju smo definisali ocenama 2 i 3) bila je prisutna kod oko 70% slučajeva papilarnog i oko 85% slučajeva anaplastičnog karcinoma. Ovo ukazuje na njegovo visoko prisustvo i u ranim fazama tumorogeneze sa tendencijom veće sinteze tokom maligne progresije, obzirom da je u papilarnom postojalo dominantno umereno, a u anaplastičnom dominantno intenzivno bojenje.

Prethodni radovi čiji je cilj bio izučavanje ekspresije survivina u tumorima štitaste žlezde dali su kontroverzne podatke o subćelijskoj lokalizaciji ovog proteina u malignom tkivu, a prema tome nisu mogli sugerisati njegovu ulogu u promovisanju ćelijskog ciklusa ili u inhibiciji apoptotskog procesa.

U prvoj imunohistohemijskoj studiji survivina u spektru tiroidnih neoplazija, koju su objavili Ito i saradnici (Ito i sar., 2003), konstatovano je da survivin nije prisutan u normalnom tkivu štitaste žlezde, ali se njegova ekspresija postepeno povećava u malignom tkivu prateći stepen dediferencijacije. Ovi autori su detektovali survivin u nukleusima malignih ćelija, što bi moglo sugerisati njegovu ulogu u promovisanju ćelijskog ciklusa, pogotovo u anaplastičnom (nediferenciranom) karcinomu, koji se odlikuje visokim proliferativnim kapacitetom. Za razliku od ovih zapažanja, radovi koji su usledili detektovali su survivin u citoplazmi karcinomskih ćelija štitaste žlezde (Antonaci i sar., 2008; Zhang i sar., 2009). Rezultati koje su objavili Antonaci i saradnici veoma su zanimljivi, jer su pokazali da se survivin detektuje već u papilarnom mikrokarcinomu (karcinomi papilarnog tipa manji od 1 cm, tzv. okultni karcinomi), što ukazuje da je “up-regulacija” gena za survivin rani događaj u tiroidnoj kancerogenezi.

Survivin je detektovan kao citoplazmatski i/ili jedarni protein i u drugim tipovima humanih maligniteta; npr. u karcinomu dojke izmenjen odnos citoplazmatskog i jedarnog survivina u korist jedarnog smatra se lošim prognostičkim znakom za ove pacijente.

U našim eksperimentima pokazali smo imunohistohemijskom metodom citoplazmatsku lokalizaciju survivina kako u papilarnom, tako i u nediferenciranom (anaplastičnom) karcinomu, što sugerije njegovu anti-apoptotsku ulogu u malignim ćelijama štitaste žlezde.

Poređenje srednjih ocena imunohistohemijskog bojenja survivina i dva člana Bcl-2 familije proteina (Bcl-2 i Bax) pokazalo je da tokom progresije od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu dolazi do smanjenja ekspresije Bcl-2, anti-apoptotskog proteina, što je praćeno povećanjem ekspresije survivina, proteina koji inhibira apoptozu, uz konstantnu visoku ekspresiju Bax proteina.

S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da u anaplastičnom karcinomu dolazi do povećanja ekspresije survivina, proteina koji inhibira apoptozu, u ovom delu eksperimentalnog rada korelisali smo imunohistohemijsku ekspresiju survivina u uzorcima tkiva anaplastičnog karcinoma sa stepenom apoptotske smrti ćelija u ovim uzorcima.

Stepen apoptotske smrti u uzorcima tkiva papilarnog i anaplastičnog karcinoma određivali smo TUNEL metodom, koristeći Apop Tag kit za in situ detekciju apoptoze. Ovi rezultati su pokazali da je u uzorcima tkiva sa visokom ekspresijom survivina apoptotski indeks bio značajno manji nego u uzorcima tkiva sa niskom ekspresijom survivina, što je ukazalo na efekte visokih koncentracija survivina na apoptotsku smrt ćelije.

Zaključak ovih eksperimenata je da tokom progresije maligniteta tumora štitaste žlezde dolazi do smanjenja ekspresije Bcl-2 proteina i do povećanja ekspresije survivina. Pro-apoptotski protein Bax, aktivira se u početnoj fazi maligne transformacije i ostaje na visokom nivou tokom tumorske progresije. Međutim, visoka ekspresija Bcl-2 (anti-apoptotskog proteina) u papilarnom karcinomu, a zatim visoka ekspresija survivina (takođe anti-apoptotskog proteina) u anaplastičnom karcinomu, onemogućavaju propagaciju apoptotskog signala, odnosno finalnu egzekuciju smrti ćelije. Na ovaj način maligna ćelija izbegava apoptotsku smrt.

S obzirom da je u prethodnim eksperimentima pokazano da se ekspresija survivina povećava tokom progresije maligniteta od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu i da povećana ekspresija survivina koreliše sa smanjenom apoptozom malignih ćelija, u

sledećem delu eksperimentalnog rada, da bismo dobili bolji uvid u moguće uloge survivina u biologiji tumora, poredili smo ekspresiju survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa papilarnim i anaplastičnim karcinomom.

U poređenju između ekspresije survivina i kliničko-patoloških parametara pacijenata sa papilarnim karcinoma štitaste žlezde, dobili smo značajnije veću ekspresiju kod pacijenata sa prisutnim metastazama u limfnim čvorovima, kao i kod pacijenata sa uznapredovalim stadijumom bolesti (prema TNM klasifikaciji, stadijumi III i IV), dok je veza sa dubinom invazije bila na granici statističke značajnosti. Korelacija visoke ekspresije survivina sa prisustvom limfnih metastaza nađena je i u anaplastičnom karcinomu, što je potvrdilo njegove veze sa metastazama i dalje tokom dediferencijacije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa radom Zhang-a i saradnika (Zhang i sar., 2009), koji su analizirali ekspresiju survivina na nivou informacione RNK i sintetisanog proteina u spektru neoplastičnih tiroidnih lezija i našli značajnu pozitivnu korelaciju ekspresije survivina sa histološkim tipom, kliničkim stadijumom i prisustvom limfnih metastaza. Karakteristika PTC je limfogeno širenje karcinomskih ćelija po organizmu, dok ATC karakteriše i hematogeno, kako bi se na sve načine obezbedio opstanak i dalji razvoj maligniteta.

Nalaz značajne korelacije između visoke ekspresije survivina u tumorskom tkivu i prisustva limfnih metastaza, dobijen na trajnim histološkim preparatima, proverili smo i imunoblotom na svežim uzorcima tkiva štitaste žlezde.

Ovi rezultati su pokazali da tkivo papilarnog karcinoma koji ima prisutne limfne metastaze sadrži veću količinu sintetisanog survivin proteina, nego tkivo papilarnog karcinoma koji nema prisutne limfne metastaze, kao i da normalno tkivo žlezde ne sintetiše survivin. Rezultati dobijeni imunoblotom bili su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim imunohistohemijskom analizom, a takođe su potvrdili i specifičnost primenjenih antitela na survivin.

