

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena V. Rončević

**Polimorfizmi u promotoru gena za matriksnu
metaloproteinazu 9 i status acetilacije c-Jun
kao potencijalni prognostički markeri
papilarnog tiroidnog karcinoma kod čoveka**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena V. Rončević

**Polymorphisms in the promoter of the gene
for matrix metalloproteinase 9 and the
acetylation status of c-Jun as potential
prognostic markers for papillary thyroid
carcinoma in humans**

doctoral dissertation

Belgrade, 2024

Mentori:

dr Iona Đorić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije, INEP

dr Mirela Ukropina, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Sonja Šelemetjev, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije, INEP

dr Svetislav Tatić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr Maja Čakić Milošević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za endokrinologiju i radioimunologiju Instituta za primenu nuklearne energije – INEP, Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Iloni Đorić, višem naučnom saradniku INEP-a, na nesebično prenesenom znanju, kako teorijskom tako i praktičnom. Najiskrenije joj se zahvaljujem na strpljenju i razumevanju, pruženoj pomoći, kako prilikom izbora teme, tako i prilikom planiranja i realizacije svih faza izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Mireli Ukropini, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na neiscrpoj podršci i beskonačnim konsultacijama tokom pisanja ove doktorske disertacije, a pre svega na strpljenju.

Posebno se zahvaljujem dr Svetislavu Tatiću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na divnoj saradnji, stručnoj pomoći i sugestijama pri izradi ove disertacije.

Dr Sonji Šelemetjev, višem naučnom saradniku INEP-a i rukovodiocu grupe Štitasta žlezda dugujem beskrajnu zahvalnost na svakoj pomoći, sugestiji, a pre svega na podstreku i entuzijazmu u radu. Bez njenog pozitivnog stava, ovo bi bilo mnogo teže ostvariti.

Zahvaljujem se dr Maji Čakić Milošević, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na usmeravanju u toku doktorskih studija i vrednim sugestijama tokom pripreme i izrade ove doktorske disertacije.

Dr Dubravki Cvejić, naučnom savetniku INEP-a u penziji se zahvaljujem na pruženoj prilici da radim u okviru grupe čiji je rukovodilac bila, kao i na mnogim trenucima podrške i usmeravanja tokom početnih koraka izrade ove doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i mojim koleginicama iz grupe Jeleni, Tijani, Valentini i Stefani, na divnoj saradnji, izazovnim naučnim debatama i podršci koja nikada nije izostala. Neizmerno hvala na privilegiji prijateljskog odnosa. Srdačno se zahvaljujem i svim naučnim, stručnim i tehničkim saradnicima instituta na podršci i korisnim savetima.

Veliko hvala mojim roditeljima i braći na bezuslovnoj ljubavi i podršci tokom života što mi je dalo snagu i istrajnost da dođem do ovog momenta. Takođe, zahvaljujem svim prijateljima koji su me bodrili kad je bilo teško i slavili trenutke pobede sa mnom.

Na kraju, beskrajnu zahvalnost dugujem Vladimiru, koji je tokom ovog izazovnog putovanja u svakom trenutku bio uz mene, da sasluša, ohrabri i pruži podršku. Bez tebe i tvoje ljubavi, nisam sigurna da bi ovo bilo uspešno.

Polimorfizmi u promotoru gena za matriksnu metaloproteinazu 9 i status acetilacije c-Jun kao potencijalni prognostički markeri papilarnog tiroidnog karcinoma kod čoveka

Sažetak

Papilarni tiroidni karcinom (PTK) je najčešći karcinom štitaste žlezde, čija je incidenca u stalnom porastu. Iako je uglavnom indolentan tumor, sa visokom stopom preživljavanja i niskom rekurencom, određen broj pacijenata razvije agresivnu formu koja može dovesti do smrtnog ishoda. Trenutno raspoloživi prognostički markeri u tiroidnoj patologiji su podložni subjektivnoj proceni, zahtevaju invazivno uzorkovanje i nedovoljno su precizni za stratifikaciju, te se teži pronalasku novih, poboljšanih performansi.

Matriksna metaloproteinaza 9 (MMP9) je protein koji ima ulogu u svim fazama progresije tumora. Metodama qPCR, imunohistohemija i *in situ* zimografija, ispitivana je ekspresija i aktivnost MMP9 i njen potencijal u predikciji agresivnog ponašanja PTK na uzorcima malignog tkiva štitaste žlezde. Metodama PCR i imunohistohemija, ispitivani su polimorfizmi -1562 C/T i -131 (CA)n u promotoru gena za MMP9, i ekspresija transkripcionog faktora c-Jun i njegove forme acetilovane na Lys271 u korelaciji sa ekspresijom MMP9 i nepovoljnim tokom bolesti.

Rezultati pokazuju da su većina uzoraka heterozigoti za CA ponovke. Prisustvo T alela je u vezi sa enzimskom aktivnošću koja prati nivo proteina MMP9. Ekspresija acetilovanog c-Jun povezana je sa ekspresijom MMP9. Značajno je viša ekspresija *MMP9* na iRNK nivou u tumorskom nego u susednom zdravom tkivu, dok nivo proteina značajno prati nivo iRNK *MMP9* u tumorskom tkivu. Prisustvo T alela i povišena ekspresija ukupne i aktivne MMP9 i acetilovanog c-Jun je u vezi sa kliničkopatološkim parametrima povezanim sa agresivnom formom tumora.

Ukupni rezultati ukazuju da bi utvrđivanje prisustva T alela na poziciji -1562 i određivanje nivoa proteina MMP9 i acetilovanog c-Jun moglo biti korisno za prognostičku stratifikaciju pacijenata sa PTK.

Ključne reči: papilarni tiroidni karcinom, MMP9, c-Jun, polimorfizmi, prognostički markeri

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelija i tkiva

Polymorphisms in the promoter of the gene for matrix metalloproteinase 9 and the acetylation status of c-Jun as potential prognostic markers for papillary thyroid carcinoma in humans

Abstract

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common thyroid malignancy, with its incidence continually rising. Although it is usually an indolent tumor, with a high survival rate and low recurrence, a certain portion of patients develops a more aggressive form of disease that can lead to fatal outcomes. Currently available prognostic markers in thyroid pathology are prone to subjective assessment, require invasive sampling, and are insufficiently precise for stratification, leading to the pursuit of new markers with improved capabilities.

Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) is a protein involved in all stages of tumor progression. Using qPCR, immunohistochemistry, and *in situ* zymography, the expression and activity of MMP9 were examined, as well as its potential in predicting aggressive behavior of PTC in malignant thyroid tissue samples. Using PCR and immunohistochemistry, the polymorphisms -1562 C/T and -131 (CA)_n in the promoter region of the MMP9 gene were investigated as well as the expression of the transcription factor c-Jun and its acetylated form at Lys271, were examined in correlation with MMP9 expression and disease progression.

The results show that most samples were heterozygous for CA repeats. The presence of the T allele was found to be associated with enzymatic activity that mirrored to the level of MMP9 protein. Expression of acetylated c-Jun was linked to the expression of MMP9. The expression of MMP9 at the mRNA level is significantly higher in tumor tissue compared to adjacent healthy tissue, and protein levels closely follow mRNA levels in the tumor tissue. The presence of the T allele, along with elevated expression of both total and active MMP9 and acetylated c-Jun, were associated with clinicopathological parameters linked to aggressive tumor forms.

