

Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi

Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev

Odeljenje za endokrinologiju i radioimunologiju, Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt: marecko@inep.co.rs

Apstrakt

Papilarni tiroidni karcinom (PTK) je najčešći oblik endokrinog maligniteta koji se javlja sa različitim stepenom agresivnosti. Identifikacija pacijenata koji će imati teži klinički tok je jedan od najvećih problema tiroidne onkologije. U ovom radu su predstavljeni savremeni tokovi bazičnih molekularno-bioloških istraživanja sa ciljem selekcije molekularnih markera poboljšanih prognostičkih performansi. Savremeni markeri su podeljeni na: molekularni "background" pacijenta (genski polimorfizmi); preoperativni cirkulišući markeri (tumorska DNK i RNK, tumorske ćelije i ekstraćelijske vezikule); intraoperativni markeri; postoperativni markeri (promene na nivou gena i proteina detektovane iz hirurški odstranjenog materijala) koji bi pomogli u proceni opsega hirurškog zahvata i personalizaciji terapijskog toka. Takođe je dat osvrt na prednosti i nedostatke svakog markera kao i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi.

Ključne reči: papilarni tiroidni karcinom, prognostički markeri, molekularna patogeneza

Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice

Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev

Department of Endocrinology and Radioimmunology, Institute for the Application of Nuclear Energy – INEP, University of Belgrade, Serbia

Correspondence: marecko@inep.co.rs

Abstract

Papillary thyroid carcinoma (PTC), the most common form of endocrine malignancy displays various extents of aggressiveness. Identification of patients who are at risk of developing more severe forms of the disease is of great importance in thyroid oncology. In this review we summarized contemporary basic molecular-biological research aimed to select molecular markers with improved prognostic accuracy. These markers are divided as: patients' molecular background (genetic polymorphisms); preoperative circulating markers (tumor DNA and RNA, tumor cells and extracellular vesicles); intraoperative markers; postoperative markers (changes on genetic and protein levels detected from surgically removed tissue) that could aid the assessment of surgical extent and personalization of therapy. We also elaborated on benefits and disadvantages of each marker and their applicability in clinical practice.

Key words: papillary thyroid carcinoma, prognostic markers, molecular pathogenesis

UVOD

Papilarni tiroidni karcinom (PTK), najčešći oblik endokrinog maligniteta, u većini slučajeva ima dobru prognozu i nizak nivo rekurencije. Međutim, zbog nedovoljno razjašnjenih molekularnih događaja, manji broj pacijenata razvija težu kliničku sliku okarakterisanu loko-regionalnom invazijom i metastatskom diseminacijom, što potencijalno rezultuje smrtnim ishodom. Kako incidenca PTK poslednjih decenija beleži rast, postoji sve prisutnija potreba da se identifikuju pacijenti koji će razviti teži tok bolesti, kako bi im se prilagodila terapijska strategija, kako u opsegu operativnog zahvata, tako i postoperativni tok lečenja. Mnoge studije u prošlosti su identifikovale niz kliničkopatoloških parametara indikativnih za predikciju toka PTK. Uopšteno govoreći, ovi faktori se mogu razvrstati u 4 grupe:

1. Pacijentov "background" (podaci o pacijentu, epidemiološki faktori, urođena predispozicija)
2. Preoperativni nalazi (ultrazvuk štitne žlezde i regionalnih limfnih čvorova, citološki nalaz aspirata finom iglom, magnetna rezonanca)
3. Intraoperativni nalazi- nalaz hirurga u toku resekcije (prisustvo ekstratiroidne invazije i uznapredovalost tumora)
4. Postoperativni nalazi (izveštaj patologa sa podacima o histološkom tipu, veličini tumora, ekstratiroidnoj invaziji, multifokalnosti, prisustvu metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenih metastaza, TNM stadijum)

U cilju kliničke stratifikacije pacijenata razvijen je niz klasifikacija koji uzimaju u obzir ove faktore. Preoperativni podaci se baziraju na citološkom nalazu dobijenom iz aspirata finom iglom (FNAB eng. fine needle aspiration biopsy), klasifikovan po Bethesda klasifikaciji. Postoperativni nalaz definiše patolog iz arhivskog materijala koristeći TNM klasifikaciju predloženu od strane American Joint Committee on Cancer (AJCC) koja uzima u obzir sledeće informacije: pol, starost, veličinu tumora, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima i ekstratiroidne invazije. Ipak, trenutna klasifikacija PTK pacijenata suočava se sa nizom ograničenja i izazova. Neadekvatna preciznost, invazivnost pri uzorkovanju, subjektivnost patologa u tumačenju nalaza i nemogućnost predviđanja rekurencije su samo neki od njih. Iz tih razloga, već duži niz godina u velikom broju laboratorija vrši se genetička, molekularna i biološka karakterizacija PTK kako bi se identifikovale molekularne promene koje prate tiroidnu onkogenezu, a koje bi bili pogodni kandidati kao molekularni markeri boljih prognostičkih performansi od postojećih.

U ovom radu je dat pregled savremenih istraživanja molekularnih markera u polju prognostike papilarnog tiroidnog karcinoma. Molekularni markeri su grupisani prema podeli iznad, odnosno obrađeni su biomarkeri koji se ispituju kao urođene predispozicije, preoperativni i postoperativni markeri.

134 PROGNOŠTIČKI MOLEKULARNI MARKERI U SAVREMENIM ISTRAŽIVANJIMA

1. Pacijentov genetički "background" kao prognostički faktor PTK

Funkcionalni genski polimorfizmi koji se prirodno javljaju u populaciji bilo u promotorskim ili kodirajućim sekvencama gena uglavnom imaju zanemarljiv fenotipski efekat. Međutim, na primeru mnogih patoloških stanja je pokazano da pod određenim uslovima mogu predstavljati predispoziciju za susceptibilnost i klinički tok. U slučaju PTK, nekoliko istraživačkih grupa je dokumentovalo povezanost nasleđenih genetskih varijanti sa agresivnošću maligniteta.

Baysel i saradnici su pokazali da polimorfizam u genu za vitamin D (rs2228570) asocira sa prisustvom limfnih nodalnih metastaza (metastazama u limfnim čvorovima), multifokalnošću i veličinom tumora. Slična studija je identifikovala dva polimorfizma u genu za CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), jedan u promotorskoj (rs4148682) a drugi u kodirajućoj sekvenci (rs213950) sa progresijom bolesti. Obe analizirane alteracije su korelisale sa tumorskom multifokalnošću i metastazama u cervikalnim čvorovima. Još jedna zanimljiva studija je našla povezanost polimorfizma u mikroRNK let-7 (rs10877887 i rs13293512), sa rizikom od razvoja višestrukih tumora i pojavom limfnih metastaza. Na kraju, studija na kohorti pacijenata iz Srbije objavljena 2019. godine od strane naše laboratorije pokazala je povezanost nukleotidne supstitucije u promotoru gena za Matriksnu metaloproteinazu-9 sa razvojem ekstratiroidnih ekstenzija i stadijumom bolesti.

Obzirom da su genetski polimorfizmi urođena osobina, njihovo prisustvo može da se detektuje iz širokog dijapazona bioloških uzoraka pacijenta, što uzorkovanje čini lakim i neinvazivnim. U bazičnim molekularno-biološkim i genetičkim istraživanjima u upotrebi je veliki broj metoda za detekciju genetičkih polimorfizama, baziranih na sekvenciranju, hibridizaciji, enzimskoj digestiji, i drugim post-amplifikacionim metodama baziranim na fizičkim osobinama DNK. Međutim, kako je za primenu u kliničkoj praksi od ključne važnosti i ekonomska isplativost testa, u translacionim istraživanjima se uglavnom ispituje mogućnost primene PCR-RFLP (polimerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism), kao brza, jednostavna i ekonomična metoda.

2. Preoperativni molekularni markeri

Citološki nalaz dobijen aspiracijom finom iglom iz tiroidnog nodusa trenutno predstavlja zlatni standard u preoperativnoj dijagnostici tumora tiroidee. Međutim, ovo predstavlja agresivnu proceduru potencijalno praćenu komplikacijama, dok je njena pouzdanost narušena mogućnošću da se umesto tumorskih ćelija neselektivno uzorkuje okolno inflamatorno ili nekrotično tkivo. Iz ovog razloga FNAB nije u stanju da pouzdanu dijagnozu u oko 30% slučajeva, dok je prognostička stratifikacija još nepouzdanija. Novi pristup koji se trenutno ispituje kao alternativa aspiratima je koncept „Tečne biopsije“. Tečna biopsija je nova paradigma u uzorkovanju i analitici koja se bazira na detekciji biološkog materijala poteklog od tumora iz cirkulacije pacijenta, čineći je daleko manje invazivnom od FNAB-a. Kandidati koji su do sada ispitivani kao cirkulišući markeri progresije PTK su:

Cirkulišuća tumorska DNK (ctDNK)

Cirkulišuća tumorska DNK može biti aktivno otpuššana od strane tumora ili da potiče od razgrađenih tumorskih ćelija koje su prošle kroz apoptozu ili nekrozu. Prednost ctDNK kao tumorskog markera leži u njenoj visokoj stabilnosti, kao i u tome što nosi sve genetske karakteristike primarnog tumora: epigenetske modifikacije, mutacije, mikrosatelitsku nestabilnost i rearanžmane, koji se mogu detektovati kao specifičan „potpis“ tumora. Sa druge strane, njeni nedostaci potiču od toga što je prisutna i u drugim patološkim stanjima kao što su inflamacija, trauma tkiva ili hronične bolesti, ali i kod zdravih osoba. Detektuje se digital droplet PCR-om ili sekvenciranjem nove generacije (NGS) iz seruma pacijenata što je za sada čini nedostupnim markerom u standardnoj kliničkoj praksi.