Nadalje smo uporedili ekspresione profile survivina u primarnom tumoru i metastatskom tkivu (metastaza u limfnom čvoru) istog pacijenta. Ovi rezultati su pokazali da je visoka imunohistohemijska ekspresija survivina, koja je dokumentovana u primarnim papilarnim karcinomima štitaste žlezde, takođe očuvan i u njihovom metastatskom tkivu.

Zaključak ovog dela naših eksperimenata je da se ekspresija survivina postepeno povećava tokom progresije maligniteta od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu i u korelaciji je sa prisustvom limfnih metastaza i uznapredovalim stadijumima tumorske bolesti.

Molekularna osnova metastaza se nije do kraja razjasnila, i u toku su istraživanja veze ekspresionih profila između primarnih tumora i metastaza mnogih tipova karcinoma kako bi se razumeo potencijal nekih tumora ka ranom stvaranju metastaza, dok drugi ostaju klinički tihi godinama. Najnovije studije (Mehrotra , Cancer Cell, 2010) daju mogući predlog veze između survivina i metastatskog procesa. U ovoj studiji je pokazano su da neki članovi IAP familije (survivin i XIAP) direktni metastatski geni, i da njihova heterodimerizacija može da funkcioniše ne samo u smislu ćelijske invazije i pokretljivosti, već i generalno u ćelijskoj homeostazi. U njihovoj studiji dokazali su da intramolekulaska kooperacija između survivina i XIAP-a promoviše ćelijsku invaziju *in vitro* i metastatsku diseminaciju *in vivo*. Ovaj put delovanja survivina je nezavistan od njegove apoptotski-inhibitorne uloge. Zapravo ovaj protein ostvaruje svoju ulogu u metastatskom procesu delujući preko kompleksa sa XIAP-om i na taj način aktivirajući transkripcioni faktor NF κ B, dovodi do pojačane ekspresije fibronektina, tj. autokrine/parakrine signalizacije β 1 integrinima i konstitutivne fosforilacije (aktivacije) ćelijskih kinaza odgovornih za pokretljivost (FAK i Src).

Molekularni mehanizmi delovanja survivina u aberantnoj regulaciji ćelijskog ciklusa, inhibiciji apoptotske smrti i doprinosu metastatskom fenotipu karcinoma štitaste žlezde tek treba da budu predmet budućih istraživanja u ovoj oblasti. Trenutna saznanja i dostupni podaci ukazuju na jasnu vezu između visoke ekspresije survivina i nepovoljnih kliničkih parametara pacijenata sa tiroidnim karcinomima.

* * *

Pored ubrzane proliferacije i izbegavanja apoptotske smrti, za razvijanje tumora neophodna je i dostupnost nutritivnih elemenata, što se ostvaruje indukcijom angiogeneze. U gustoj tumorskoj masi potrebna je nova mreža krvnih sudova koja će obezbediti dalju progresiju tumora. Formiranje novih sudova od već postojeće vaskulature se definiše kao proces angiogeneze, i zna se da pored fizioloških procesa (embrionalno razviće, zarastanje rana), igra značajnu ulogu i u progresiji tumora i

nastanku metastaza (Folkman, 1990). U mnogim humanim malignitetima, uključujući tumor dojke, bešike i stomaka, pokazano je da je angiogeneza, merena kao tumorska gustina mikrosudova, u korelaciji sa tumorskim ponašanjem, tj. sa razvojem metastaza (Weidner i sar., 1991; Weidner i sar., 1993), lošom prognozom (Horak i sar., 1992), i smanjenim preživljavanjem (Maeda i sar., 1995; Bochner i sar., 1995). Endokrini organi su sami po sebi dobro vaskularizovani, sa fenestrovanim epitelom koji se oslanja na krvne sudove, pri čemu se omogućava lakši transport supstanci što je od velikog značaja za funkcionisanje celog organizma (Palade i sar., 1979). Štitasta žlezda je odličan model za razumevanje koordiniranog angiogenetskog procesa s obzirom da tokom formiranja strume postoji rast kako folikularnih, tako i endotelnih ćelija, i verovatno je da je ovaj proces regulisan otpuštanjem citokina iz folikularnih ćelija kao odgovor na niske koncentracije trijodtironina i visoke koncentracije tireostimulirajućeg hormona (TSH). Takođe je interesantan podatak da su premaligne lezije vaskularizovanije od neneoplastičnih tkiva, kao i da je u njima povećana ekspresija angiogenih faktora rasta (Brem i sar., 1978; Dobbs i sar., 1997).

Ulozi VEGF proteina, člana VEGF familije angiogenih faktora, u formiranju novih krvnih sudova u tumorskom tkivu, posvećen je veliki broj istraživačkih radova. Suprotno tome, značaj limfangiogeneze u razvoju tumora i njegovom metastatskom širenju dugo je bio zapostavljen.

Novije studije pokazale su da je VEGF-C, član VEGF familije proteina koji pokazuje visok afinitet za endotel limfnih sudova, uključen u limfangiogenezu indukovanu tumorskim ćelijama i limfogeno metastatsko širenje malignih ćelija.

Primarna uloga VEGF-C proteina je stimulacija limfangiogeneze. Vezujući se za VEGFR-3 receptore eksprimirane na endotelu limfnih sudova, VEGF-C pokreće unutarćelijske signalne puteve koji vode do aktivacije gena koji će obezbediti proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, a time i proces formiranja novih limfnih sudova (Plate, 2001; Makinen i sar., 2001).

Maligni tumori štitaste žlezde razlikuju se po histomorfološkom izgledu, biološkom ponašanju, načinu metastaziranja i prognozi. Ovi karcinomi mogu metastazirati različitim mehanizmima, koji uključuju direktnu invaziju okolnog tkiva i širenje putem limfnih i krvnih sudova. Papilarni karcinomi imaju tendenciju ka limfogenom širenju i

razvoju metastaza u limfnim čvorovima, za razliku od folikularnih karcinoma koji se šire hematogenim putevima. Anaplastični karcinom, koji predstavlja terminalnu fazu morfološke i strukturne dediferencijacije tiroidne ćelije i najagresivniju formu karcinoma štitaste žlezde, metastazira istovremeno i limfogeno i hematogeno, uz agresivan lokalni rast, koji dovodi do invazije malignog tkiva u sve strukture vrata. Fellmer i saradnici (Felmer i sar., 1999) postavili su hipotezu da molekularni mehanizmi koji determinišu metastatske fenotipe papilarnog i folikularnog karcinoma moraju biti različiti. Rezultati ovih istraživača pokazali su *in situ* hibridizacijom ekspresiju VEGF-C gena u tkivu papilarnog, ali ne i folikularnog karcinoma, sugerišući da VEGF-C (koji se smatra faktorom odgovornim za limfangiogenezu, ali ne i za angiogenezu krvnih sudova) ima ulogu u determinaciji limfno-metastatskog fenotipa karcinoma štitaste žlezde. Nakon ovih rezultata, veza između VEGF-C ekspresije, limfangiogeneze i formiranja metastaza u limfnim čvorovima, postaje predmet interesovanja i drugih istraživača.