Overall, the results suggest that determining the presence of the T allele at position -1562 and assessing the levels of MMP9 protein and acetylated c-Jun could be useful for the prognostic stratification of patients with papillary thyroid carcinoma.

Keywords: papillary thyroid carcinoma, MMP9, c-Jun, polymorphisms, prognostic markers

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Cell and tissue biology

SKRAĆENICE

ABC	Avidin-biotin kompleks sa kuplovanom peroksidazom
ac c-Jun	acetilovani c-Jun
AJCC	Američki združeni komitet za rak
AP-1	aktivacioni protein 1
bp	bazni par
C	citozin
CA	citozin-adenin ponovak
CRE	element koji odgovara na ciklični adenozin monofosfat
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DEPC	dietil-pirokarbonat
DI	dubina infiltracije tumora
DIT	dijodtirozin
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	dezoksinukleotid-tri-fosfat
DQ želatin	želatin konjugovan sa fluoresceinom
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EI	ekstratiroidna invazija
ETS	engl. E26 transformation-specific protein ^l
FNAB	aspiraciona biopsija tankom iglom
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat hidrogenaza
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
LMN	metastaze na limfnim čvorovima
Lys	lizin
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenom
MCF-7	ćelijska linija kancera dojke
MIT	monojodtirozin
MMP	matriksna metaloproteinaza
MR	magnetna rezonanca
NF- κ B	nuklearni faktor kappa B
PBS	fosfatom puferisan fiziološki rastvor
PCR	metoda lančane reakcije polimeraze
PTK	papilarni tiroidni karcinom
qPCR	kvantitativna PCR
RFLP	analiza polimorfizma restrikcionih fragmenata
RT	reverzna transkripcija
sar.	saradnici
Ser	serin
SNP	polimorfizam pojedinačnog nukleotida
Sp-1	specifični protein 1*
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
T	timin
T3	trijodtironin
T4	tiroksin
Tg	tiroglobulin
THP-1	ćelijska linija humane monocitne leukemije
Thr	treonin
TIMP	tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza
TNF- α	faktor nekroze tumora alfa
TNM	klasifikacija malignih tumora prema rasprostranjenosti (T), prisustvu metastaza na limfnim čvorovima (N) i udaljenih metastaza (M)

TPO	tiroidna peroksidaza
TRE	element koji dogovara na 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat
TSH	tirostimulišući hormon hipofize, tirotropin
UKCS	Univerzitetski klinički centar Srbije
VCM	vanćelijski matriks
WISH	ćelijska linija izvedena iz HeLa ćelija

Sadržaj

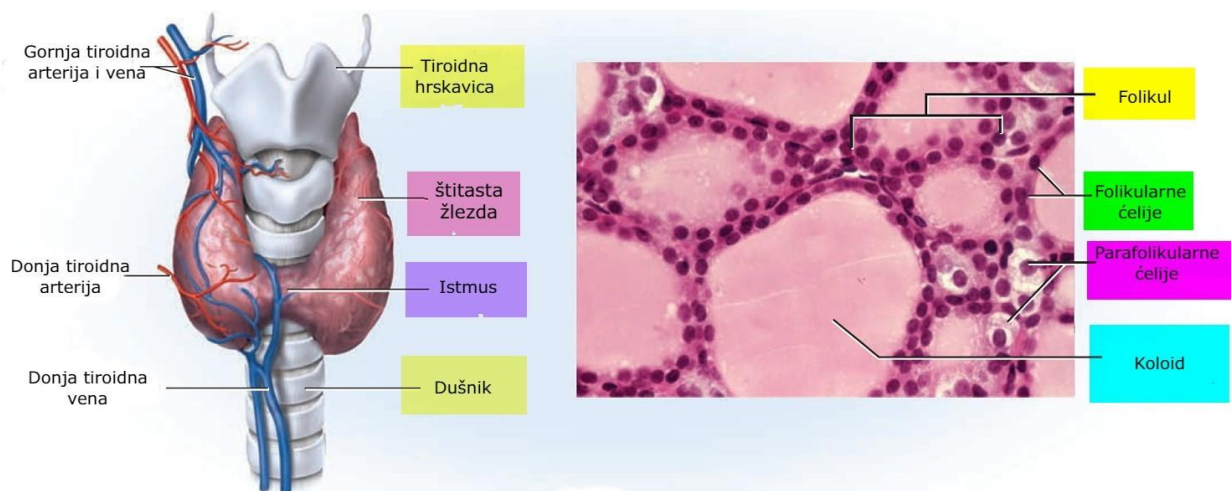
1	UVOD	1
1.1	Štitasta žlezda – anatomske, histološke i funkcionalne odlike.....	2
1.2	Tumori štitaste žlezde	4
1.2.1	Papilarni tiroidni karcinom.....	6
1.3	Prognostički kliničkopatološki faktori.....	9
1.4	Biomarkeri u istraživanjima kancera	10
1.5	Vanćelijski matriks	10
1.6	Matriksne metaloproteinaze	11
1.6.1	Matriksna metaloproteinaza 9	12
1.6.1.1	Regulacija aktivnosti MMP9	12
1.6.1.1.1	Regulacija transkripcije.....	13
1.6.1.2	MMP9 u kanceru.....	14
1.6.1.3	Odabrani regulatori transkripcije MMP9 u kanceru	16
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3	MATERIJAL I METODE.....	20
3.1	Prikupljanje i obrada uzoraka	21
3.2	Izolacija DNK.....	22
3.3	Izolacija RNK.....	22
3.4	PCR.....	22
3.5	RFLP	23
3.6	Analiza polimorfizma broja tandemskih ponovaka	23
3.7	Reverzna transkripcija i kvantitativna PCR	23
3.7.1	Reverzna transkripcija (RT)	23
3.7.2	Kvantitativna PCR (qPCR)	24
3.8	Imunohistohemija	24
3.9	Zimografija <i>in situ</i>	25
3.10	Statistička obrada podataka	26
4	REZULTATI	27
4.1	Ispitivanje odabranih faktora koji su mogući uzročnici deregulacije ekspresije MMP9	28
4.1.1	Prisustvo tranzicije C/T na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9	28
4.1.2	Prisustvo varijacija u broju CA ponovaka koji počinju na poziciji -131 promotora gena za MMP9.....	28
4.1.3	Analiza nivoa ekspresije transkripcionog faktora c-Jun i njegove forme modifikovane acetilacijom na Lys271	29
4.2	Analiza nivoa ekspresije MMP9.....	31

4.2.1	Ekspresija MMP9 na nivou iRNK i proteina u tumorskom i uslovno zdravom tkivu štitaste žlezde.....	31
4.2.2	Ekspresija proteina MMP9 u malignom tiroidnom tkivu	31
4.3	Utvrđivanje nivoa enzimske aktivnosti MMP9 u tumorskom tkivu pacijenata sa PTK.....	33
4.4	Ispitivanje uticaja odabranih faktora na ekspresiju MMP9.....	33
4.4.1	Povezanost polimorfizma -1562 C/T sa ekspresijom MMP9 na nivou iRNK i proteina	33
4.4.2	Povezanost nivoa c-Jun i njegove forme acetilovane na Lys271 sa ekspresijom MMP9 na nivou iRNK i proteina	35
4.5	Analiza veze <i>MMP9</i> genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 i želatinolitičke aktivnosti MMP9	36
4.6	Analiza korelacije odabranih faktora sa kliničkopatološkim parametrima	37
5	DISKUSIJA	41
6	ZAKLJUČCI	51
7	LITERATURA	54