U slučaju PTK, istraživanja ctDNK su još u povoju i za sada se više ispituju kao dijagnostički, a ne prognostički marker. Zane i saradnici su u studiji iz 2013 detektovali veću količinu ctDNK u poodmaklim stadijumima i slabije diferenciranim PTK. Allin i saradnici su kod malog broja PTK pacijenata pomoću ctDNK predikovali pogoršanje bolesti, što markeri u konvencionalnoj upotrebi nisu uspjeli. Metaanaliza koja je uključila 9 studija i koja je poredila prisustvo cirkulišuće *BRAF V600E* mutacije koja je česta u PTK, je objavila veliku heterogenost i nepouzdanost podataka u vezi njihove upotrebljivosti. Zanimljiva studija koja je merila nivo metilacije 5 cirkulišuća gena (*CALCA*, *CDH1*, *TIMP-3*, *DAPK*, *RARB2*) je zaključila da metilacioni status predikuje pojavu novih nodusa i rekurencu.

Cirkulišuća tumorska RNK

Tumorske ćelije otpuštaju znatnu količinu svih vrsta RNK u cirkulaciju, i stabilnost pojedinih RNK molekula je začuđujuće velika. Pretpostavka je da se ovi molekuli pakuju u ekstraćelijske vezikule ili cirkulišu vezani za proteine, te su time zaštićeni od delovanja serumskih RN-aza. Iako postoje oprečna mišljenja, u slučaju PTK su pronađene informaciona RNK (iRNK), mikro RNK (miRNK) i duge nekodirajuće RNK, lncRNK (eng. long non-coding RNA) čija je deregulacija razmatrana kao tumor-marker.

Od iRNK koje su do sada predložene kao novi marker progresije PTK najviše obećava cirkulišući receptor tireostimulirajućeg hormona (TSHR), koji se detektuje u limfocitnoj frakciji pune krvi i predstavlja surogat marker cirkulišućih tumorskih ćelija. Preoperativno izmerena iRNK TSHR koreliše sa stepenom invazije tumorske kapsule, starošću pacijenta i prisustvom limfnih metastaza. Ovaj marker takođe može poslužiti i u stratifikaciji rizika za papilarni mikrokarcinom; pokazana je njegova pozitivna korelacija sa limfnim metastazama kod pacijenata PTK mikro starijim od 45 god.

MikroRNK (miRNA) su male RNK vrste koje se sastoje od oko 18-25 nukleotida i imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije na posttranskripcionom nivou. Oni se vezuju za nesavršeno komplementarne regione u 3' - netraslatiranim (3'-UTR) regionima informacione RNK i utiču time na njihovu degradaciju ili inhibiciju translacije. MikroRNK su veoma stabilne u cirkulaciji, a zbog njihove deregulisane ekspresije u većini karcinoma, ispituju se kao potencijalni cirkulišući markeri maligniteta.

Yu i saradnici su pokazali da serumski nivoi miR-151-5p korelišu sa veličinom tumora, miR-222 sa stadijumom, a oba korelišu sa limfnim metastazama. Druga studija je ustanovila korelaciju miR-222, miR-221 i miR-146b sa ekstratiroidnom invazijom, višim TNM stadijumom, i limfnim metastazama. Preoperativni i postoperativni cirkulišući nivoi miR-222 i miR-21 su takođe pokazali korelacije sa ekstratiroidnom invazijom i limfnim metastazama. Nekoliko studija nije uspelo da utvrdi povezanost serumskih miR sa parametrima agresivnosti.

Duge nekodirajuće RNK su cirkulišuće RNK dužine preko 200 nukleotida koje ne kodiraju proteine, ali učestvuju u svim aspektima genske regulacije. Imaju ulogu u velikom broju fizioloških i patoloških procesa uključujući malignu transformaciju, pri čemu mogu imati protoonkogensku ili tumor-supresorsku funkciju. Studija objavljena od strane Qiu i saradnika je koristila mikroerejski čip kako bi uporedila ekspresiju lncRNK između relativno mirnih i agresivnih formi PTK, i zaključila da ENST00000462717 i ENST00000415582 imaju povišenu, a TCONS_00024700 i NR_028494) sniženu ekspresiju kod PTK pacijenata koji su razvili plućne metastaze. Druga studija je našla da deregulacija GAS8-AS1 utiče na progresiju PTK GAS8-AS1.

Cirkulišuće tumorske ćelije

Cirkulišuće tumorske ćelije su ćelije poreklom od primarnog tumora koje su stekle invazivne karakteristike i prešle u krvotok. One su najverovatniji izvor tumorske diseminacije i razvoja udaljenih metastaza što ih potencijalno čini odličnim prediktorom lošeg ishoda bolesti. U slučaju PTK, cirkulišuće tumorske ćelije su nedovoljno ispitane. Zbog kompleksne tehnologije izolacije (obogaćivanje na osnovu specifičnih površinskih markera kao što je EpCAM) i visoke cene eksperimenata, do sada je objavljen mali broj studija sa nedovoljnim brojem uzoraka da bi se doneli validni zaključci u vezi njihove uloge u tiroidnoj onkologiji. Ipak, mali broj studija je objavio obećavajuće rezultate dovodeći ih u vezu sa pojavom udaljenih metastaza i ukupnim preživljavanjem.

Ekstraćelijske vezikule

Ekstraćelijske vezikule su heterogena grupa membranskih vezikula koje ćelija aktivno otpušta u telesne tečnosti. Mogu da nose biomolekule, metabolite, pa čak i organele roditeljske ćelije i smatraju se odrazom molekularnog profila ćelije porekla. Ovo ih čini nosiocem molekularnih informacija i potencijalnih biomarkera u cirkulaciji. Egzozomi su ekstraćelijske vezikule veličine 30-120nm koje su najviše izučavane zbog ustaljenih protokola izolacije. Molekuli egzozomom zaštićeni od degradacije koji imaju najveći potencijal kao prognostički i dijagnostički markeri su miRNK. U slučaju PTK pokazano je da su miR-146b-5p i miR-222-3p egzozomskog porekla dobri prediktori pojave metastaza u limfnim čvorovima i doprinose migratornim sposobnostima tumora, dok miR-485-3p koreliše sa veličinom tumora, pojavom ekstratiroidne invazije, limfnim metastazama i odmaklim stadijumom bolesti. Takođe, miR-34a i miR-17-3p utiču na proliferativnu sposobnost ćelija PTK i razmatraju se kao potencijalni prognostički markeri.

Glavne poteškoće u upotrebi egzozoma kao biomarkera odnose se na njihovu heterogenost i probleme sa izolacijom. Ultracentrifugiranje je najčešći metod izolacije egzozoma, međutim ovaj metod ima slabu reproducibilnost i prinos, i ne diskriminiše egzozome poreklom od tumorskih i zdravih ćelija.

Navedeni analiti prikupljeni tečnom biopsijom, iako predstavljaju intrigantnu i potencijalno obećavajuću alternativu FNAB-u, još uvek su u fazi bazičnih istraživanja i verovatno neće ući u kliničku praksu u doglednoj budućnosti. Rezultati objavljeni od strane različitih istraživačkih grupa su neusaglašeni i obrađeni na malom broju uzoraka, dok je neophodna oprema za njihovu izolaciju skupa i daleko od komercijalne upotrebe. Ipak, ovo je vredno i zanimljivo polje istraživanja koje, zbog brojnih poteškoća sa kojima se suočava savremena tiroidna onkologija, nosi potencijal za kliničku praksu. U nadolazećoj eri personalizovane medicine, preoperativno molekularno-biološko profilisanje tumora pojedinačnih pacijenata neinvazivnim metodama bi donelo brojne prednosti u planiranju operativnog zahvata i postoperativnog tretmana.

3. Intraoperativni molekularni markeri

Intraoperativni molekularni markeri su molekularne informacije o tumorskom potencijalu za širenje koje se mogu dobiti u toku resekcije. Iako spadaju u markere koji se uzorkuju invazivnom metodom, za razliku od postoperativnih markera ipak daju blagovremenu informaciju o neophodnom opsegu operativnog zahvata. Intraoperativni molekularni imidžing je nova tehnologija sa potencijalom da dramatično unapredi hirurške operacije omogućavajući hirurgu da vizualizuje različite delove neoplazme fluorescentnim obeležavanjem. Međutim ova metoda još uvek nije standardizovana u kliničkoj praksi za PTK. Za razliku od toga, intraoperativni "smrznuti isečci" se koriste u tiroidnoj hirurgiji za vizuelizaciju histologije tumora, sa potencijalom i za molekularna ispitivanja.