Radovi koji su usledili utvrdili su višu ekspresiju VEGF-C u primarnim tumorima pacijenata sa papilarnim karcinomom koji imaju prisutne limfne metastaze, u poređenju sa tumorima bez metastaza (Bunone i sar., 1999; Tanaka i sar., 2002; Yu i sar., 2005), kao i gušću mrežu limfnih sudova u tumorskom i peritumorskom tkivu metastatskih papilarnih karcinoma (Lee i sar., 2012).

Cilj naših eksperimenata u ovom delu doktorske disertacije je bio da analiziramo promene u ekspresionim profilima VEGF-C proteina tokom progresije diferenciranog u nediferencirani (anaplastični) karcinom štitaste žlezde i da poredimo ekspresiju ovog proteina sa kliničko-patološkim parametrima koji su od prognostičkog značaja za ove pacijente.

Naši rezultati imunohistohemijske analize ekspresije VEGF-C proteina pokazali su da je u papilarnom, kao i u anaplastičnom karcinomu, prisutan visok nivo citoplazmatskog VEGF-C proteina, sa postepenim povećanjem ekspresije tokom dediferencijacije, kao i da je osim u malignim ćelijama, prisutan i u endotelu vaskulature (kako krvne, tako i limfne) posebno u okolini malignog tkiva, čime ove ćelije utiču na dalje pojačanje vaskularizacije i širenje tumorske mase. Naši rezultati slični su onima koje su objavili Bunone i saradnici (Bunone i sar., 1999), dok je druga istraživačka grupa (Hung i sar.,

2003) našla nižu ekspresiju u nediferenciranom tiroidnom karcinom u poređenju sa papilarnim, mada su ovi autori sami skrenuli pažnju da se radi o preliminarnoj studiji koja je uključila mali broj uzoraka anaplastičnog karcinoma. U daljem toku istraživanja, korelisali smo imunohistohemijsku ekspresiju VEGF-C proteina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata i dobili statistički značajnu vezu između visoke ekspresije VEGF-C u tumorskom tkivu i prisustva metastaza u limfnim čvorovima, ekstratiroidne invazije i uznapredovalog kliničkog stadijuma bolesti. Rezultati dobijeni imunohistohemijskim bojenjem arhivskih tkivnih uzoraka potvrđeni su i imunoblot analizom homogenata svežeg tkiva pacijenata sa papilarnim karcinomom i denzitometrijskom kvantifikacijom dobijenih traka. Dakle, pokazana je razlika u ekspresiji VEGF-C proteina između tumora sa prisustvom i odsustvom limfnih metastaza, tj. metastatski papilarni karcinomi imali su veću ekspresiju VEGF-C proteina u poređenju sa nemetastatskim karcinomima. Nadalje, imunohistohemijskom metodom pokazali smo da su u metastatskom tkivu (metastaza u limfnom čvoru) ekspresioni nivoi VEGF-C proteina slični onima u primarnom tumoru istog pacijenta.

Vezu VEGF-C proteina sa prisustvom limfnih metastaza pokazali su i drugi istraživači (Bunone i sar., 1999; Tanaka i sar., 2002; Yu i sar., 2005), dok su Hung i saradnici (Hung i sar., 2003) kao i de la Torre i saradnici (de la Torre i sar., 2006) i sa ovog aspekta imali drugačije rezultate. Ovi istraživači nisu našli razliku u VEGF-C ekspresiji između karcinoma koji su imali i koji nisu imali metastaze u limfnim čvorovima. S obzirom da je poznato da između ostalih regulatornih faktora, i interleukin 1 (IL-1 α) indukuje mRNK za VEGF-C protein (Ristimaki i sar., 1998), i da je IL-1 karakteristika papilarnog, a ne folikularnog karcinoma (Kayser i sar., 1995), de la Torre i saradnici su ovaj citokin predložili kao mogući razlog za razliku u ekspresiji VEGF-C proteina u ova dva tipa tiroidnog karcinoma. Kako su našli samo slabu korelaciju između gustine limfnih sudova i VEGF-C ekspresije, ovi autori su zaključili da je limfangiogeneza kompleksan proces i da VEGF-C ekspresija nije jedini mehanizam u limfangiogenezi i procesu stvaranja metastaza u limfnim čvorovima, već da u ovim procesima veliku ulogu igraju i drugi faktori.

Veza između VEGF-C proteina, limfangiogeneze i lokalizacije malignih ćelija u limfnim čvorovima, kao i uloga ovog proteina u formiranju i krvnih, a ne samo limfnih sudova nisu potpuno jasni i još uvek su predmet istraživanja. Još u ranijim radovima

(Skobe i sar., 2001) u eksperimentima na miševima sa transplantiranim tumorom dojke, indukcija VEGF-C proteina rezultovala je u formiranju metastaza u limfnim čvorovima, ali i u plućima miševa. Dakle, visoka ekspresija VEGF-C unutar tumorske mase i u njenom okolnom tkivu može da indukuje ne samo promociju limfangiogeneze i limfnih metastaza, nego čak može da ima ulogu i u formiranju udaljenih metastaza.

Najnoviji radovi u ovoj oblasti, koji pokušavaju da identifikuju vezu između VEGF-A i VEGF-C proteina i razjasne njihove biološke uloge u angiogenezi/limfangiogenezi, kao i u metastatskim procesima karcinoma štitaste žlezde, pokazali su signifikantnu korelaciju visokih ekspresija ovih proteina u anaplastičnim karcinomima i sugerisali mogućnost njihovog kooperativnog dejstva na progresiju tumora i metastatsko širenje malignog procesa (Salajegheh i sar., 2013).

Neosporno je da formiranje novih krvnih i limfnih sudova ima važnu ulogu u razvoju i progresiji tumora, kao i determinaciji njegovog metastatskog fenotipa, a time i kliničkog toka tumorske bolesti pacijenta. Dalja istraživanja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi angiogeneze i limfangiogeneze neophodna su da bi se identifikovala ciljna mesta za molekularnu terapiju usmerenu ka inhibiciji angiogenih faktora i na taj način smanjio rizik od lošeg ishoda bolesti pacijenata sa tiroidnim karcinomom.