1 UVOD

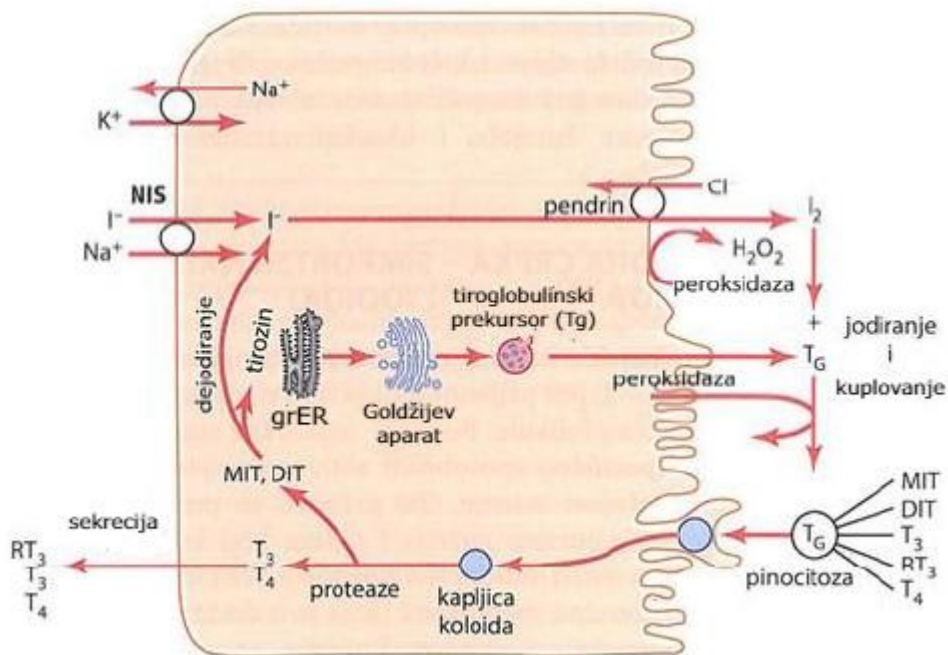
1.1 Štitasta žlezda – anatomske, histološke i funkcionalne odlike

Štitasta žlezda (štitna žlezda, tiroidna žlezda, tiroidea, lat. *glandula thyroidea*) je najveći endokrini organ u telu. Kod odraslih, zdravih osoba, masa ove žlezde iznosi u proseku 15 do 30 grama. Na **Slici 1.1.** dat je prikaz anatomske pozicije i histološke građe štitaste žlezde. Ova žlezda se nalazi u prednjem delu vrata, ispred i oko dušnika i ima oblik štita. Sastoji se od dva lobusa povezana tkivnim mostom, istmusom. Dimenzije svakog lobusa su prosečno 4 cm x 2 cm x 4 cm. Sa spoljašnje strane, prema okolnim strukturama vrata, štitastu žlezdu okružuje vezivno-tkivna kapsula koja zalazi u unutrašnjost organa deleći ga na lobuluse. Svaki od lobulusa je snabdeven jednom arterijom i sadrži u proseku 20-40 folikula koji predstavljaju osnovnu strukturnu jedinicu štitaste žlezde (Stathatos, 2019). Folikul je struktura ovoidnog oblika koja se u fiziološkim uslovima sastoji od jednog reda epitelnih folikularnih ćelija, tirocita, koje okružuju koloid. Tirocite leže na podepitelskoj lamini folikula dok je njihova apikalna površina u kontaktu sa koloidom u kome se nalazi tiroglobulin (Tg), veliki jodirani glikoprotein koji je prekursor tiroidnih hormona, kao i neaktivna uskladištena forma samih hormona (T3 i T4). Izgled folikula je u sprezi sa stepenom aktivnosti žlezde. Ukoliko je žlezda aktivnija, folikuli su manjeg promera i tirocite su izdužene sa bazalno postavljenim jedrima, dok su kod smanjene aktivnosti žlezde folikuli veći, sa više koloida a tirocite spljoštene sa vrlo malo citoplazme (Havelka i Tatić, 2003). Parafolikularne ćelije (C-ćelije) su ćelije ektodermalnog porekla koje proizvode kalcitonin i regulišu metabolizam kalcijuma u organizmu i mogu se naći u zidu folikula i u intersticijumu, između folikula kao što se vidi na **Slici 1.1. desno** (Das i sar., 2017).



Slika 1.1. Prikaz anatomske pozicije i histološke građe štitaste žlezde. Preuzeto i modifikovano sa: <https://healthjade.com/thyroid-gland/>

Tirocite su poreklom od endoderma prednjeg ždrela. Ove ćelije su morfološki i funkcionalno polarizovane, tj. apikalni i bazalni pol ćelije imaju svoju specifičnu građu i funkciju koja se odnosi na sintezu tiroidnih hormona i njihovo oslobađanje. Sastavni deo ćelijske membrane u bazalnom regionu tirocita su receptori za tirotropin (tireostimulišući hormon hipofize, TSH), faktore rasta i druge biomolekule važne za funkciju štitaste žlezde te se ovde, pored primanja stimulusa, odvija i preuzimanje joda i izlučivanje tiroidnih hormona. Na apikalnom delu tirocita nalazi se mnoštvo mikrovila različitih dužina koji se pružaju ka koloidu i neki zalaze duboko u lumen (pregledno prikazano u Bidey i Tomlinson, 1988). Na ćelijskoj membrani apikalnog regiona se dešava glavni čin sinteze tiroidnih hormona (**Slika 1.2.**).

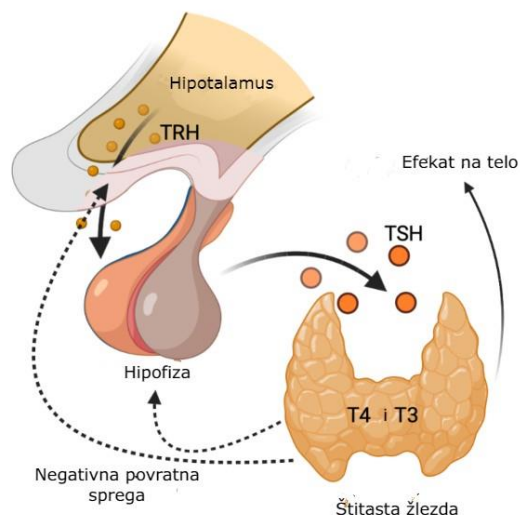


Slika 1.2. Šematski prikaz sinteze tiroidnih hormona. Preuzeto i modifikovano iz: Hall, 2015.