4. Postoperativni molekularni markeri

Postoperativni molekularni markeri su molekuli čije se prisustvo i karakteristike mogu analizirati iz hirurški odstranjenog tumorskog tkiva. Najčešće ispitivane alteracije su promene u ekspresiji i posttranslacionoj modifikaciji proteina (fosforilacije, glikozilacije, acetilacije) koje se uglavnom detektuju imunohistohemijom i imunoblotom. Takođe se mogu detektovati i genetske promene (mutacije, abnormalna metilacija, genska amplifikacija, pojačana promotorska aktivnost, stabilnost iRNK i alternativni splajsing) metodama baziranim na PCR-u i sekvenciranju. Ovi markeri se mogu ispitati kako na uzorcima svežeg tkiva dobijenog nakon operacije i zamrznutog u tečnom azotu, tako i na arhivskom materijalu (tkivu fiksiranom u formaldehidu i ukalupljenom u parafinu).

4a. Genetički markeri agresivnosti

Genetički markeri progresije tiroidnog karcinoma koji su obrađeni u ovom radu obuhvataju somatske mutacije, izmenjenu ekspesiju kodirajućih RNK (informacionih RNK) i nekodirajućih RNK (miRNK i IncRNK). Somatske mutacije su markeri koji se od ranih 2000.-tih proučavaju u svrhu prognostike PTK. Iako se pojedine somatske mutacije već preporučuju u kliničkoj primeni kao pomoćni tzv "tiebreaker" markeri, za većinu postoji debata u pogledu njihove upotrebljivosti, te one i dalje predstavljaju predmet aktivnog istraživanja. Kao i u slučaju preoperativnih markera, noviji

pravci istraživanja u postoperativnim markerima uzimaju u obzir i deregulaciju miRNK i lncRNK kao prediktore nepovoljnog kliničkog toka PTK.

BRAF V600E

BRAF je serin-treonin kinaza iz RAF familije kinaza koje utiču na RAS/RAF/MEK/ERK signalni put. Mutacije u BRAF genu se javljaju u >50% PTK, a 98-99% njih predstavlja *BRAF V600E* mutacija. *BRAF V600E* je tačkasta mutacija u egzonu 15 koja uzrokuje zamenu timina sa adeninom na nukleotidu 1799, što na proteinskom nivou ima za posledicu zamenu valina za glutamat. Ova zamena konstitutivno aktivira BRAF kinazu, što rezultuje hroničnom stimulacijom MAPK signalnog puta. Na ovaj način, *BRAF V600E* mutacija utiče na signalne puteve koji deluju na agresivnost kancera, preko mehanizama ćelijske adhezije, migracije i invazije.

Osim u papilarnom karcinomu, ova mutacija je pronađena i u 10-20% slabo diferenciranih karcinoma i 20-40% anaplastičnih karcinoma. Obzirom da je kod *BRAF V600E* pozitivnih ATC ista mutacija pronađena i u njegovim dobro diferenciranim regijama, pretpostavlja se da je to jedan od ranih događaja koji predodređuje tumor na dediferencijaciju. Ovo bi ukazivalo da su dobro diferencirani tiroidni karcinomi sa *BRAF V600E* skloniji agresivnijem ponašanju.

Studija koja je prva povezala *BRAF V600E* mutacije sa agresivnošću je objavljena 2015. god i nakon nje su mnoge studije pokazale da *BRAF V600E* koreliše sa kliničko-patološkim faktorima PTK. Dve velike multicentrične studije na 2099 i 1849 pacijenata respektivno su demonstrirale da je *BRAF V600E* mutacija nezavisan prognostički faktor za PTK i koreliše sa PTK-specifičnim mortalitetom. Ipak, ova mutacija je i dalje interesantna za istraživanje jer se tokom godina pojavio i određen broj studija koje su pokazale da ona nije povezana sa progresijom tumora. Rezultati koje je naša laboratorija dobila prilikom analize *BRAF V600E* mutacije i agresivnosti tiroidnog kancera, govore u prilog njenoj povezanosti sa lošijim ishodom. U dve naše studije pokazali smo da PTK pacijenti pozitivni na *BRAF V600E* i sa visokom ekspresijom proteina kaveolina-1 su bili povezani sa agresivnijim varijantama, dok je *BRAF V600E* mutacija sama ili sa visokom ekspresijom EGFR proteina korelirala sa ekstratiroidnom invazijom i metastazama u limfnim čvorovima.

Za papilarne mikrokarcinome niskog rizika (manji od 2mm koji nemaju ekstratiroidnu invaziju ili limfne metastaze) *BRAF V600E* mutacija je predložena kao marker odlučivanja o tretmanu. Za njih se sve više preporučuje kliničko praćenje umesto operacije, zbog njihovog niskog metastatskog potencijala. Ipak jedan deo mikrokarcinoma će razviti metastaze, pa čak biti i fatalan. *BRAF wt* mikrokarcinomi su dokazano niskorizični, te bi terapija ovakvih karcinoma mogla biti manje agresivna.

TERT

TERT (eng. Telomerase reverse transcriptase), predstavlja katalitički domen enzima telomeraze, čija funkcija uključuje dodavanje telomera na krajeve hromozoma čime se održava njihov integritet i genetička stabilnost. TERT-om aktivirana telomeraza u toku maligne transformacije ćelije, promovira ćelijske i molekularne aktivnosti karakteristične za kancer. U promotoru gena za *TERT* su pronađene dve tačkaste mutacije, C228T i C250T koje se međusobno isključuju i povezane su sa malignitetom tiroidee. Ove mutacije stvaraju konsenzus mesta za vezivanje određenih transkripcionih faktora što za posledicu ima povećanje transkripcione aktivnosti promotora. Ovo za posledicu ima povećanje ekspresije *TERT*-a na iRNK i proteinskom nivou, kao i dužine telomera. Primer za to je vezivanje GABP, ETS transkripcionog faktora koji selektivno vezuje mutantni promotor uzrokujući povećanu transkripciju *TERT*-a.

Kod diferentovanog tiroidnog karcinoma *TERT* promotorske mutacije se javljaju sa učestalošću od 10-15%, a kod loše diferentovanog i anaplastičnog od 40-45%. Nijedna od ovih mutacija nije detektovana kod benignih tumora. *TERT* promotorske mutacije su veoma jasno povezane sa agresivnošću. Prvo, viša incidenca je detektovana kod agresivnijih i loše diferentovanih karcinoma gde su pokazale jaku povezanost sa starošću, veličinom tumora, ekstratiroidnom invazijom, vaskularnom invazijom, metastazama u limfne čvorove i udaljenim metastazama, višim stadijumom i mortalitetom.

TERT mutacije su kao prognostički markeri posebno korisne kada koegzistiraju sa *BRAF V600E* mutacijama ili *RAS* mutacijama. Karcinomi pozitivni na *BRAF V600E* i *TERT* promotorske mutacije čine posebnu agresivnu grupu sa čestim rekurencama i lošim ishodom. U primarnom PTK, učestalost zajedničkih *BRAF* i *TERT* mutacija je 7.7%. Pored velikog broja studija koje su pokazale asocijaciju sa kliničko-patološkim faktorima, dve studije su ubedljivo dokazale da koegzistencija ove dve genetske alteracije predviđa loš tok bolesti. U 2018. god je izašla i studija koja objašnjava ovaj fenomen sa mehaničkičke tačke gledišta. Naime, *BRAF V600E* mutant utiče na konstitutivnu aktivaciju MAP kinaze, i posledično na selektivno vezivanje GABP transkripcioni faktor za *TERT* promotor i malignu transformaciju ćelije.

RET/PTC

RET/PTC je hromozomski rearanžman kod kog se deo *RET* gena fuzioniše sa genima iz prostorno bliskog lokusa, što rezultuje nastankom RET himernih proteina koji su sposobni za ligand-nezavisnu dimerizaciju RET/PTC proteina.

Ovo dovodi do hronične stimulacije MAPK ili PI3K/Akt signalnog puta i za posledicu ima proliferaciju folikularnih ćelija. *RET/PTC* rearanžmani su otkriveni u papilarnom tiroidnom karcinomu odakle i potiče njihov naziv, a dva najčešća rearanžmana su *RET/PTC1* i *RET/PTC3*.