* * *

U sledećem delu našeg eksperimentalnog rada analizirali smo moguću korelaciju ekspresije survivina (proteina koji inhibira apoptozu u finalnom koraku propagacije apoptotskog stimulusa) i ekspresije VEGF-C proteina (angiogenog faktora koji ima potencijalnu ulogu u definisanju limfogeno-metastatskog fenotipa malignog tumora) u uzorcima tkiva karcinoma štitaste žlezde.

U našim prethodnim eksperimentima pokazali smo imunohistohemijskom metodom i imunoblotom da ekspresija oba ova proteina (survivin i VEGF-C) nije prisutna u normalnom tkivu štitaste žlezde, ali se ekspresija gena koji kodiraju ove proteine aktivira tokom maligne transformacije ćelija štitaste žlezde i povećava tokom progresije malignizacije tumorskih ćelija od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu.

Rezultati imunohistohemijskog bojenja na survivin i VEGF-C protein u sparenim uzorcima istog pacijenta pokazali su statistički značajnu korelaciju nivoa ekspresije ova dva proteina i u papilarnom i u anaplastičnom karcinomu. Takođe,

imunohistohemijskim bojenjem je pokazana korelacija ekspresije survivina i VEGF-C i u metastatskom tkivu primarnih tumora.

Survivin je prvo okarakterisan kao član IAP familije proteina (Inhibitor of apoptosis proteins), koji osim što inhibira apoptozu, ima i ulogu u promociji ćelijskog ciklusa od G2-M faze ka mitozu, što je ovom proteinu dalo veliki značaj u biologiji tumora (Li i sar., 1998).

Veza između survivina i angiogeneze uočena je kasnije, kada je konstatovana korelacija između survivina, apoptoze, proliferacije, ali i gustine mreže krvnih sudova u kolorektalnom karcinomu (Kawasaki i sar., 2001) i u tumorima mozga (Zhen i sar., 2005).

Postavljena je hipoteza da angiogeni faktori, kao što je VEGF, indukuju proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija i time formiranje tumorske vaskulature, a survivin svojim anti-apoptotskim mehanizmima delovanja omogućava preživljavanje novih endotelnih ćelija (O' Connor i sar., 2000).

Na ovaj način sinhronizovanim mehanizmima VEGF i survivin doprinose razvoju i širenju tumora. Nadalje, zanimljiva su bila otkrića da survivin i VEGF imaju međusobno recipročnu regulaciju aktivacije gena. Dakle, pokazano je da survivin ima sposobnost „up-regulacije“ angiogenih faktora (Conway i sar., 2003), dok je s druge strane demonstrirano da VEGF indukuje ekspresiju gena za survivin (Tran i sar., 1999).

Veza između survivina, angiogenih faktora i agresivnosti tumora nije još dovoljno jasna. Survivin inhibira apoptotsku smrt i u tumorskim ćelijama, i u endotelnim ćelijama novonastale tumorske vaskulature, koju promovišu angiogeni faktori. Prethodne studije su pokazale da kada abnormalne ćelije (koje bi se inače odstranile apoptozom) preživljavaju i nastavljaju da se reprodukuju, njihov potencijal za invaziju i metastazu raste (Wyllie i sar., 1999; Sierra A, Int J Cancer, 2000). Skoriji rezultati Mehrotra i saradnika (Mehrotra i sar., 2010) pokazali su da survivin u molekularnoj interakciji sa XIAP proteinom (član IAP familije proteina) stvara kompleks koji stimuliše invazivnost tumorskih ćelija i indukuje metastaze, i to putem nezavisnim od mehanizma kojim inhibira apoptotski proces. Ova grupa je pokazala da kompleks ova dva anti-apoptotska proteina utiče na aktiviranje transkripcionog faktora NF κ B, što kao odgovor ima povećanje ekspresije fibronektina koji vezujući se za β 1 integrinske

receptore pokreće kinaze odgovorne za ćelijsku pokretljivost (FAK i Src kinaze). Kao odgovor na ove signale, ćelija remodeluje aktinski citoskelet (Juliano i sar., 2004), eksprimira matriksne metaloproteinaze (Han i sar., 2006), postaje migratorna (Livant i sar., 2000), vrši invaziju bazalne membrane (Gaggioli i sar., 2007) i u isto vreme izbegava apoptotsku smrt.

Veza između survivina i angiogenih faktora izučavana je i u tiroidnim tumorima. Zhang i saradnici (2009) analiziranjem VEGF i survivina u karcinomima štitaste žlezde utvrdili su njihovu povećanu ekspresiju tokom progresije maligniteta od diferenciranih ka nediferenciranim karcinomima, međusobnu korelaciju ekspresije ova dva proteina, kao i njihovu korelaciju sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima i kliničkim stadijumom, dakle sa agresivnošću tumora.

Ovi rezultati ukazali su na važnu ulogu survivina i angiogenih faktora u evoluciji i progresiji tiroidnog maligniteta i njihovu potencijalnu vrednost u predikciji agresivnog ponašanja i lošije prognoze pacijenata sa karcinomom štitaste žlezde.

Veza između survivina i VEGF-C proteina u humanim tumorima mnogo je manje izučavana. U karcinomu dojke Cai i saradnici (2012) pokazali su međusobnu korelaciju imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C, kao i njihovu korelaciju sa prisustvom limfnih metastaza. Ovi autori su takođe pokazali da survivin indukuje ekspresiju VEGF-C gena na nivou informacione RNK i proteina, što dovodi do povećane invazivnosti tumorskih ćelija.

Korelacija survivina i VEGF-C proteina do sada nije izučavana u malignim tumorima štitaste žlezde. Rezultati našeg eksperimentalnog rada pokazali su korelaciju ekspresije ova dva proteina i njihovo postupno povećanje tokom progresije maligniteta od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu, što upućuje da su u kliničkom smislu ovi molekuli perspektivni kao prognostički pokazatelji moguće lošije prognoze i ishoda bolesti pacijenata sa karcinomom štitaste žlezde. Klinička implikacija naučnih rezultata do sada dobijenih u ovoj oblasti izučavanja biologije tiroidnih tumora mogla bi dati efekte u preoperativnoj evaluaciji punktata štitaste žlezde (citološki materijal) ukazivanjem na visok metastatski potencijal tumora i njegovo agresivnije ponašanje. Pacijenti sa papilarnim karcinomom, i pored tendencije metastaziranja u limfne čvorove, uglavnom imaju dobru prognozu. Ipak kod jednog broja pacijenata tumor

pokazuje agresivnije ponašanje, sklonost lokalnim recidivima, pa čak i udaljenim metastazama. Preoperativni nalaz visokih koncentracija survivina i VEGF-C proteina pomogao bi u identifikaciji ovih pacijenata i ukazao na potrebu za radikalnim hirurškim zahvatom (kompletno odstranjenje žlezde, a ne samo jednog lobusa) i pažljivim postoperativnim praćenjem pacijenta. Anaplastični karcinom je izuzetno agresivan tumor, otporan na sve do sada primenjivane vidove terapije, najčešće ne-operabilan.