Kao što je već rečeno, sinteza hormona se dešava u različitim delovima tirociti i odvija u nekoliko faza. Proces započinje na membrani bazalne strane ćelije preuzimanjem jodida aktivnim transportom radom natrijum/jodid simportera. Nakon ulaska u ćeliju, jodid se prenosi kroz citoplazmu i ispušta kroz apikalnu membranu u lumen folikula. Tg, koji se sintetisao u tirocitama se takođe izlučuje u koloid. Na spoljašnjoj strani apikalne membrane tirociti, u lumenu folikula, dolazi do oksidacije jodida u jod koja je katalizovana tiroidnom peroksidazom (TPO). Jod se zatim inkorporira u tirozinske ostatke Tg čime nastaju monojodtirozin (MIT) i dijodtirozin (DIT). Zatim, delovanjem TPO, dolazi do kuplovanja dva jodirana tirozinska ostatka koji su blisko pozicionirani čime nastaju trijodtironin (T3) i tetrajodtironin (tiroksin, T4) i takav Tg ostaje u lumenu folikula gde služi kao depo ovih hormona. Nakon stimulacije folikularne ćelije od strane TSH, dolazi do vraćanja Tg u tirocitu procesom endocitoze, njegove proteolize čime se oslobađaju T3 i T4 koji se zatim sa druge strane, kroz membranu na bazalnom polu ćelije, otpuštaju u cirkulaciju. Tokom proteolize Tg oslobađaju se i MIT i DIT koji se zatim dejodiraju, a oslobođeni jod se ponovo može koristiti za sintezu novih hormona (Barret i sar., 2010).

Receptori za hormone štitaste žlezde se nalaze u skoro svim ćelijama u organizmu. Tiroidni hormoni, vezujući se za intracelularne receptore, aktiviraju sintezu proteina koji pojačavaju bazalni metabolizam ćelije i važni su za normalan rast i razvoj organizma (Gayton i Hall, 2006).

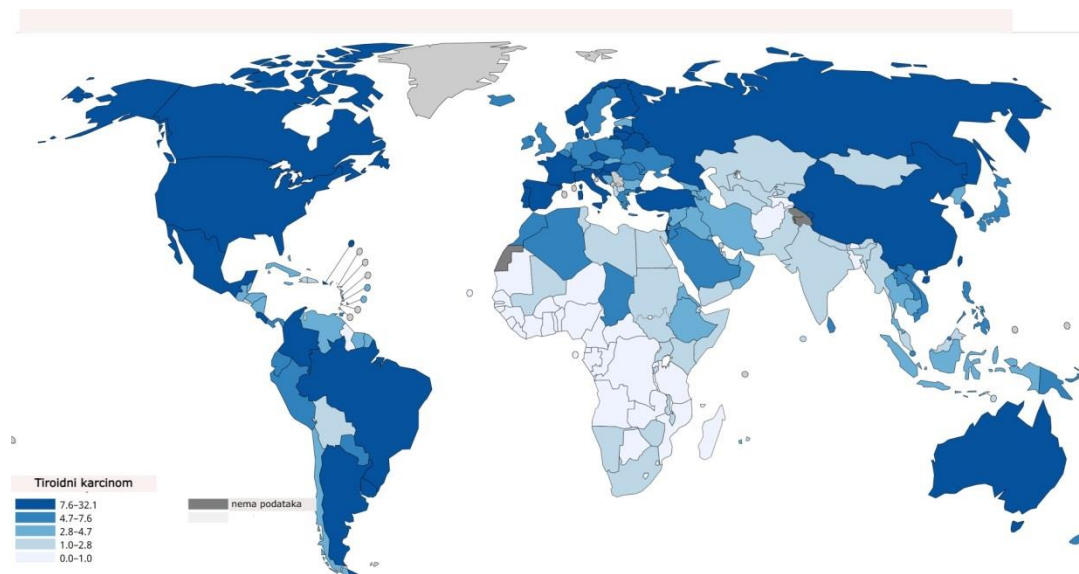
Funkcija štitaste žlezde je pod kontrolom povratne sprege u kojoj učestvuju hormoni hipotalamusa, hipofize i štitaste žlezde (**Slika 1.3.**). Hipotalamus sintetisuje i otpušta tirotropin-oslobađajući hormon (TRH) koji se vezuje za receptore tiotropnih ćelija prednjeg režnja hipofize koja zatim sekretuje TSH. Vezivanjem TSH za ćelijsku membranu u bazalnom regionu tirociti dolazi do stimulacije ovih ćelija. Povišen nivo tiroidnih hormona negativno utiče na otpuštanje hormona hipotalamusa i hipofize (Vander i sar., 2001).



Slika 1.3. Šematski prikaz kontrole sekrecije tiroidnih hormona. Preuzeto i modificirano iz: Naveed i sar., 2023.

1.2 Tumori štitaste žlezde

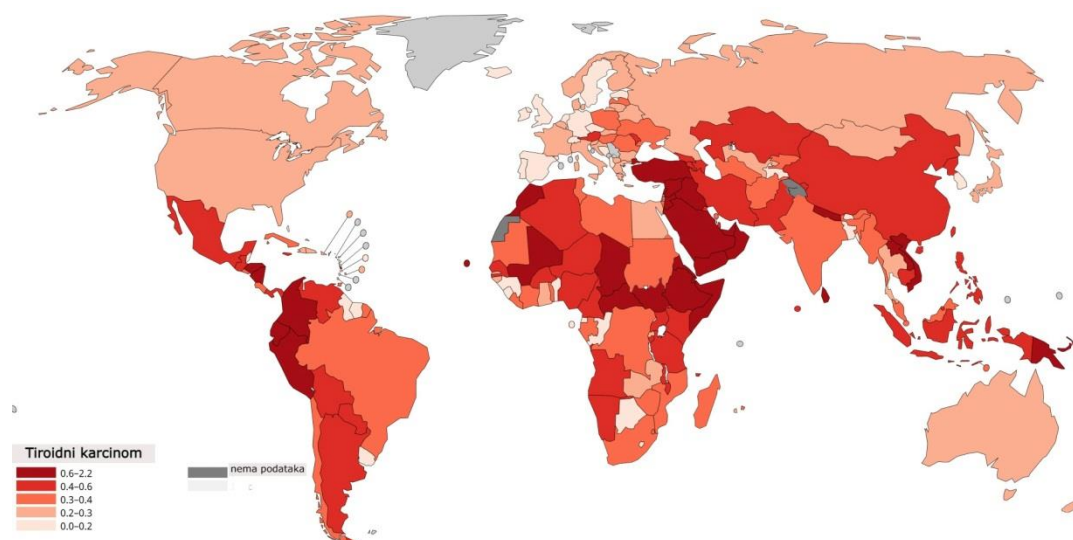
Primarni tumori štitaste žlezde su najčešći endokrini tumori i predstavljaju oko 3% svih karcinoma u svetu. Prema GLOBOCAN (Ferlay i sar., 2024), u 2022. godini, tiroidni karcinom je svrstan na sedmo mesto po zastupljenosti u svetu sa registrovanih 821 214 slučajeva i njegova incidenca je u stalnom porastu u poslednje tri decenije u skoro svim delovima sveta (**Slika 1.4.**).



Slika 1.4. Incidenca tiroidnog karcinoma u 2022. godini standardizovana prema godinama života pacijenata (broj novih slučajeva na 100 000). Preuzeto i modificirano sa: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=32>

Učestalost tiroidnih tumora je tri puta veća kod žena nego kod muškaraca, sa tendencijom porasta kod starijih osoba, a maksimalna incidenca se dostiže posle četvrte decenije života. Poređenja radi, globalno, incidenca za žene standardizovana prema godinama života pacijenata je 2012. godine iznosila 6,1 slučaj na 100 000 osoba, dok je 2022. procenjeno da iznosi 13,6 slučajeva na 100 000 žena. Isti je slučaj i sa muškarcima, gde je, globalno, incidenca standardizovana prema godinama života pacijenata, 2012. godine iznosila 1,9 dok se 2022. godine ovaj broj popeo na 4,6 slučajeva na 100 000 muškaraca (Ferlay i sar., 2013; Bray i sar., 2024). Ovaj trend prati i Srbija gde

incidenca za žene standardizovana prema godinama života pacijenata iznosi 5,2 dok je za muškarce to 1,7 slučajeva na 100 000 (Ferlay i sar., 2024). Najveći porast incidence za oba pola je prijavljen u istočnoj Aziji, gde je stopa obolelih od karcinoma štitaste žlezde dva puta veća nego u Severnoj Americi koja je na drugom mestu. Ipak, mortalitet ne prati incidencu, štaviše u nekim delovima sveta čak i opada. Prema GLOBOCAN podacima, procenjeno je da je 2022. godine, od posledica karcinoma štitaste žlezde preminulo 30 266 žena i 17 241 muškarac što je slično 2012. godini kada je do smrtnog ishoda došlo kod 40 000 ljudi širom sveta (Ferlay i sar., 2024) (**Slika 1.5.**).