Nije do kraja jasno kolika je upotrebljivost *RET/PTC* rearanžmana u prognostici PTK. *RET/PTC1* se povezuje sa boljom prognozom jer se sreće kod manjih, klasičnih PTK, i karcinomima koji se retko dediferenciraju. Za razliku od *RET/PTC1*, *RET/PTC3* se detektuje kod agresivnijeg fenotipa PTK, bilo da je sporadičan ili indukovano radijacijom. *RET/PTC3* rearanžmani su pokazali pozitivnu korelaciju sa veličinom tumora, kasnijim stadijumom i metastatskim širenjem. Studija na 1500 pacijenata je pokazala da uzorci koji nose ove mutacije imaju agresivniji karakter od onih sa *RAS* mutacijama. Ipak, ove studije nisu dovoljno ubedljivo pokazale da se *RET/PTC* rearanžmani mogu upotrebiti u prognostici tiroidnih karcinoma, te je njihova klinička primena za sada ograničena. Rezultati naših istraživanja nisu pokazali da *RET/PTC1* i *3* mutacije imaju kliničku vrednost, u našoj populaciji. One nisu bile značajno češće u malignim tumorima u odnosu na benigne, niti su korelirale sa BRAF V600E mutacijom kao markerom agresivnog karaktera.

Kodirajuće RNK

Analiza informacione RNK kao prognostičkog markera je obrađena u malom broju studija sa skromnim zaključcima u pogledu kliničke primene. Jedna studija je ispitivala prognostičku primenu nivoa ekspresije gena koji su markeri tiroidne diferencijacije – TSHR, NIS, Tg i TPO. Pokazano je da nivoi iRNK za tireoglobulin korelišu sa MACIS skorom (MACIS – algoritam za procenu prognoze PTK baziran na kliničkopatološkim parametrima). Novija studija Tanake i saradnika je analizirala iRNK ekspresiju TERT gena kao markera progresije. Pokazano je da u slučaju odsustva TERT promotorskih mutacija, nivoi TERT iRNK mogu biti koristan prognostički marker, a kako se TERT mutacije najčešće javljaju kod starijih pacijenata, TERT iRNK je posebno korisna za stratifikaciju rizika kod mlade populacije.

MikroRNK

Deregulacija mikroRNK molekula u primarnom papilarnom tiroidnom karcinomu je pokazana u više studija. TCGA analiza je pokazala da se papilarni tiroidni karcinomi mogu klasifikovati u 6 klastera po ekspresiji mikroRNK molekula, od kojih je klaster 1 grupisao većinu niskorizičnih *RAS* –pozitivnih pacijenata, a klaster 6 većinu visokoćelijskih PTK, histološkog tipa PTK sa agresivnim ponašanjem. Ova analiza je ukazala da se ekspresija mikroRNK molekula u PTK razlikuje prema invazivnom karakteru maligniteta.

Pregled literature prognostičkog potencijala miR u PTK je pokazao da miRNA-221, miRNA-222, miRNA-135b, miRNA-181b, miRNA-146a, i miRNA-146b korelišu sa veličinom tumora, miRNA-146b, miRNA-221, and miRNA-222 sa vaskularnom invazijom, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-146a, miRNA-146b, miRNA-199b-5p, i miRNA-135b sa ekstratiroidnom invazijom, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-21-3p, miRNA-146a, miRNA-146b, i miRNA-199b-5p sa prisustvom limfnih metastaza, a miRNA-146b i miRNA-221 sa pojavom udaljenih metastaza.

Sistematski pregled radova objavljenih na temu asocijacije miRNK i agresivnosti PTK je pokazao da svaki od analiziranih miR molekula (miRNK-21, -34b, -130b, -135b, -146b, -151, -181b, -199b-5p, -221, -222, -21 451, -623, -1271, -2861, i let-7e) koreliše sa bar jednim kliničkopatološkim parametrom loše prognoze. Autori su ustanovili da je većina studija dovela u vezu tri miRNK – miR-146b, miR-221 i miR-222 sa nekoliko parametara agresivnosti, pre svega veličinom tumora, ekstratiroidnom invazijom, metastazama u limfnim čvorovima, višim TNM stadijumom.

Meta-analiza koja je uporedila studije koje su se bavile prognostičkim potencijalom miRNK u dugoročnom praćenju PTK je pokazala da specifične deregulisane mikroRNK mogu da predvide dugoročni ishod bolesti. Već pomenute miR-146b, -221 i -222 su se pokazale kao dobri prognostički markeri za regionalne i udaljene rekurencije PTK. U pogledu prognoze za ukupno preživljavanje, dve miR sa povišenom (miR-182 i -203) i tri s smanjenom ekspresijom (miR-26a, -381 i -791) su identifikovane kao dobri markeri.

Dugačke nekodirajuće RNK

Slično mikroRNK vrstama, i dugačke nekodirajuće RNK su ispitivane i kao tkivni, postoperativni markeri. lncRNK koje su do sad detektovane kao povišene u PTK, a koje su pokazale korelaciju sa bar jednim od parametara agresivnosti (veličinom tumora, metastazama u limfnim čvorovima, višim TNM stadijumom, multifokalnošću, rezistencijom na ¹³¹I, ekstratiroidnom invazijom ili ukupnim preživljavanjem) su ATB, CTD-3193013, ENSG00000415582, ENSG00000462717, FAL1, HIT000218960, HOTAIR, HOXD-AS1, LOC100507661, NONHSAT076754, NR-036575.1, PANDAR, XLOC-006074 i XLOC-051122. Snižena ekspresija BLACAT1, BANC1, CASC2, H19, GAS5, LINC00271, MEG3, NONHSAG051968, NONHSAT037832, NR-028494, RP5-1024C2.1 i TCONS-00024700 lncRNK koreliše sa bar jednim kliničkopatološkim faktorom. Od pomenutih lncRNK posebno se izdvajaju H19 i NR_036575.1 za koje je ROC analizom izračunata specifičnost >75% za detekciju limfnih nodalnih metastaza; LINC00271 koji može biti nezavisni riziko faktor rekurencije PTK; XLOC_051122, XLOC_006074 i Linc00941 koje su analizirane sekvenciranjem RNK, validirane RT-qPCR metodom

i dodatno potvrđene u TCGA studiji kao značajno asocirane sa agresivnošću i BANCER koja je temeljno ispitivana u PTK i za koju je pokazano da igra ulogu u razvoju PTK.

Naša laboratorija se bavila analizom upravo ove lncRNK i ustanovljeno je da ekspresija BANCER u PTK zavisi od prisustva BRAF V600E mutacije. Kod BRAF V600E negativnih PTK, BANCER može da detektuje slučajeve sa ekstratiroidnom invazijom dok promena BANCER ekspresije između tumorskog i susednog normalnog tkiva pokazuje korelaciju sa LNM kod BRAF V600E pozitivnih slučajeva.

4b. Proteinski markeri agresivnosti

Proteinski kandidati-biomerkeri, su oni molekuli koji učestvuju u ključnim ćelijskim procesima kao što su ćelijski rast i diferencijacija, proliferacija i apoptoza, pokretljivost i adhezija, razgradnja okoloćelijskog matriksa itd. Poremećaji u nekom delu ovih bitnih signalnih puteva mogu dovesti do nekontrolisanog rasta i rezistencije na odbrambene ćelijske mehanizme. Samim tim, predstavljaju dobre kandidate za ispitivanje njihove potencijalne uloge u dijagnostici i prognostici tiroidnih karcinoma.

Proteini programirane ćelijske smrti

U normalnim fiziološkim uslovima tkivna homeostaza se ostvaruje održavanjem balansa između programirane ćelijske smrti (apoptoze) i proliferacije. Poremećaji u ovom balansu vode različitim patološkim stanjima koji mogu da rezultuju nekontrolisanom proliferacijom i, posledično, malignom transformacijom. Iz tog razloga, potencijalni postoperativni prognostički markeri mogu da se traže u abnormalnoj ekspresiji ili poremećenom balansu regulatora ovih procesa.

Veliki broj istraživača se bavio analizom deregulacije p53 proteina koji je poznat kao "čuvar genoma" zbog svoje uloge u popravci DNK lanca i regulaciji ćelijskog ciklusa, a takođe funkcioniše i kao transkripcioni faktor za proteine i miRNK koji vrše centralnu ulogu u apoptotskom odgovoru. Jednu od bitnijih uloga p53 ostvaruje preko regulacije transkripcije još jednog proapoptotskog proteina- Bax-a. Hermann i saradnici su zaključili da je prisustvo visoke koncentracije p53 proteina praćeno visokom ekspresijom Bax-a u dobrodiferenciranim karcinomima štitaste žlezde, što dovodi do apoptotske smrti i daje bolju prognozu ovim tumorima. Istraživanja naše grupe su potvrdila odsustvo razlike u ekspresiji Bax-a u grupi dobro diferenciranih karcinoma, ali bez korelacije sa kliničkim parametrima. Ipak, pokazali smo značajnu asocijaciju p53 i Bax-a što sugerise postojanje ćelijskog odgovora na različita apoptotske stimuluse, s tim da ova veza nije dovoljna za realizaciju apoptotske smrti.