Sve bolje sagledavanje uloge survivina i angiogenih faktora u molekularnoj patogenezi progresije maligniteta štitaste žlezde trebalo bi da otvori mogućnosti za kreiranje i primenu ciljanih molekulskih terapija usmerenih ka aktivaciji apoptoze i inhibiciji angiogeneze, što bi u budućnosti dalo više nade u izlječenje bolesnicima obolelim od najagresivnijih formi malignih tumora štitaste žlezde.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- Progresija maligniteta tumora štitaste žlezde od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu praćena je promenama u ekspresiji apoptotskih molekula.
- Sinteza anti-apoptotskog Bcl-2 proteina smanjuje se postupno sa dediferencijacijom, dok se pro-apoptotski protein Bax, aktivira u početnoj fazi maligne transformacije i ostaje na visokom nivou tokom tumorske progresije. Povišena sinteza ovog proteina ne obezbeđuje propagaciju apoptotskog signala, što smo pokazali detekcijom apoptotske smrti ćelija koja je bila značajnije niža u anaplastičnom u odnosu na papilarni karcinom štitaste žlezde.
- Analiza ekspresije survivina, inhibitornog proteina apoptoze, pokazala je da se sinteza ovog proteina aktivira u ranoj fazi tumorogeneze i postepeno povećava tokom tumorske progresije od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu.
- Analiza korelacije ekspresije survivina i apoptotske smrti ćelija je pokazala da je visoka ekspresija proteina u korelaciji sa sniženim stepenom *in situ* detektovane apoptotske smrti, što sugerše da survivin, a ne odnos Bcl/Bax ima ulogu u inhibiciji finalizacije programirane ćelijske smrti.
- Poređenje imunohistohemijske ekspresije survivina sa kliničko-patološkim parametrima pacijenata sa karcinomima štitaste žlezde pokazalo je da je visoka ekspresija ovog proteina u korelaciji sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima i uznapredovalim stadijumom tumorske bolesti (stadijumi III/IV). Ove nalaze potvrdili smo i imunoblot analizom koja je takođe pokazala da je nivo sintetisanog survivina veći u tumorima koji su imali prisutne metastaze u limfnim čvorovima.
- Visoka ekspresija survivina prisutna u primarnim tumorima štitaste žlezde, zadržana je i u ćelijama karcinoma koje su metastazirale u limfne čvorove.
- Ekspresija VEGF-C proteina (angiogeni faktor koji promoviše formiranje tumorske vaskulature, a time i rast i širenje tumora) detektovana je u velikom broju analiziranih karcinoma, sa postepenim povećanjem ekspresionih nivoa tokom progresije maligniteta od papilarnog ka anaplastičnom karcinomu.
- Poređenjem ekspresije VEGF-C i kliničko-patoloških parametara, pokazali smo da je njegova visoka ekspresija u korelaciji sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima, ekstratiroidnom invazijom, kao i sa uznapredovalim stadijumom bolesti. Vezu sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima, potvrdili smo i

denzitometrijskom kvantifikacijom traka dobijenih imunoblot analizom uzoraka koji su imali i koji nisu imali prisutne metastaze u limfnim čvorovima.

- Visoka ekspresija VEGF-C prisutna u primarnim tumorima, pronađena je i u metastatskom tkivu u limfnim čvorovima.
- Spearman-ovim korelacionim testom pokazali smo da postoji značajna korelacija između imunohistohemijske ekspresije survivina i VEGF-C proteina u uzorcima pacijenata sa papilarnim i anaplastičnim karcinomom štitaste žlezde.
- Međusobna korelacija ova dva proteina u primarnim tumorima i u metastatskom tkivu, sugerše mogućnost njihovog kooperativnog i sinhronizovanog delovanja u metastatskom procesu.
- Klinički značaj evaluacije ekspresije survivina i VEGF-C proteina je u predikciji metastatskog potencijala tumora i agresivnijeg toka bolesti.
- Takođe, sve bolje sagledavanje uloge survivina i angiogenih faktora u molekularnoj patogenezi progresije maligniteta štitaste žlezde trebalo bi da otvori mogućnosti za kreiranje i primenu ciljanih molekulskih terapija usmerenih ka aktivaciji apoptoze i inhibiciji angiogeneze, što bi u budućnosti dalo više nade u izlečenje bolesnicima obolelim od najagresivnijih formi malignih tumora štitaste žlezde.

7. LITERATURA

A

Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997; 272(24):15442-15451.

Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*, 1998; 351(9106):882-883.

Ain KB. Anaplastic thyroid carcinoma: behavior, biology, and therapeutic approaches. *Thyroid*, 1998; 8(8):715-726.

Akslen LA. Prognostic importance of histologic grading in papillary thyroid carcinoma. *Cancer*, 1993; 72(9):2680-2685.

Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest*, 1999; 79(11):1327-1333.

Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, 2003; 22(53):8581-8589.

Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol*, 2006; 18(6):609-615.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):917-21.

Antonaci A, Consorti F, Mardente S, Natalizi S, Giovannone G, Della Rocca C. Survivin and cyclin D1 are jointly expressed in thyroid papillary carcinoma and microcarcinoma. *Oncol Rep*, 2008; 20(1):63-67.

Are C, Shaha AR. Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches. *Ann Surg Oncol*, 2006; 13(4):453-464.

B

Bacic M, Edwards NA, Merrill MJ. Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. *Growth Factors*, 1995;12(1):11-15.

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commu*, 2004; 314(3):902-907.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 1996; 87(8):3336-3343.

Bell CA, Tynan JA, Hart KC, Meyer AN, Robertson SC, Donoghue DJ. Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol Biol Cell*, 2000; 11(10):3589-3599.

Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.*, 2000; 86(2):E29-35.

Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*, 1999; 284(5415):808-812.

Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest*, 1993; 91(1):153-159.

Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol*, 1994; 68(4):2521-2528.

Bicknell R 1997 Mechanistic insights into tumor angiogenesis. In: Bicknell ER, Lewis CE, Ferrara N, eds. Tumor angiogenesis. Oxford, UK: Oxford University Press; 19–28.

Blagosklonny MV, Giannakakou P, Wojtowicz M, Romanova LY, Ain KB, Bates SE, Fojo TJ. Effects of p53-expressing adenovirus on the chemosensitivity and differentiation of anaplastic thyroid cancer cells. *Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83(7):2516-2522.

Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 1995; 87(21):1603-1612.

Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, Stukenberg PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 2002; 13(9):3064-3077.

Brem SS, Jensen HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer*, 1978; 41(1):239-244.

Brockner M, de Buhr I, Papageorgiou G, Schatz H, Derwahl M. Expression of apoptosis-related proteins in tumors and thyroid carcinoma cell lines. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1996; 104:20-23.

Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Butó S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol*, 1999; 155(6):1967-1976.

Burlacu A. Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins. *J Cell Mol Med*, 2003; 7(3):249-257.

Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, Mayer M, Sylvester RJ, van Glabbeke M. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer*, 1979; 15(8):1033-1041.

C

Cai X, Ma S, Gu M, Zu C, Qu W, Zheng X. Survivin regulates the expression of VEGF-C in lymphatic metastasis of breast cancer. *Diagn Pathol*, 2012; 18:7:52.

Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer*, 2005; 4(1):11.

Carcangiu ML, Steeper T, Zampi G, Rosai J. Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. *Am J Clin Pathol*, 1985; 83(2):135-158.

Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost*, 2001; 86(1):289-297.

Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet*, 1993; 341(8855):1251-1254.

Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer*, 2003; 97: 545-53.

Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell*. 2000 Jul;6(1):183-9.

Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod*, 1993; 48(5):1120-1128.

Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In Vivo*, 2002; 16(6):439-445.

Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1995;173(3 Pt 1):753-759.

Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*, 1995; 14(22):5589-5596.

Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J Biol Chem*, 2004; 279(11):10382-10388.

Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, Wheatley SP. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *J Biol Chem*, 2006; 281(44):33450-33456.

Conticello C, Adamo L, Giuffrida R, Vicari L, Zeuner A, Eramo A, Anastasi G, Memeo L, Giuffrida D, Iannolo G, Gulisano M, De Maria R. Proteasome inhibitors synergize with tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand to induce anaplastic thyroid carcinoma cell death. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(5):1938-1942.

Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, DeVriese A, Nagai N, Luo W, Collen D. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol*, 2003; 163(3):935-946.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2(9):647-656.

Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 1993; 67(4):2168-2174.

D

Davis-Smyth T, Presta LG, Ferrara N. Mapping the charged residues in the second immunoglobulin-like domain of the vascular endothelial growth factor/placenta growth factor receptor Flt-1 required for binding and structural stability. *J Biol Chem*, 1998; 273(6):3216-3222.

de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*, 2012; 34(3):200-211.

de la Torre NG, Buley I, Wass JA, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer*, 2006; 13(3):931-944.

DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. Lyon: IARC Press; 2004; pp.54-55

Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 1999; 13(3):239-252.

Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, Claesson-Welsh L. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 2003; 278(42):40973-40979.

Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*, 1997;76(11):1410-1415.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest*, 2004; 114(8):1117-1127.

Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, 2004;279(33):34087-90.

E

Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 1995; 7(3):337-343.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 1999; 68:383-424.

Ekholm R, Engstrom G, Ericson LE, Melander A. Exocytosis of protein into the thyroid follicle lumen. An early effect of TSH. *Endocrinology*, 1985; 97: 337-346.

F

Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest*, 1993; 91(1):179-184.

Fellmer PT, Sato K, Tanaka R, Okamoto T, Kato Y, Kobayashi M, Shibuya M, Obara T. Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Surgery*, 1999; 126(6):1056-1061.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 2004; 25(4):581-611.

Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg*, 1972; 175(3):409-416.

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 1990; 82(1):4-6.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995; 376(6535):66-70.

Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2012; 11(2):109-124.

Fornaro M, Plescia J, Chheang S, Tallini G, Zhu YM, King M, Altieri DC, Languino LR. Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway. *J Biol Chem*, 2003; 278(50):50402-50411.

Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1998; 273(18):11197-11204.

G

Gaggioli C, Robert G, Bertolotto C, Bailet O, Abbe P, Spadafora A, Bahadoran P, Ortonne JP, Baron V, Ballotti R, Tartare-Deckert S. Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway. *J Invest Dermatol*, 2007; 127(2):400-410.

Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 1999; 59(8):1811-1815.

Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 1999; 126(6):1149-1159.

Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res*, 2002; 62(9):2462-2467.

Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*, 1998; 143(1):207-215.

Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*, 1999; 144(5):903-914.

Guarda LA, Peterson CE, Hall W, Baskin HJ. Anaplastic thyroid carcinoma: cytomorphology and clinical implications of fine-needle aspiration. *Diagn Cytopathol*, 1991; 7(1):63-67.

H

Han S, Ritzenthaler JD, Sitaraman SV, Roman J. Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2006; 281(40):29614-29624.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996; 86(3):353-364.

Harwood J, Clark OH, Dunphy JE. Significance of lymph node metastasis in differentiated thyroid cancer. *Am J Surg*, 1978; 136(1):107-112.

Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett*, 2001; 169(2):155-164.

Havelka M, Tatić S. Štitasta žlezda: kliničke morfološke i patohistološke karakteristike. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet 2003.

Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery*, 1987; 102(6):1088-1095.

Hemminiki K, Li X. Familial risk of cancer by site and histopathology. *Int J Cancer*, 2003; 103:105-109.

Hermann S, Sturm I, Mrozek A, Klosterhalfen B, Hauptmann S, Dorken B, Daniel PT. Bax expression in benign and malignant thyroid tumours: dysregulation of wild-type P53 is associated with a high Bax and P21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer*, 2001; 92(6):805-811.

Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol*, 1999; 6(7):648-651.

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule

antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*, 1992; 340(8828):1120-1124.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 1991; 5(12):1806-1814.

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 1992; 267(36):26031-26037.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 1981; 29(11):1349-1353.

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(8):3668-3672.

Hubbard SR. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999;71(3-4):343-358.

Hung CJ, Ginzinger DG, Zarnegar R, Kanauchi H, Wong MG, Kebebew E, Clark OH, Duh QY. Expression of vascular endothelial growth factor-C in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88(8):3694-3699.

Hunt JL, Tometsko M, LiVolsi VA, Swalsky P, Finkelstein SD, Barnes EL. Molecular evidence of anaplastic transformation in coexisting well-differentiated and anaplastic carcinomas of the thyroid. *Am J Surg Pathol*, 2003; 27(12):1559-1564.

I

Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 2001; 188(3):359-368.

Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 2000; 19(5):617-623.

Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Nakano K, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A. Survivin expression is significantly linked to the dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Oncol Rep*, 2003; 10(5):1337-1340.

Ito Y, Miyauchi A. Prognostic factors and therapeutic strategies for differentiated carcinomas of the thyroid. *Endocr J*, 2009; 56 (2) 177-192.

J

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 1997; 276(5317):1423-1425.

Jiang G, Hunter T. Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol*, 1999; 9(15):R568-571.

Juliano RL, Reddig P, Alahari S, Edin M, Howe A, Aplin A. Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochem Soc Trans*, 2004; 32(Pt3):443-446.

Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*, 2002; 82(3):673-700.

K

Kabrun N, Bühring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*, 1997; 124(10):2039-2048.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 2004; 5(1):74-80.

Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer*, 2001; 91(11):2026-2032.