Slika 1.5. Mortalitet tiroidnog karcinoma u 2022. godini standardizovan prema godinama života pacijenata (broj smrtnih ishoda bolesti na 100 000). Preuzeto i modifikovano sa: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=32&types=1>

Naime, primećeno je da je kod oba pola, incidenca tiroidnog karcinoma čak pet puta veća u zemljama koje su socio-ekonomski razvijenije dok je stopa mortaliteta slična među različitim regionima, nezavisno od razvijenosti tog regiona i dostupnosti medicinske nege (Bray i sar., 2024). Ovaj porast broja obolelih od tiroidnog karcinoma je najverovatnije posledica povećanog obima preventivnog skrininga pri kom se otkrivaju tumori kod ljudi koji ne pokazuju simptome oboljenja i možda nikad ne bi razvili kliničku sliku. U analizi podataka dobijenih iz 25 zemalja, pokazano je da se porast učestalosti tiroidnog karcinoma odnosi u najvećem broju slučajeva na papilarni histološki tip i to najčešće tumore čiji je promer manji od 2 cm, koji su uglavnom indolentni i ne bi izazvali nikakve simptome. Međutim, pored malih, primećen je i porast učestalosti velikih tumora (Vaccarella i sar., 2016; Miranda-Filho i sar., 2021).

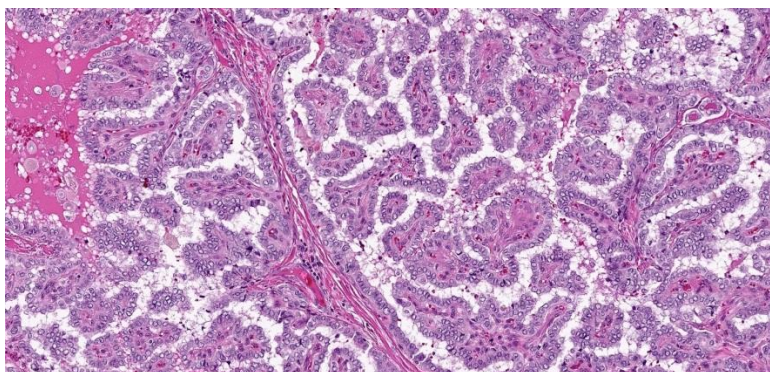
Tumori štitaste žlezde mogu biti nodularna, najčešće solitarna, uvećanja štitaste žlezde. Obično su ove lezije benigne, ali 7-15% ovih promena se pokaže kao maligno (Haugen i sar., 2016). Benigni tumori se odlikuju izuzetno sporim lokalizovanim rastom, bez širenja na okolno tkivo, van štitaste žlezde. Maligni tumori, sa druge strane se odlikuju nekontrolisanim rastom i proliferacijom ćelija. Prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (SZO) za endokrine i neuroendokrine tumore (IARC, 2022), pri klasifikaciji tiroidnih tumora u obzir se uzimaju poreklo maligne ćelije, patološke karakteristike (citopatološke i histopatološke), molekularni profil i biološko ponašanje. Više od 90% tiroidnih tumora vodi poreklo od folikularnih epitelnih ćelija (folikularni tumori), dok manji broj potiče od C-ćelija (medularni tumori). Osim ove dve glavne grupe, navedeno je još 6 grupa izuzetno retkih neoplazija (Baloch i sar., 2022). Tumori folikularnog porekla, prema ovoj klasifikaciji, podeljeni su prema tendenciji širenja na benigne lezije, maligne i neoplazije niskog rizika, dok od malignih tumora najveću učestalost ima papilarni tiroidni karcinom (papilarni karcinom štitaste žlezde, PTK).

1.2.1 Papilarni tiroidni karcinom

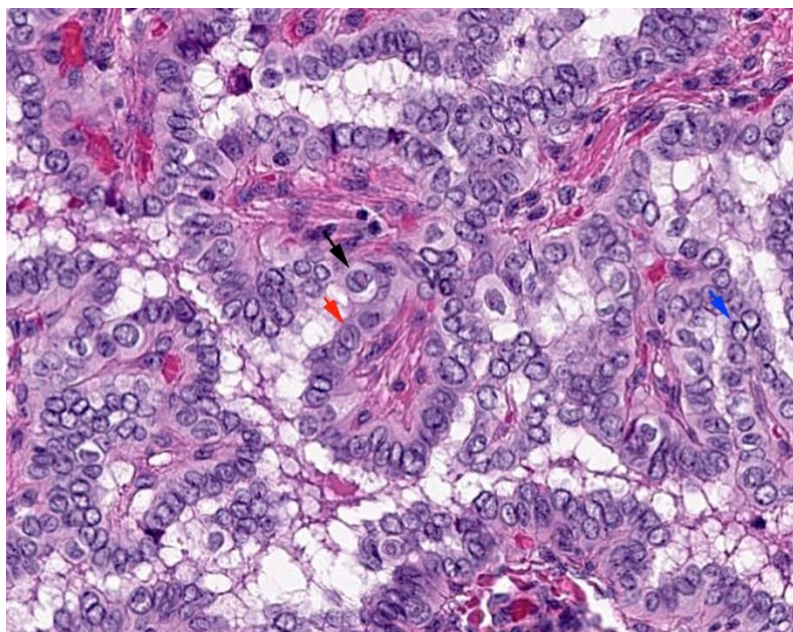
Papilarni karcinom štitaste žlezde nastaje transformacijom folikularnih ćelija i obuhvata oko 80% svih dijagnostikovanih neoplazija tiroidee (Cramer i sar., 2010). Češće se javlja kod žena i u područjima sa visokim sadržajem joda, retko je familijaran i pokazuje asocijaciju sa prethodnim zračenjem vrata (LiVolsi, 2011). Leči se hirurškim otklanjanjem cele štitaste žlezde (tiroidektomija) ili njenog zahvaćenog lobusa (lobektomija), nakon čega se primenjuje terapija radioaktivnim jodom (Haugen i sar., 2016). Ukoliko se pravilno leči ima odličnu prognozu. U slučajevima kada je malignitet ostao lokalizovan i nije zahvatio okolne strukture vrata, petogodišnje preživljavanje iznosi skoro 100%. U slučajevima kada je karcinom lokoregionalno uznapredovao i proširio se na okolne limfne čvorove, petogodišnje preživljavanje je i dalje veoma visoko, dostižući 99% (SEER database, 2023).