Odsustvo korelacije Bax-a kao proapoptotskog proteina sa kliničkopatološkim faktorima PTK motivisalo je istraživače da uzmu u obzir njegov odnos sa antiapoptotskim proteinom Bcl-2 kao prognostički faktor. Bcl-2 reguliše integritet spoljašne mitohondrijske membrane stvarajući kompleks sa Bax-om. Većina studija je pokazala da se nivo ekspresije Bcl-2 proteina smanjuje u diferenciranim karcinomima u odnosu na normalno tkivo što sugerise da se ova molekulska promena može smatrati ranim znakom tumorogeneze i lošijeg toka bolesti. Naša ispitivanja su, nasuprot tome, pokazala da se nivoi ekspresije Bcl-2 zadržavaju na visokom nivou u dobro diferenciranim karcinomima u odnosu na normalno tkivo, ali da se sinteza ovog antiapoptotskog proteina značajno snižava u slabo diferenciranom anaplastičnom karcinomu. Ipak, imunohistohemijske analize Bcl-2 ekspresije u našim istraživanjima nisu pokazale korelaciju sa tumorskom agresivnošću i prognozom bolesti. Pokazali smo da odnos Bcl-2/Bax značajno opada tokom progresije tiroidnog maligniteta, na osnovu čega bi se moglo očekivati da se kao posledica gubitka Bcl-2 i akumulacije Bax proteina javlja povišen stepen apoptotske smrti. Međutim, uprkos ovakvom odnosu glavnih učesnika u igri život/smrt, do aktivacije programirane ćelijske smrti ne dolazi. Isto tako p53, Bcl-2 i Bax nisu pokazali prognostički značaj u predviđanju toka bolesti tiroidno-onkoloških pacijenata, na šta ukazuje odsustvo korelacije njihove ekspresije sa kliničko-patološkim parametrima agresivnog ponašanja tumora (limfne metastaze, ekstratiroidna invazija, uznapredovali stadijum bolesti). Razlog za ovaj neuspeh bi se mogao potražiti nizvodno u apoptotskim signalnim putevima, sve do efektorskih molekula-kaspaza.

Još jedan anti-apoptotski protein koji u protekle dve decenije privlači dosta pažnje u oblasti prognostike raznih maligniteta je survivin. Survivin svoju glavnu ulogu u malignoj transformaciji ostvaruje inhibicijom kaspaza i sprečavanjem egzekucije apoptotskog procesa, ali pokazano je da ima i znatno širi spektar delovanja: reguliše ćelijski ciklus i angiogenezu, a pokazana je i njegova veza sa metastatskom diseminacijom.

Kao i većina drugih istraživačkih grupa, i naša je utvrdila povišen nivo ekspresije u tiroidnim tumorima koristeći imunoblot i imunohistohemijsku metodu. Čak je u 90% slučajeva karcinomskega tkiva nađeno prisustvo ovog proteina u citoplazmi, bez detekcije ekspresije u okolnom uslovnom nemalignom tkivu čineći ga i dobrim potencijalnim dijagnostičkim markerom. Pokazali smo da, osim što je zastupljen u većem broju slučajeva u agresivnom anaplastičnom karcinomu (85%) u odnosu na dobro diferenciran PTK (70%), dominantno intenzivno bojenje je bilo prisutno u nediferenciranoj varijanti u odnosu na dominantno umereno u PTK.

Kaspaze predstavljaju glavne izvršioce programirane ćelijske smrti, a među njima najčešće je aktivirana kaspaza-3 koja katalizuje degradaciju velikog broja ključnih ćelijskih proteina. U studiji iz 2013 god koja je obuhvatila 107 slučajeva PTK, autori su pokazali da u predikciji tumorskog ponašanja kaspaza-3 nije dala očekivane rezultate. U kohorti od čak 1900 pacijanata sa ranim stadijumom karcinoma dojke je pokazano je da kaspaza-3 ali ne i -8 povezana sa tumor-specifičnim preživljavanjem i da bi mogla dati korisne informacije o toku bolesti u različitim fenotipovima karcinoma. Obzirom da tumorska ćelija, u cilju sopstvenog preživljavanja pokušava da izbegne proces apoptoze, tako je i nivo sinteze kaspaza deregulisan. To je verovatni uzrok odsustva korelacije između ekspresije kaspaza i agresivnosti karcinoma, te ova egzekutorna grupa proteina nije atraktivna za ispitivanje prognostičkog potencijala.

Proteini proliferacije i regulatori ćelijskog ciklusa

Od proteina odgovornih za proliferativnu aktivnost ćelije, a koji obećavaju kao postoperativni markeri najviše je izučavan PCNA (proliferating cell nuclear antigen). PCNA je nuklearni protein, kofaktor DNK polimeraze-delta, uključen u replikativnu fazu ćelijskog ciklusa, tako da je njegova sinteza direktno proporcionalna proliferišućim statusu ćelije. PCNA kao marker najagresivnijih formi maligniteta je predlagan još početkom devedesetih godina prošlog veka, a rezultati dobijeni u našoj laboratoriji pokazuju da proliferativna aktivnost progresivno raste od papilarnog mikrokarcinoma, preko klinički manifestnog PTK do anaplastičnog karcinoma. Još jedan potencijalni prognostički marker vezan za rast i proliferativne procese je Ki67. Prospektivna studija rađena na više od 700 slučajeva PTK otkrila je vezu ki67 i veličine tumora, dok je metaanaliza iz 2017 godine našla statističku vezu i sa regionalnim i udaljenim metastazama.

Ciklin D1 je bitan regulator progresije ćelijskog ciklusa i često je dovođen u vezu sa progresijom tumora, mada mu se sa novijim istraživanjima dodeljuju i uloge u ćelijskoj migraciji i invaziji, angiogenezi, indukciji hromozomske nestabilnosti itd. Ekspresija ciklina D1 predstavlja rani događaj u tumorigenezi PTC ali njegova uloga u tumorskoj progresiji nije dovoljno ispitana kao ni njegova potencijalna primena u kliničkoj praksi. Pokazano je da povišena ekspresija ciklina D1 koreliše samo sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima, dok u imunohistohemijskoj studiji koja je obuhvatila 919 pacijenata sa PTK, zaključeno je da nema konzistentne veze između ekspresije ciklina D1 i loših prognostičkih faktora PTK. Bitnije informacije su dobijene na nivou genske ekspresije i moguće veze sa mehanizmom rekurencije bolesti.

Proteini angiogeneze

Još jedan proces čije intenziviranje prati nastanak i razvoj epitelnih tumora je angiogeneza. Tumor otpušta u svoju okolinu proangiogenetske faktore koji indukuju stvaranje guste mreže krvnih sudova, omogućavajući tumoru stalan priliv nutrijenata i kiseonika kao i mogućnost metastaziranja. U mnogim humanim malignitetima, uključujući tumor dojke, bešike i stomaka, pokazano je da angiogeneza, merena kao tumorska gustina mikrosudova, koreliše sa razvojem metastaza. Ovaj proces je naročito intenzivan u tumorima endokrinih organa koje inače karakteriše dobra vaskularizacija i fenestrovani epitel. Kako PTK dominantno diseminuje metastaze limfogenim putem, kao potencijalni marker njegove progresije najviše se izučavao VEGF-C, član porodice proangiogenetskih proteina zadužen za limfangiogenezu. Iz ovog razloga on potencijalno pruža informaciju o tendenciji tumora ka formiranju metastaza u limfnim čvorovima. Ovu pretpostavku podržali su rezultati istraživanja koji su pokazali da je ekspresija VEGF-C povišena u primarnim tumorima pacijenata sa papilarnim karcinomom koji imaju prisutne metastaze u limfnim čvorovima u odnosu na tumore bez metastaza. U ovim slučajevima detektovana je i gušća mreža limfnih sudova kako u tumorskom tako i u peritumorskom tkivu. Rezultati naših istraživanja su pokazali da je VEGF-C ekspimiran na visokom nivou u dobrodiferenciranom PTK ali i u nediferenciranim anaplastičnim karcinomima, sa tendencijom postepenog povećavanja tokom dediferencijacije. Osim u malignim ćelijama, potvrdili smo prisustvo i u endotelu vaskulature, pre svega u okolini malignog tkiva. U poređenju sa kliničko patološkim parametrima, imunohistohemijska analiza ekspresije VEGF-C je pokazala statistički značajnu korelaciju njegove visoke ekspresije i prisustva metastaza u limfnim čvorovima, ekstratiroidne invazije i uznapredovalog kliničkog stadijuma bolesti.