Kayser L, Broholm H, Francis D, Perrild H, Olsen BE, Bendtzen K, Høyer PE. Immunocytochemical localisation of interleukin-1 alpha and interleukin-6 in thyroid tissues from patients with neoplastic or autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity*, 1995; 20(2):75-82.

Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*, 2005; 103(7):1330-1335.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26(4):239-257.

Khan A, Nose V. In: Lloyd RV, editor. Endocrine pathology: differential diagnosis and molecular advances, 2nd ed. New York: Springer 2010; p. 181-236.

Kim YA, Chang M, Park YJ, Kim JE. Detection of Survivin and COX-2 in Thyroid Carcinoma: Anaplastic Carcinoma Shows Overexpression of Nuclear Survivin and Low COX-2 Expression. *Korean J Pathol*, 2012; 46(1):55-60.

Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2004;1644(2-3):229-249.

Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F, Leclère J, Duprez A, Weryha G. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86(2):656-658.

Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96(4):1457-1462.

Kojic SL, Strugnell SS, Wiseman SM. Anaplastic thyroid cancer: a comprehensive review of novel therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011; 11(3):387-402.

Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci*, 2003; 18:65-70.

L

Lang BH, Lo CY. Surgical options in undifferentiated thyroid carcinoma. *World J Surg*, 2007; 31(5):969-977.

Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinoma: their implications for cancer staging. *Ann Surg Oncol*, 2007; 14(2):730-738.

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.

Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, Wynford-Thomas D. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*, 1989; 4(2):159-164.

Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol*, 2006; 18(6):616-622.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998; 396(6711):580-584.

Li F, Altieri DC. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res*, 1999; 59(13):3143-3151.

Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J*, 1999; 344 Pt 2:305-311.

Livant DL, Brabec RK, Kurachi K, Allen DL, Wu Y, Haaseth R, Andrews P, Ethier SP, Markwart S. The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice. *J Clin Invest*, 2000; 105(11):1537-1545.

LiVolsi VA. Surgical pathology of the thyroid. *Major Probl Pathol*, 1990; 22:253-274.

LiVolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa S, et al. Papillary carcinoma. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz U, Eng C, eds. Pathology and genetics. Tumors of endocrine organs. World health Organization, Lyon: IARC Press, 2004

Liu J, Brown RE. Morphoproteomics demonstrates activation of mTOR pathway in anaplastic thyroid carcinoma: a preliminary observation. *Ann Clin Lab Sci*, 2010; 40(3):211-217.

Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, Alitalo K. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost*, 2003; 90(2):167-184.

M

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*, 1995; 13(2):477-481.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991; 88(20):9267-9271.

Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res*, 1999; 59(24):6097-6102.

Marioni G, Bertolin A, Giacomelli L, Marchese-Ragona R, Savastano M, Calgaro N, Marino F, De Filippis C, Staffieri A. Expression of the apoptosis inhibitor protein Survivin in primary laryngeal carcinoma and cervical lymph node metastasis. *Anticancer Res*, 2006; 26(5B):3813-3817.

Martin SJ. Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol*, 1993; 3(5):141-144.

- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J*, 2003; 22(11):2729-2740.
- Mazzaferri EL, Young RL. Papillary thyroid carcinoma: a 10 year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients. *Am J Med*, 1981; 70(3):511-518.
- Mazzaferri EL, Kloos RT. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86(4):1447-1463.
- 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.
- Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*, 2001; 7(2):199-205.
- Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem*, 2001; 276(52):49289-49298.
- Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6(6):449-458.
- Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*, 2010; 17(1):53-64.
- Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 1999; 18(2):363-374.
- Miller DL, Thomas RM. Cavitation dosimetry: estimates for single bubbles in a rotating-tube exposure system. *Ultrasound Med Biol*, 1994; 20(2):187-193.
- Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*, 2008; 14(16):5000-5005.
- Moore D, Ohene-Fianko D, Garcia B, Chakrabarti S. Apoptosis in thyroid neoplasma: relationship with p53 and bcl-2 expression. *Histopathology*, 1998; 32(1):35-42.

Moretti F, Farsetti A, Soddu S, Misiti S, Crescenzi M, Filetti S, Andreoli M, Sacchi A, Pontecorvi A. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene*, 1997; 14(6):729-740.

Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, Kay GF. Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003; 48(9):2660-2669.

Mountz JD, Zhou T, Su X, Wu J, Cheng J. The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996; 80(3 Pt 2):S2-14.

Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(14):7192-7197.

N

Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implication for diagnosis treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008; 8(1):83-95.

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88(11):5399-5404.

O

Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 1998; 273(47):31273-31282.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 2004; 4(8):592-603.

O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol*, 2000; 156(2):393-398.

Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol*, 1999; 10(6):528-535.

Osaka E, Suzuki T, Osaka S, Yoshida Y, Sugita H, Asami S, Tabata K, Hemmi A, Sugitani M, Nemoto N, Ryu J. Survivin as a prognostic factor for osteosarcoma patients. *Acta Histochem Cytochem*, 2006; 39(3):95-100.

P

Pajusola K, Aprelikova O, Armstrong E, Morris S, Alitalo K. Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene*, 1993; 8(11):2931-2937.

Palade GE, Simionescu M, Simionescu N. Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1979; 463:11-32.

Petrović V, Cvijić G. Endokrinologija opšta i uporedna. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd 1997

Pilotti S, Collini P, Rilke F, Cattoretti G, Del Bo R, Pierotti MA. Bcl-2 protein expression in carcinomas originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. *J Pathol*, 1994; 172(4):337-342.

Plate K. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nat Med*, 2001; 7(2):151-152.

Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer*, 1996; 73(2):139-143.

R

Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 1998; 17(25):3225-3236.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997; 386(6626):671-674.

Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem*, 1998; 273(14):8413-8418.

Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, 2001;114:853-865.

Rodriguez JM, Piñero A, Ortiz S, Moreno A, Sola J, Soria T, Robles R, Parrilla P. Clinical and histological differences in anaplastic thyroid carcinoma. *Eur J Surg*, 2000; 166(1):34-38.

Rodríguez JA, Span SW, Ferreira CG, Kruyt FA, Giaccone G. CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin. *Exp Cell Res*, 2002; 275(1):44-53.

Roti E, Rossi R, Transforini G et al. Clinical and histological characteristics of papillary thyroid microcarcinoma: results of retrospective study in 243 patients. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2006; 91(6):2171-2178.

S

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(10):2204-2212.

Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*, 2004; 118(2):187-202.

Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN, Sherman SI. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008; 93(1):278-284.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, 1999; 107(5):489-506.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983; 219(4587):983-5.

Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*, 1986; 46(11):5629-5632.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 1982; 17 Pt 2:229-259.

Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet*, 2003; 361(9356):501-511.

Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, Cooper DS, Haugen BR, Ho M, Klein I, Ladenson PW, Robbins J, Ross DS, Specker B, Taylor T, Maxon H 3rd. Prospective multicenter study of thyroiscarcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer*, 1998; 83(5):1012-1021.

Sierra A, Castellsagué X, Escobedo A, Lloveras B, García-Ramírez M, Moreno A, Fabra A. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int J Cancer*, 2000; 89(2):142-147.

Siironen P, Hagström J, Mäenpää HO, Louhimo J, Heikkilä A, Heiskanen I, Arola J, Haglund C. Anaplastic and poorly differentiated thyroid carcinoma: therapeutic strategies and treatment outcome of 52 consecutive patients. *Oncology*, 2010; 79(5-6):400-408.

Siironen P, Ristimäki A, Narko K, Nordling S, Louhimo J, Andersson S, Haapianen R, Haglund C. VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 2006; 13(2):456-473.

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.

Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer*, 2009; 16(1):17-44.

Smallridge RC, Copland JA. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2010; 22(6):486-497.

Smith CW, Patton JG, Nadal-Ginard B. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet*, 1989; 23:527-577.

Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Mol Cell*, 2008; 30(2):123-135.

Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Perowski H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dorken B, Daniel PT. Analysis of p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol*, 1999; 17(5):1364-1374.

Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004; 24(2):259-270.

T

Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 2003, 58(23):5315-5320.

Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 2005; 65(3):550-563.

Tan RK, Finley RK 3rd, Driscoll D, Bakamjian V, Hicks WL Jr, Shedd DP. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a 24-year experience. *Head Neck*, 1995; 17(1):41-47.

Tanaka K, Kurebayashi J, Sonoo H, Otsuki T, Yamamoto Y, Ohkubo S, Yamamoto S, Shimozuma K. Expression of vascular endothelial growth factor family messenger RNA in diseased thyroid tissues. *Surg Today*, 2002; 32(9):761-768.

Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, Shibuya M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem*, 2004; 279(44):46304-46314.

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 2005; 109(3):227-241.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267(5203):1456-1462.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998; 281(5381):1312-1316.

Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 264(3):781-788.

V

Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene*, 2007; 26(19):2678-2684.

Vaux DL, Silke J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 304(3):499-504.

W

Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waśko R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, Baszko-Błaszyk D, Shimek V, Ruchała M. Survivin--prognostic tumor biomarker in human neoplasms--review. *Ginek Pol*, 2012; 83(7):537-540.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 1991; 324(1):1-8.

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*, 1993; 143(2):401-409.

Wein RO, Weber RS. Anaplastic thyroid carcinoma: palliation or treatment? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011; 19(2):113-118.

Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*, 2005; 104(2):427-438.

Wheatley SP, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw WC. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol*, 2001; 11(11):886-890.

Wiseman SM, Loree TR, Rigual NR, Hicks WL Jr, Douglas WG, Anderson GR, Stoler DL. Anaplastic transformation of thyroid cancer: review of clinical, pathologic, and molecular evidence provides new insights into disease biology and future therapy. *Head Neck*, 2003; 25(8):662-670.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 1997; 139(5):1281-1292.

Woyach JA, Shah MH. New therapeutic advances in the management of progressive thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16(3):715-731.

Wunderlich A, Fischer M, Schlosshauer T, Ramaswamy A, Greene BH, Brendel C, Doll D, Bartsch D, Hoffmann S. Evaluation of Aurora kinase inhibition as a new therapeutic strategy in anaplastic and poorly differentiated follicular thyroid cancer. *Cancer Sci*, 2011; 102(4):762-768.

Wyllie AH, Bellamy CO, Bubb VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L, Harrison DJ, Hooper ML, Toft N, Webb S, Bird CC. Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer*, 1999; 80 Suppl 1:34-37.

X

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2005; 12(2):245-262.

Y

Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101(42):15100-15105.

Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994; 369(6478):321-323.

You L, He B, Xu Z, Uematsu K, Mazieres J, Mikami I, Reguart N, Moody TW, Kitajewski J, McCormick F, Jablons DM. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*, 2004; 23(36):6170-6174.

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(22):8063-8069.

Z

Zhang HY, Meng X, Du ZX, Fang CQ, Liu GL, Wang HQ, Deng WW. Significance of survivin, caspase-3, and VEGF expression in thyroid carcinoma. *Clin Exp Med*, 2009; 9(3):207-213.

Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z, Zhang JN, Fu LA, He XS, Ma FC, Wang XL. Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer*, 2005; 104:2775-2783.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Diplomirani biohemičar Sonja Šelemetjev rođena je 19.09.1978. u Beogradu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa biohemija, upisala je školske 1997/1998. godine. Diplomirala je 2004. godine sa prosečnom ocenom 8.44. Diplomski rad sa temom „*Imunohistohemijska detekcija galektina-3 u tkivu papilarnog karcinoma štitaste žlezde i korelacija sa kliničkim parametrima*“ je odbranila sa ocenom 10. Od 2004. godine je zaposlena u Institutu za primenu nuklearne energije-INEP na mesto istraživača pripravnika, na projektu „Glikobiološki aspekti fizioloških i patofizioloških procesa“ u periodu od 2004-2005. Od 2006-2010. godine je na projektu „Molekularni mehanizmi i biohemijska osnova tumora štitaste žlezde“ (143039). U toku trajanja ovog projekta, odbranila je magistrsku tezu sa temom „*Analiza ekspresije regulatornih molekula apoptoze (Bcl-2, Bax, p53), apoptotske smrti ćelija i proliferativnog markera (PCNA) u papilarnom i anaplastičnom karcinomu štitaste žlezde*“ i ocenom 10 čime je stekla zvanje istraživač saradnik. Od 2011 je na projektu „Molekularna karakterizacija tumora štitaste žlezde: biološki i klinički aspekti“ (173050).

Sonja Šelemetjev je do sada bila autor i koautor pet naučnih publikacija u časopisima međunarodnog značaja i koautor sedam međunarodnih saopštenja iz uže naučne oblasti.

9. PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ мр Соња А. Шелеметјев

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Сурвивин и VEGF-C у папиларном и анапластичном карциному штитасте жлезде:

експресиони профили, улога у биологији тумора и клиничко-патолошки значај

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

У Београду, 21.03.2014.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора мр Соња А. Шелеметјев

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада Сурвивин и VEGF-C у папиларном и анапластичном карциному штитасте жлезде: експресиони профили, улога у биологији тумора и клиничко-патолошки значај

Ментор

др Дубравка Цвејић, научни саветник ИНЕП-а

др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и научни саветник ИБИСС-а

Потписани/а мр Соња Шелеметјев

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

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

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

У Београду, 21.03.2014.

Потпис докторанда

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Сурвивин и VEGF-C у папиларном и анапластичном карциному штитасте жлезде:
експресиони профили, улога у биологији тумора и клиничко-патолошки значај

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 21.03.2014.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.