PTK se definiše kao nodus sa slabo definisanom granicom, čvrste konzistencije, obično bele boje, često sa kalcifikacijama i invazivnim fenotipom. Može se pojaviti na bilo kom mestu u žlezdi. Nodus je uglavnom palpabilan tj. opipljiv, ali može biti i neopipljiv i takvi se slučajno otkriju na ultrazvučnom ili pregledu magnetnom rezonancom kao i kompjuterizovanom tomografijom (pregledno prikazano u Al-Brahim i Asa, 2006). Veličina PTK veoma varira i ide od karcinoma koji su manji od 1 cm u prečniku pa do velikih tumora od 10 cm, ponekad i više. Konačnu patohistološku dijagnozu PTK postavlja patolog mikroskopskim pregledom hirurški odstranjenog tkiva, a na osnovu jedinstvenih citoloških i histoloških karakteristika. Mikroskopska identifikacija PTK zavisi od prepoznavanja osobnosti koje, same za sebe nisu specifične za PTK, ali kombinovane predstavljaju osnov za dijagnozu.

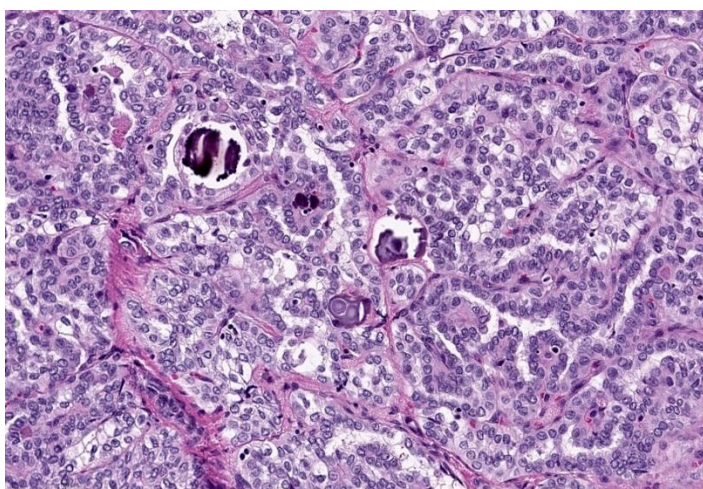
Najupadljivija osobina, histološki gledano, je tkivo koje je najčešće organizovano u papile, mada se ponekad zadržava folikularna arhitektura tiroidnog tkiva sa izmenjenom veličinom i/ili morfologijom folikula. Papile su izdužene strukture sa dobro organizovanim fibrovaskularnim jezgrom, oivičene jednim slojem malignih ćelija kockastog ili cilindričnog oblika (**Slika 1.6.**) Jedra malignih ćelija u PTK su veća i ovalnija u odnosu na jedra normalnih folikularnih ćelija i uglavnom su prosvetljena zbog nagomilavanja hromatina uz nukleusni ovoj, pa se zbog svog izgleda često označavaju kao "staklasta jedra" (**Slika 1.7.**). Ova jedra su često međusobno blisko pozicionirana sa karakterističnim pseudoinkluzijama i uvratima nukleusnog ovoja (Lloyd i sar., 2011). Još jedna karakteristična osobina PTK su uočljiva „psamomska telašca“ koja predstavljaju nakupine kalcijuma nastale zbog nekroze vrhova papila, moguće kao posledica tromboze sitnih krvnih sudova (**Slika 1.8.**). Česte su limfocitne infiltracije u i oko malignog tkiva (Havelka i Tatić, 2003).



Slika 1.6. Mikrografija na kojoj je prikazan papilarni karcinom štitaste žlezde. Preuzeto sa: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillaryclassic.html>



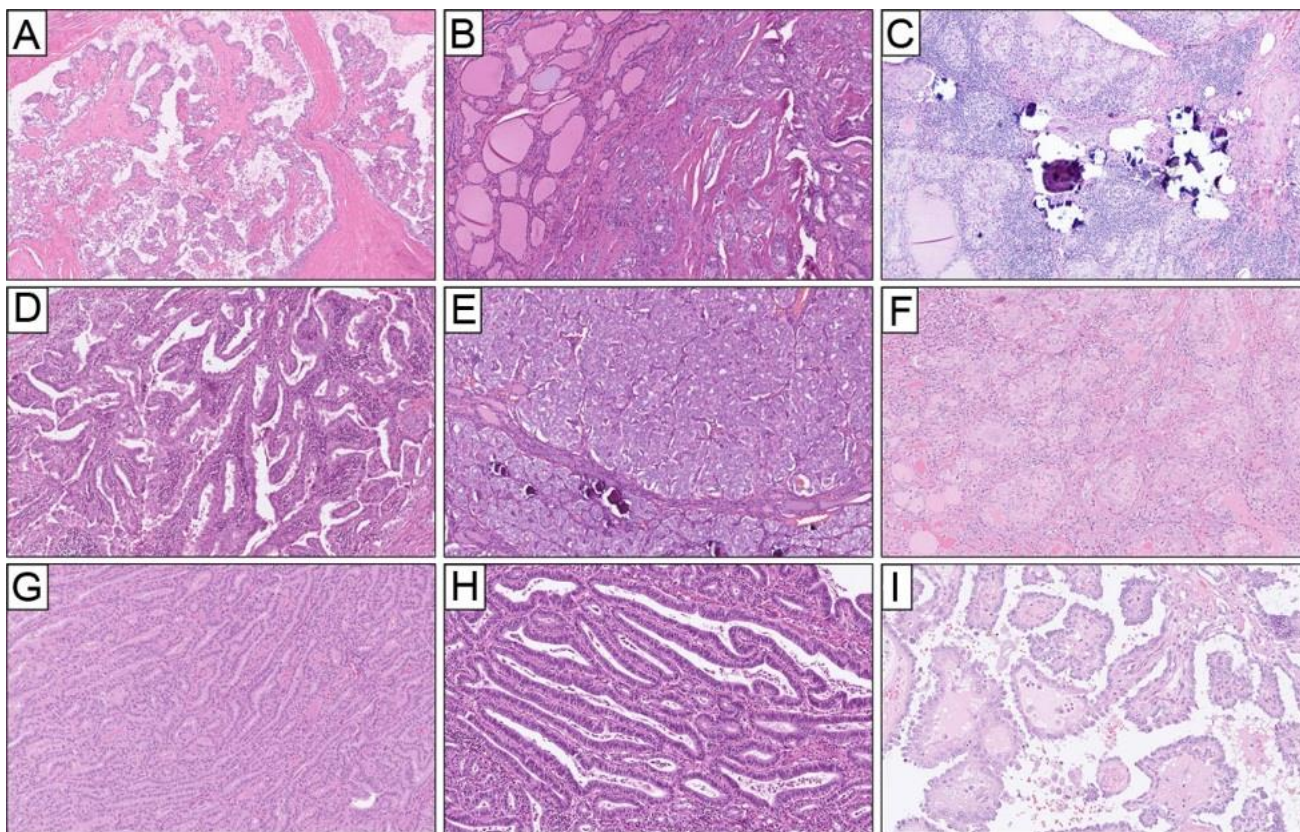
Slika 1.7. Mikrografija na kojoj su prikazane karakteristike jedara u PTK. Prikazana jedra su uvećana, preklapaju se, mogu biti sa invaginacijama jedarnog ovoja (crvena strelica), citoplazmatskim pseudoinkluzijama (crna strelica) i prosvetljenim hromatinom (plava strelica). Preuzeto sa: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillaryclassic.html>