Proteini poreklom iz okoloćelijskog matriksa

Okoloćelijski matriks je dugo smatran za pasivan i stabilan okvir u kome obitavaju ćelije, sa čisto strukturnom, odnosno biomehaničkom ulogom. Danas se zna da je matriks jedna izuzetno dinamična sredina koja recipročno komunicira sa ćelijom, i obezbeđuje kontekstualne informacije odgovorne za kontrolu individualnog i kolektivnog ćelijskog ponašanja regulišući identitet, poziciju, proliferaciju i sudbinu svake ćelije. Zbog toga nije iznenađujuće što matriks tumorske mase poseduje različitu strukturu i molekularni profil od zdravog tkiva, a molekuli čija je ekspresija izmenjena mogu se tretirati kao potencijalni tumor markeri. U slučaju PTK, kao prognostički markeri najviše obećavaju članovi porodice kolagena, glikoproteina, matriksnih metaloproteinaza (MMP) i njihovih tkivnih inhibitora (TIMP). Naša laboratorija je uložila dosta napora u istraživanje matriksnih metaloproteinaza, ekstraćelijskih enzima odgovornih za

razgradnju okoćelijskog matriksa, koje fizički krče put pred invazivnim frontom tumora. Najviše smo izučavali MMP-9 i MMP-2 koje imaju sposobnost razgradnje bazalne membrane i omogućavaju prelazak metastatske ćelije u cirkulaciju, kao i njihov inhibitor TIMP-2. U sklopu toga pokazane su značajne statističke asocijacije između imunoekspresije pomenutih markera i karakteristika papilarnog karcinoma koje ukazuju na njegov invazivni potencijal. Visoka imunoekspresija MMP-2 je značajno korelirala sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima dok je TIMP-2 pokazao jače prisustvo u karcinomima većih dimenzija koji su izvršili invaziju na susedno tkivo. Kako se matriksne metaloproteinaze sintetišu kao latentni zimogeni koji se proteolički aktiviraju u okoćelijskoj sredini, zasebno je imunohistohemijski analizirana aktivna forma MMP-9 kao i zimografski merena proteolitička aktivnost. Imunohistohemijski detektovana aktivna forma MMP-9 se pokazala kao odličan prediktor pojave nepovoljnih karakteristika papilarnog karcinoma, i korelirala je sa prisustvom limfnih metastaza, ekstratiroidne invazije, stadijumom karcinoma i dubinom njegove neoplastične infiltracije. Usporedna analiza zimografski izmerenih nivoa aktivacije MMP-2 i MMP-9 u papilarnim karcinomima različite agresivnosti je pokazala da je nivo aktivacije MMP-9 je bio značajno viši u uzorcima prezentovanim sa ekstratiroidnom invazijom i limfnim metastazama, kao i u uzorcima sa višim stepenom neoplastične infiltracije i uznapredovalim stadijumom bolesti, u odnosu na karcinome bez ovih karakteristika.

Strukturni proteini citoskeleta

Tumorigenezu karakteriše pojačana depozicija strukturnih proteina koji doprinose sticanju migratornih i invazivnih sposobnosti regulisanju međućelijskih kontakata i izbegavanju prepoznavanja od strane imunog sistema. Citokeratin-19 pripada familiji intermedijalnih filamenata koji učestvuje u izgradnji citoskeleta i čini mehaničku potporu ćelije. Njegova ekspresija se znatno pojačava sa malignom transformacijom. Mnogi autori navode da se javlja u PTK u više od 90% ćelija, dok su naša istraživanja potvrdila njegovu vezu sa prisustvom ekstratiroidne invazije i veličinom tumora.

Kaveolin-1 je mali protein mase 21-22 kDa, iz familije strukturnih proteina kaveolina, glavnih gradivnih jedinica membranskih invaginacija kaveola. Kaveolin-1 stupa u interakciju sa proteinima pričvršćenim na membrani u okviru kaveola i ovom interakcijom modulira njihovu aktivnost. U zavisnosti od vrste proteina sa kojim interreaguje, kaveolin-1 igra tumor promotersku ili tumor supresorsku ulogu. Njegova ekspresija se razlikuje prema histotipovima TK kao i varijantama PTK, a pokazano je da se i njegovi proteinski nivoi razlikuju prema ćelijskim odeljcima.

U našoj laboratoriji je ispitivana ekspresija ovog proteina i na iRNK i proteinskom noviu i pokazana je korelacija kaveolina-1 na proteinskom nivou sa kliničko patološkim parametrima u zavisnosti od ćelijskog odeljka. Naime novoi kaveolina-1 u epitelu su bili u pozitivnoj korelaciji sa pojavom limfnih nodalnih metastaza, dok je stromalni kaveolin-1 bio u negativnoj korelaciji sa dubinom neoplastične infiltracije. Posmatrana je i korelacija kaveolina-1 sa BRAF V600E mutacijom kao lošim prognostičkim markerom, i pokazano je da stromalni kaveolin-1 negativno koreliše sa prisustvom ove mutacije. Naši rezultati su pokazali da je kaveolin-1 moguće upotrebiti kao pomoćni prognostički marker, ali da je njegovu ekspresiju potrebno posmatrati iz ugla ćelijske distribucije.

Proteini adhezije

Promene u adhezivnim karakteristikama prilikom neoplastične transformacije igraju bitnu ulogu u epitelu mezenhimske tranziciji i sticanju migratornog ćelijskog fenotipa. Mnogi adhezivni proteini su prekomerno ekspimirani prilikom progresije PTK, uključujući kadherine, galektine, fibronektine i selektine. Galektin-3 je član porodice lektina čija je zajednička karakteristika da se sa velikim afinitetom vezuju za β -galaktozidne strukture. Biološke funkcije galektina-3, pored adhezije, uključuju aktivaciju određenih ćelija, mitogenu stimulaciju i aglutinaciju, dok lokalizacija pored membranske može biti i citoplazmatska i jedarna. U jedru čini komponentu ribonukleoproteinskog kompleksa i smatra se da ima ulogu u splajsovanju RNK. Pretpostavlja se da utiče na apoptozu inhibiranjem protein kinaza i kaspaza. Što se tiče korelacije galektina-3 i napredovanja malignog procesa, dobijeni su oprečni rezultati. Povećanje nivoa ekspresije galektina-3 je dovedeno u vezu sa povećanim brojem interakcija između tumorskih ćelija i ekstraćelijskog matriksa posledično dovodeći do promena u ćelijskim deobama i razvoju tumora. U slučaju tiroidnih karcinoma, pokazano je da galektin-3 ima najintenzivniju i najkonzistentniju ekspresiju u epitelnim ćelijama PTK, dok su folikularni i anaplastični karcinomi pokazivali veću varijabilnost u bojenju. Iako mu je posvećena velika pažnja sa dijagnostičkog aspekta, naša ispitivanja njegovog prognostičkog potencijala za sada nisu dala obećavajuće rezultate. Visoka imunoekspresija galektina-3 nije korelirala sa prisustvom limfnih metastaza i ekstratiroidne invazije, i u tom smislu nije dala klinički korisnu informaciju. Naši rezultati su pokazali da je galektin-3 pre fenotipska karakteristika PTK nego marker njegovih uznapredovalih stadijuma.

Protein kinaze

Za epidermalni faktor rasta (EGF) i njegov receptor (EGFR) je pokazano da učestvuju u patogenezi različitih tipova karcinoma i da shodno tome predstavljaju atraktivnu metu za molekularnu terapiju. EGFR je transmembranski receptor

sa tirozin kinaznom aktivnošću koji nakon vezivanja za ligand pokreće MAPK i PI3K/Akt signalni put koji učestvuju u proliferaciji, preživljavanju, angiogenezi i migraciji. Veliki broj studija je pokazao da uzroci poremećaja u regulaciji EGFR signalnog puta leže u povišenoj ekspresiji kako liganda, tako i samog receptora, ali i u aktivirajućim mutacijama. Upravo ove pojave su povezane sa uzanpredovalim stadijumom bolesti, prisutnim metastazama i lošom prognozom.

Foklana adhezijska kinaza (FAK) takođe pripada porodici protein kinaza koja osim što prima informacije od EGFR, učestvuje i u prenosu signala od integrinskih receptora. Tumorskoj patogenezi doprinosi pojačavajući i MAPK3 i PI3K signalni put promovišući proliferaciju i preživljavanje ali i sposobnost migracije i diseminacije karcinomske ćelije. U tiroidnom karcinomu se vezuje za invazivne karakteristike.

Visoke ekspresije i EGFR i FAK su u našim analizama korelirale sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima, ekstratiroidnom invazijom, stepenom neoplastične infiltracije i veličinom tumora (odnosno pT statusom koji uzima u obzir dimenzije tumora). Oba proteina su se pokazala odgovorna za hemio-rezistenciju, pogodna za predviđanje toka terapije ali i kao mete za nove ciljane molekularne terapije[94].

Detekcija postoperativnih markera progresije PTK nosi brojne prednosti u bazičnim istraživanjima razumevanja biologije tumora, a mnogi od njih su i prevedeni u kliničku praksu kao pomoćni markeri uz standardne procedure. Imunohistohemija koja je najčešće upotrebljavana metoda za analizu arhivskog materijala se uspešno upotrebljava već dugi niz godina, se karakteriše dobro ustaljenim protokolima, niskom cenom i dostupanim prilivom uzoraka. Njena prednost je i u tome što daje informaciju ne samo o ekspresiji proteina od interesa, već i o njegovoj tkivnoj i subćelijskoj lokalizaciji. Sa druge strane, imunoblot tehnikom se može preciznije kvantifikovati količina analita. Nedostaci postoperativnih markera leže u činjenici da se informacija o prognozi tumora dobija tek nakon operacije pacijenta. Takođe, ovim metodama se detektuje zatečeno stanje tumora u momentu operacije pacijenta, pa ne dozvoljava dinamično praćenje markera u više vremenskih intervala.

ZAKLJUČAK

Sudeći po broju publikacija i istraživačkih pravaca pobrojanih u ovom poglavlju, jasno je da postoji jak fokus bazičnih molekularno-bioloških istraživanja na mehanizme progresije PTK u cilju pronalaska savremenijih prognostičkih markera povećane osetljivosti i umanjene invazivnosti uzorkovanja. Ipak, i pored brojnih prednosti koje nude u odnosu na markere u standardnoj primeni, i markeri novije generacije pate od niza nedostataka, zbog čega većina njih još uvek nije ušla u kliničku praksu.

Analiza pacijentovog molekularnog backgrounda kroz detekciju genskih polimorfizama kao prednosti ima neinvazivan način uzorkovanja, relativno nisku cenu analize kao i mogućnost dobijanja epidemiološke informacije o učestalosti markera u populaciji. Sa druge strane uticaj genskih polimorfizama kao predispozicije za loš tok bolesti se ne može gledati izolovano od molekularno-histološkog konteksta pojedinca čime mu se smanjuje osetljivost i otežava personalizacija tretmana.

Preoperativne markere takođe karakteriše neinvazivnost uzorkovanja i mogućnost blagovremenog planiranja opsega operativnog zahvata i postoperativnog terapijskog toka. Međutim, ovi kandidati iziskuju najnovije dostupne tehnologije, a time i veća finansijska ulaganja čineći ih nedovoljno istraženima i bez trenutne perspektive za upotrebu u kliničkoj praksi.

Intraoperativni markeri daju blagovremenu i najvaldniju informaciju o trenutnom stanju pacijenta i neophodnoj veličini hirurškog zahvata. Ipak, ove analize bi morale da daju rezultat u kratkom vremenskom roku ne bi li hirurgu pružile adekvatne informacije.

Postoperativni molekularni markeri su od svih navedenih najviše ispitivani, a često se već primenjuju kao dodatni marker uz već postojeće. Mogućnost personalizovane postoperativne terapije, informacija o progresiji bolesti, temeljna istraženost i ustaljeni protokoli analize čine ih trenutno najadekvatnijim markerima za kliničku upotrebu. Nedostatak ovih markera je što detektuju zatečeno stanje tumora pa ne dozvoljavaju dinamično praćenje markera u više vremenskih intervala.

LITERATURA

1. Cibas ES, Ali SZ, Conference NCITFSotS. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132(5):658-65.
2. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17(6):1471-4.
3. Beysel S, Eyerci N, Pinarli FA, Apaydin M, Kizilgul M, Caliskan M, et al. VDR gene FokI polymorphism as a poor prognostic factor for papillary thyroid cancer. *Tumour Biol* 2018;40(11):1010428318811766.

4. Oh IH, Oh C, Yoon TY, Choi JM, Kim SK, Park HJ, et al. Association of CFTR gene polymorphisms with papillary thyroid cancer. *Oncol Lett* 2012;3(2):455-61.
5. Wang Y, Wei T, Xiong J, Chen P, Wang X, Zhang L, et al. Association Between Genetic Polymorphisms in the Promoter Regions of Let-7 and Risk of Papillary Thyroid Carcinoma: A Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(43):e1879.
6. Roncevic J, Djoric I, Selemetjev S, Jankovic J, Dencic TI, Bozic V, et al. MMP-9-1562 C/T single nucleotide polymorphism associates with increased MMP-9 level and activity during papillary thyroid carcinoma progression. *Pathology* 2019;51(1):55-61.
7. Zane M, Agostini M, Enzo MV, Casal Ide E, Del Bianco P, Torresan F, et al. Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAF(V600E): A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer. *Biomed Pharmacother* 2013;67(8):723-30.
8. Allin DM, Shaikh R, Carter P, Thway K, Sharabiani MTA, Gonzales-de-Castro D, et al. Circulating tumour DNA is a potential biomarker for disease progression and response to targeted therapy in advanced thyroid cancer. *Eur J Cancer* 2018;103:165-75.
9. Fussey JM, Bryant JL, Batis N, Spruce RJ, Hartley A, Good JS, et al. The Clinical Utility of Cell-Free DNA Measurement in Differentiated Thyroid Cancer: A Systematic Review. *Front Oncol* 2018;8:132.
10. Khatami F, Tavangar SM. Liquid Biopsy in Thyroid Cancer: New Insight. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2018;12(3):235-48.
11. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11(6):426-37.
12. Liu R, Hao S, Zhang H, Ma J, Liu X, Xu J, et al. Correlation of thyroid stimulating hormone receptor mRNA expression levels in peripheral blood with undesirable clinicopathological features in papillary thyroid carcinoma patients. *Oncotarget* 2017;8(43):74129-38.
13. Aliyev A, Gupta M, Nasr C, Hatipoglu B, Milas M, Siperstein A, et al. Circulating Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Messenger Rna as a Marker of Tumor Aggressiveness in Patients with Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Endocr Pract* 2015;21(7):777-81.
14. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):259-69.
15. Yu S, Liu Y, Wang J, Guo Z, Zhang Q, Yu F, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(6):2084-92.
16. Zhang Y, Xu D, Pan J, Yang Z, Chen M, Han J, et al. Dynamic monitoring of circulating microRNAs as a predictive biomarker for the diagnosis and recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Lett* 2017;13(6):4252-66.
17. Zhang Y, Pan J, Xu D, Yang Z, Sun J, Sun L, et al. Combination of serum microRNAs and ultrasound profile as predictive biomarkers of diagnosis and prognosis for papillary thyroid microcarcinoma. *Oncol Rep* 2018;40(6):3611-24.
18. Cantara S, Pilli T, Sebastiani G, Cevenini G, Busonero G, Cardinale S, et al. Circulating miRNA95 and miRNA190 are sensitive markers for the differential diagnosis of thyroid nodules in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(11):4190-8.
19. Yu S, Liu X, Zhang Y, Li J, Chen S, Zheng H, et al. Circulating microRNA124-3p, microRNA9-3p and microRNA196b-5p may be potential signatures for differential diagnosis of thyroid nodules. *Oncotarget* 2016;7(51):84165-77.
20. Qiu ZL, Shen CT, Sun ZK, Wei WJ, Zhang XY, Song HJ, et al. Circulating Long Non-Coding RNAs Act as Biomarkers for Predicting 131I Uptake and Mortality in Papillary Thyroid Cancer Patients with Lung Metastases. *Cell Physiol Biochem* 2016;40(6):1377-90.
21. Zhang D, Liu X, Wei B, Qiao G, Jiang T, Chen Z. Plasma lncRNA GAS8-AS1 as a Potential Biomarker of Papillary Thyroid Carcinoma in Chinese Patients. *Int J Endocrinol* 2017;2017:2645904.
22. Sorg S, Pachmann K, Brede-Hekimian K, Freesmeyer M, Winkens T. Determining tissue origin of circulating epithelial cells (CEC) in patients with differentiated thyroid cancer by real-time PCR using thyroid mRNA probes. *Cancer Lett* 2015;356(2 Pt B):491-5.
23. Jiang K, Li G, Chen W, Song L, Wei T, Li Z, et al. Plasma Exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are Potential Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinomas. *Onco Targets Ther* 2020;13:1311-9.
24. Ghafouri-Fard S, Shirvani-Farsani Z, Taheri M. The role of microRNAs in the pathogenesis of thyroid cancer. *Noncoding RNA Res* 2020;5(3):88-98.
25. van Keulen S, Nishio N, Fakurnejad S, van den Berg NS, Lu G, Birkeland A, et al. Intraoperative Tumor Assessment Using Real-Time Molecular Imaging in Head and Neck Cancer Patients. *J Am Coll Surg* 2019;229(6):560-7 e1.
26. Najah H, Tresallet C. Role of frozen section in the surgical management of indeterminate thyroid nodules. *Gland Surg* 2019;8(Suppl 2):S112-S7.
27. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014;159(3):676-90.
28. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.
29. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. 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):5399-404.
30. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(1):42-50.
31. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA* 2013;309(14):1493-501.
32. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, et al. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63(5):588-93.
33. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, et al. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63(4):461-6.
34. Jankovic J, Tatic S, Bozic V, Zivaljevic V, Cvejic D, Paskas S. Inverse expression of caveolin-1 and EGFR in thyroid cancer patients. *Hum Pathol* 2017;61:164-72.
35. Paunović IŠ, S.; Išić Denčić, T.; Đorić, I.; Janković Miljuš, J.; Rončević, J.; Cvejčić, D. Coexistence of BRAFV600E mutation and EGFR overexpression is highly associated with adverse clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma. *Archives of Biological Sciences* 2020;72(1):37-44.
36. Xing M. Genetic-guided Risk Assessment and Management of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019;48(1):109-24.
37. Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 2004;564(1-2):9-13.
38. Low KC, Tergaonkar V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends Biochem Sci* 2013;38(9):426-34.
39. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 2013;20(4):603-10.
40. Borah S, Xi L, Zaugg AJ, Powell NM, Dancik GM, Cohen SB, et al. Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science* 2015;347(6225):1006-10.
41. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* 2015;348(6238):1036-9.