Slika 1.8. Mikrografija PTK na kojoj su prikazana psamomska telašca definisana kao nakupine kalcijuma. Preuzeto sa: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillaryclassic.html>

Papilarni karcinom se javlja u više različitih podtipova. U najnovijem, petom izdanju, SZO je razvrstala podtipove PTK, ne samo po histološkim karakteristikama, na kojima je i dalje fokus ove klasifikacije, već i po molekularnom profilu ovih tumora, nezavisno od veličine tumora (IARC, 2022). Na **Slici 1.9.** prikazane su reprezentativne mikrografije različitih histoloških podtipova PTK. Klasičan podtip PTK se odlikuje formiranim papilama koje su oivičene tumorskim ćelijama, sa jedrom koje ima sve prethodno pomenute specifične karakteristike. Papile imaju nežnu fibrovaskularnu stromu i narušavaju histološku građu štitaste žlezde. Ovo je tip tiroidnog karcinoma koji se širi putem limfe na regionalne limfne čvorove, a retko dalje. Hematogena invazija je veoma retka. Postojanje tumorske kaspule u ovom podtipu PTK je povezano sa odličnom kliničkom prognozom (Lloyd i sar., 2011). Infiltrativni folikularni podtip PTK se karakteriše invazivnim rastom klasičnog PTK ali se odlikuje odsustvom papila. Prisustvo jedara karakterističnih osobina i psamomskih telašaca ga svrstavaju u kategoriju PTK (Baloch i sar., 2022). Ostali podtipovi PTK su

ređi imogu biti difuzno sklerozni, Warthin-like, solidni, onkocitični, visokoćelijski, stubičasti i čiodasti podtip PTK.



Slika 1.9. Mikrografije reprezentativnih primera različitih histoloških podtipova PTK. **A.** Klasičan PTK, **B.** Infiltrativni folikularni tip PTK, **C.** Difuzno-sklerozni podtip PTK, **D.** Warthin-like podtip PTK, **E.** Solidni podtip PTK, **F.** Onkocitični podtip PTK, **G.** Visokoćelijski podtip PTK, **H.** Stubičasti podtip PTK, **I.** Čiodasti podtip PTK. Preuzeto i modifikovano iz: Juhlin i sar., 2022.

Mora se napomenuti da, iako su mikrokarcinomi (karcinomi prečnika <1 cm) prema pređašnjoj klasifikaciji SZO bili izdvojeni kao posebna varijanta PTK, to sada nije slučaj. Naime, mikrokarcinomi su u prošlosti bili opisivani kao okultni karcinomi koji su slučajno otkriveni i imaju odličnu prognozu. Pokazano je da se neki agresivni tipovi tumora mogu javiti u vidu mikrokarcinoma, te je konsenzusom odlučeno da se mikrokarcinomi više ne mogu opisivati kao posebna varijanta samo zbog promera nego da se moraju približnije definisati i još nekim histološkim karakteristikama. Ovo se posebno odnosi na podtipove kao što su visokoćelijski, stubičasti i čiodasti (Juhlin i sar., 2022).

Iako uopšteno ima dobru prognozu, u retkim slučajevima PTK može da poprimi agresivnije forme. Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima se nalaze u 37-54% pacijenata i viđaju se u svim stadijumima i veličinama primarnog tumora. Udaljene metastaze su retke (1-7%), nastaju širenjem neoplazije u regionalne limfne čvorove i potomjom diseminacijom malignih ćelija limfotokom. Najčešće se nalaze na plućima, kostima i mozgu (Toraih i sar., 2021). Činioci udruženi sa lošom prognozom su starost pacijenta u vreme postavljanja dijagnoze, ekstratiroidna invazija, prisustvo lokalnih metastaza i veličina tumora. Iz histološke perspektive, u nekim slučajevima može da dođe do različitog stepena dediferencijacije tkiva PTK što vodi ka stvaranju retkih, agresivnih varijanti tireoidnog karcinoma sa povećanim invazivnim potencijalom. Na kraju procesa dediferencijacije PTK može preći u najagresivniju varijantu tireoidnih tumora, anaplastični karcinom, sa visokim proliferativnim potencijalom, koji je obavezno fatalan sa prosečnim preživljavanjem od šest meseci nezavisno od stadijuma (Volante i sar., 2021).

1.3 Prognostički kliničkopatološki faktori

Prognostički faktori su karakteristike tumora ili pacijenta koje su direktno povezane sa agresivnošću bolesti i presudne su za stratifikaciju pacijenata na osnovu težine bolesti i donošenju odluka o postoperativnom lečenju. Tokom godina, nekoliko prognostičkih faktora se izdvojilo kao ključno za stratifikaciju pacijenata sa PTK. Oni se ugrubo mogu podeliti u četiri kategorije (Ito i Miyauchi, 2012):

1. Pacijentov „background“
2. Preoperativna evaluacija
3. Intraoperativna evaluacija (nalaz hirurga u toku operacije)
4. Postoperativna evaluacija

Pacijentov „background“ prvenstveno predstavljaju osnovni podaci o pacijentu (starost, pol, medicinska anamneza) i mogu biti od pomoći u preoperativnoj proceni prognoze. Tako, pacijenti preko 45 godina starosti često imaju lošiju prognozu (Cao i sar., 2021). Takođe, iako PTK češće pogađa žene, muškarci imaju lošiju prognozu (Ding i sar., 2020). Zatim, genetski polimorfizmi i nasledni sindromi, se takođe smatraju delom pacijentovog „background“. Testiranje na određene genetske promene, kao što su BRAF i TERT mutacije ili RET/PTC translokacije, može pomoći u proceni prognoze i uticati na određivanje načina lečenja (Nikoforov i sar., 1997; Tanaka i sar., 2019; Xing, 2019).

Preoperativna evaluacija se prvenstveno zasniva na „imaging“ tehnikama kao što su UZ i MR koje omogućavaju procenu veličine i strukture tumora, kao i procenu lokalne ekstenzije bolesti (Ito i sar., 2007). Takođe, citološki nalaz dobijen FNAB može dati informacije o vrsti karcinoma i pomoći u planiranju obima operacije (Cooper i sar., 2009).

Tokom operacije hirurg može proceniti uznapredovalost tumora, kao što su veličina tumora, invazija u okolna tkiva i odnosi sa drugim strukturama što može pomoći u odluci o opsegu operacije (totalna tiroidektomija ili parcijalna resekcija) i daljem toku lečenja (Bhattacharyya, 2003; Randolph i sar., 2012; Kim i sar., 2019).

Postoperativna evaluacija se zasniva na nalazu patologa nakon mikroskopskog pregleda odstranjenog tkiva, gde ključne informacije uključuju histološki tip tumora, veličinu tumora, dubinu neoplastične infiltracije, multicentričnost, prisustvo ekstratiroidne invazije, regionalnih i udaljenih metastaza (Ito i Miyauchi, 2012). Nivo tiroglobulina u serumu nakon operacije se koristi za praćenje pacijenata i procenu potencijalnih recidiva (Miyauchi i sar., 2011).

Ocena stadijuma tiroidnih karcinoma

Najrasprostranjeniji sistem za klasifikovanje pacijenata sa diferentovanim tiroidnim karcinomima je TNM (engl. tumor-node-metastasis) klasifikacija predložena od strane Američkog združenog komiteta za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*) (Edge i sar., 2010). Ova klasifikacija omogućava da se numerički izrazi stepen napredovanja bolesti, a postupak obuhvata definiciju veličine tumora (T status), zahvatanja regionalnih limfnih čvorova (N status) i udaljenih metastaza (M status).