42. Alzahrani AS, Alsaadi R, Murugan AK, Sadiq BB. TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer. *Horm Cancer* 2016;7(3):165-77.
43. Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, et al. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(5):672-82.
44. Bu R, Siraj AK, Divya SP, Kong Y, Parvathareddy SK, Al-Rasheed M, et al. Telomerase reverse transcriptase mutations are independent predictor of disease-free survival in Middle Eastern papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 2018;142(10):2028-39.
45. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(6):E1130-6.
46. Liu R, Zhang T, Zhu G, Xing M. Regulation of mutant TERT by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/GABP in human cancer. *Nat Commun* 2018;9(1):579.
47. Romei C, Ciampi R, Elisei R. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12(4):192-202.
48. Thomas T. Individualized testing and outcome measurements are needed for successful hormone replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3852-3.
49. Jhiang SM, Mazzaferri EL. The ret/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma. *J Lab Clin Med* 1994;123(3):331-7.
50. Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, et al. BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(2):511-20.
51. Yip L, Nikiforova MN, Yoo JY, McCoy KL, Stang MT, Armstrong MJ, et al. Tumor genotype determines phenotype and disease-related outcomes in thyroid cancer: a study of 1510 patients. *Ann Surg* 2015;262(3):519-25; discussion 24-5.
52. Janković J. Analysis of protein and genetic markers in preoperative and postoperative differential diagnosis of thyroid gland tumors. Belgrade: University of Belgrade; 2017
53. Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H, Yamamoto Y, Udagawa K, Kunisue H, et al. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *Eur J Endocrinol* 2000;142(4):340-6.
54. Tanaka A, Matsuse M, Saenko V, Nakao T, Yamanouchi K, Sakimura C, et al. TERT mRNA Expression as a Novel Prognostic Marker in Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid* 2019;29(8):1105-14.
55. Riesco-Eizaguirre G, Wert-Lamas L, Perales-Paton J, Sastre-Perona A, Fernandez LP, Santisteban P. The miR-146b-3p/PAX8/NIS Regulatory Circuit Modulates the Differentiation Phenotype and Function of Thyroid Cells during Carcinogenesis. *Cancer Res* 2015;75(19):4119-30.
56. Celano M, Rosignolo F, Maggisano V, Pecce V, Iannone M, Russo D, et al. MicroRNAs as Biomarkers in Thyroid Carcinoma. *Int J Genomics* 2017;2017:6496570.
57. Aragon Han P, Weng CH, Khawaja HT, Nagarajan N, Schneider EB, Umbricht CB, et al. MicroRNA Expression and Association with Clinicopathologic Features in Papillary Thyroid Cancer: A Systematic Review. *Thyroid* 2015;25(12):1322-9.
58. Silaghi CA, Lozovanu V, Silaghi H, Georgescu RD, Pop C, Dobrea A, et al. The Prognostic Value of MicroRNAs in Thyroid Cancers-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* 2020;12(9).
59. Sedaghati M, Kebebew E. Long noncoding RNAs in thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2019;26(5):275-81.
60. Stojanovic S, Selemetjev S, Doric I, Roncevic J, Jankovic Miljus J, Zivaljevic V, et al. Elevated BANCER expression levels have different effects on papillary thyroid carcinoma progression depending on the presence of the BRAFV600E mutation. *Eur J Surg Oncol* 2020;46(10 Pt A):1835-42.
61. Hermann S, Sturm I, Mrozek A, Klosterhalfen B, Hauptmann S, Dorken B, et al. 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):805-11.
62. Cvejic D, Selemetjev S, Savin S, Paunovic I, Tatic S. Changes in the balance between proliferation and apoptosis during the progression of malignancy in thyroid tumours. *Eur J Histochem* 2009;53(2):65-71.
63. Šelemetjev S. Analysis of expression of regulatory molecules of apoptosis (Bcl-2, Bax, p53) and proliferation marker (PCNA) in papillary and anaplastic thyroid carcinoma. Belgrade: University of Belgrade; 2008
64. Selemetjev S, Savin S, Paunovic I, Tatic S, Cvejic D. Concomitant high expression of survivin and vascular endothelial growth factor-C is strongly associated with metastatic status of lymph nodes in papillary thyroid carcinoma. *J Cancer Res Ther* 2018;14(Supplement):S114-S9.
65. Selemetjev S. Survivin and VEGF-C in papillary and anaplastic thyroid carcinoma: expression profiles, biological role and their clinicopathological significance. Belgrade: University of Belgrade; 2014
66. Saffar H, Sanii S, Emami B, Heshmat R, Panah VH, Azimi S, et al. Evaluation of MMP2 and Caspase-3 expression in 107 cases of papillary thyroid carcinoma and its association with prognostic factors. *Pathol Res Pract* 2013;209(3):195-9.
67. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis* 2017;22(3):357-68.
68. Tang J, Gui C, Qiu S, Wang M. The clinicopathological significance of Ki67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator? *World J Surg Oncol* 2018;16(1):100.
69. Pan DH, Wen DY, Luo YH, Chen G, Yang H, Chen JQ, et al. The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6,051 cases. *Onco Targets Ther* 2017;10:3261-76.
70. 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):63-7.
71. Pesutic-Pisac V, Punda A, Gluncic I, Bedekovic V, Pranic-Kragic A, Kunac N. Cyclin D1 and p27 expression as prognostic factor in papillary carcinoma of thyroid: association with clinicopathological parameters. *Croat Med J* 2008;49(5):643-9.
72. Sanjari M, Kordestani Z, Safavi M, Mashroufeh M, FekriSoofiAbadi M, Ghaseminejad Tafreshi A. Enhanced expression of Cyclin D1 and C-myc, a prognostic factor and possible mechanism for recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Sci Rep* 2020;10(1):5100.
73. 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.
74. Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, Nomura T, Ohkubo S, Yamamoto Y, et al. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):1125-31.
75. Lee AS, Lee JE, Jung YJ, Kim DH, Kang KP, Lee S, et al. Vascular endothelial growth factor-C and -D are involved in lymphangiogenesis in mouse unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2013;83(1):50-62.
76. Selemetjev S, Ethoric I, Paunovic I, Tatic S, Cvejic D. Coexpressed High Levels of VEGF-C and Active MMP-9 Are Associated With Lymphatic Spreading and Local Invasiveness of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2016;146(5):594-602.
77. Marečko I. Expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 as potential prognostic markers of human thyroid gland tumors.

Belgrade: University of Belgrade; 2014

78. Marecko I, Cvejic D, Selemetjev S, Paskas S, Tatic S, Paunovic I, et al. Enhanced activation of matrix metalloproteinase-9 correlates with the degree of papillary thyroid carcinoma infiltration. *Croat Med J* 2014;55(2):128-37.
79. Išić T. Thyroid peroxidase, galectin-3, HBME-1 and cytokeratin-19 as malignancy and tumor differentiation markers in human thyroid gland. Belgrade: University of Belgrade; 2010
80. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 2002;54(3):431-67.
81. Staubach S, Hanisch FG. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev Proteomics* 2011;8(2):263-77.
82. Kim D, Kim H, Koo JS. Expression of caveolin-1, caveolin-2 and caveolin-3 in thyroid cancer and stroma. *Pathobiology* 2012;79(1):1-10.
83. Jankovic J, Paskas S, Marecko I, Bozic V, Cvejic D, Savin S. Caveolin-1 expression in thyroid neoplasia spectrum: comparison of two commercial antibodies. *Dis Markers* 2012;33(6):321-31.
84. Paskas S, Jankovic J, Marecko I, Isic Dencic T, Tatic S, Cvejic D, et al. Caveolin-1 expression in papillary thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological parameters and BRAF mutation status. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;150(2):201-9.
85. Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(2):267-76.
86. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995;147(3):815-22.
87. Selemetjev SA, Savin SB, Paunovic IR, Tatic SB, Cvejic D. Changes in the expression pattern of apoptotic molecules (galectin-3, Bcl-2, Bax, survivin) during progression of thyroid malignancy and their clinical significance. *Wien Klin Wochenschr* 2015;127(9-10):337-44.
88. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S3-8.
89. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61(2):203-12.
90. Nedergaard MK, Hedegaard CJ, Poulsen HS. Targeting the epidermal growth factor receptor in solid tumor malignancies. *BioDrugs* 2012;26(2):83-99.
91. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71(3-4):435-78.
92. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):598-610.
93. Owens LV, Xu L, Dent GA, Yang X, Sturge GC, Craven RJ, et al. Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human thyroid cancer. *Ann Surg Oncol* 1996;3(1):100-5.
94. Selemetjev S, Bartolome A, Isic Dencic T, Doric I, Paunovic I, Tatic S, et al. Overexpression of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, focal adhesion kinase, correlates with papillary thyroid carcinoma progression. *Int J Exp Pathol* 2018;99(2):87-94.