Ocenjivanje se vrši na sledeći način:

T status:

- T1: tumori manji od 2 cm u najvećoj dimenziji, ograničeni na štitastu žlezdu
- T2: tumori veličine od 2 cm do 4 cm, ograničeni na štitastu žlezdu
- T3: tumori veći od 4 cm ograničeni na štitastu žlezdu ili sa minimalnom ekstratiroidnom invazijom
- T4: tumori bilo koje veličine, koji su se proširili van granica štitaste žlezde i zahvatili okolna tkiva

N status:

- Nx: regionalni limfni čvorovi ne mogu biti ocenjeni
- N0: ne postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
- N1: postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima

M status:

- M0: nema udaljenih metastaza
- M1: postoje udaljene metastaze

Na osnovu ovih ocena, pacijenti se svrstavaju u različite TNM kategorije:

- **TNM I:** Pacijenti T1 statusa, uz odsustvo bilo kakvih metastaza, kao i svi pacijenti starosti ispod 45 godina bez obzira na odsustvo tj. prisustvo metastaza na limfnim čvorovima;
- **TNM II:** Pacijenti T2 statusa, sa odsustvom metastaza, ili pacijenti starosti ispod 45 godina ukoliko imaju udaljene metastaze;
- **TNM III:** Pacijenti T3 statusa, sa odsustvom metastaza ili bilo kojeg T statusa ukoliko postoje metastaze na regionalnim limfnim čvorovima, ali ne i udaljene;
- **TNM IV:** Pacijenti T4 statusa sa metastazama limfnih čvorova i bez udaljenih metastaza ili pacijenti sa bilo kojim T statusom ukoliko imaju udaljene metastaze.

Iako je dugo u upotrebi i od velike koristi u kliničkoj praksi, ova klasifikacija ima nekoliko mana. Najveći problem predstavlja činjenica da se ocena stadijuma bolesti u velikoj meri oslanja na starost pacijenta. U eri rasta incidence tiroidnih karcinoma, čak i u mlađim starosnim grupama, kao i sve češće pojave retkih, dediferenciranih varijanti karcinoma, svrstavanje svih pacijenata mlađih od 45 godina u niže stadijume nije adekvatno. Takođe, ovakva klasifikacija ne govori ništa o biološkim osobinama tumora.

Iz ovih razloga, savremena istraživanja se bave identifikacijom specifičnih genskih lezija i/ili njihovih biohemijskih produkata specifičnih za stanje tumora i prognozu njegovog kliničkog toka, odnosno pronalaskom novih biomarkera koji bi bili pomoćno sredstvo uz postojeću TNM klasifikaciju za adekvatno zbrinjavanje pacijenata.

1.4 Biomarkeri u istraživanjima kancera

Biomarkeri su paramateri bioloških sistema čija je promena merljiva odnosno objektivni pokazatelji medicinskog stanja koji se mogu precizno i reproducibilno meriti (pregledno prikazano u Califf, 2018). U medicinskoj praksi se najčešće koriste u sklopu laboratorijskih testova. Imaju veliki značaj u identifikaciji osoba koje imaju rizik od nastanka patološkog stanja, predviđanju kliničkog toka bolesti, predviđanju odgovora na terapiju, razvoju novih terapeutika, proceni efikasnosti i bezbednosti terapije.

Biomarkeri se mogu podeliti po vrsti analiziranog molekula (proteini, metaboliti, geni itd.); prema vrsti biološkog uzorka (iz seruma, tkiva, urina itd.); prema vrsti informacije koju pružaju (prediktivni, dijagnostički, prognostički) kao i prema načinu ekspresije (gubitak odnosno smanjenje ekspresije ili sticanje odnosno povećanje ekspresije).

Danas se u velikom broju laboratorija vrši genetička, molekularna i biološka analiza raznih patoloških stanja u cilju identifikacije molekularnih promena koje prate razvoj bolesti, a koje bi bile pogodni kandidati kao markeri boljih performansi od postojećih.

Kada je reč o biomarkerima karcinomskih stanja, poslednjih godina sve veću pažnju zavređuju osobine ne same maligne ćelije nego i njenog okruženja.

1.5 Vanćelijski matriks

Vanćelijski matriks (VCM) je složena struktura koja se nalazi oko ćelija u svim tkivima i organima. Makromolekuli koji sačinjavaju VCM se sintetišu u ćelijama, najviše u fibroblastima, i sekretuju se u vanćelijsku sredinu. Svako tkivo ima VCM jedinstvenog sastava i strukture koji je stvoren tokom ranog embrionalnog razvića. Biohemijske i biomehaničke osobine i organizacija VCM u tkivu mogu značajno varirati između različitih tkiva, u različitim delovima istog tkiva, kao i različitim fiziološkim uslovima. Iako je VCM dugo smatran za pasivan okvir u kome su smeštene ćelije, sa striktno potpornom ulogom, danas se zna da je to jedna veoma dinamična sredina koja predstavlja regulator ponašanja ćelija i tkiva obezbeđujući informacije odgovorne za kontrolu ćelijskog ponašanja. Komponente VCM služe kao ligandi za ćelijske receptore, zatim matriks može lokalno vezivati i otpuštati signalne molekule što utiče na sudbinu ćelije ali i na arhitekturu samog

VĆM i njegov dalji uticaj na ćeliju. Sa druge strane, ćelija može uticati na VĆM tako što kroz sintezu, razgradnju i hemijske modifikacije komponentni matriksa menja njegov sastav i fizičke osobine. Dalje, sve promene u matriksu kao rezultat ćelijske aktivnosti će zauzvrat uticati na ponašanje te i susednih ćelija. Ovi procesi su vrlo kompleksni i moraju biti strogo regulisani kako bi se održala homeostaza. I zaista, pokazano je da svaka disregulacija remodelovanja VĆM povezana sa patološkim stanjima može čak i ubrzati napredovanje bolesti. Savremena istraživanja se sve više fokusiraju na značaj interakcija maligne ćelije i komponenta okruženja (VĆM, fibroblasti, inflamatorne i endotelne ćelije), na razvoj i progresiju kancera. Pokazano je da interakcija zdrave ćelije i izmenjene mikrosredine može dovesti do razvoja maligniteta, ali i da ćelije sa malignim genotipom postaju fenotipski normalne nakon određenih manipulacija okolne sredine. Ove studije sve više ukazuju da se tumor ne može izučavati izolovano, već kao deo fiziološki relevantnog okvira (pregledno prikazano u Bonnans i sar., 2014).

Glavni proces tokom remodelovanja VĆM je razgradnja komponenti matriksa i važan je kako za sastav i strukturu VĆM, tako i za otpuštanje biološki aktivnih molekula. Matriksne metaloproteinaze (MMP) su glavni enzimi uključeni u degradaciju VĆM.

1.6 Matriksne metaloproteinaze

Matriksne metaloproteinaze su porodica cink- i kalcijum-zavisnih endopeptidaza sa osnovnom ulogom u razgradnji komponenti VĆM. Imaju ulogu u velikom broju fizioloških procesa kao što su embrionalno razviće, reparacija lezija i održavanje tkivne homeostaze putem remodelovanja tkiva, ali takođe u patološkim stanjima kao što su osteoarthritis, reumatoidni arthritis, autoimunska oboljenja i nastanak i razvoj malignih tumora (Nagase i sar., 2006).

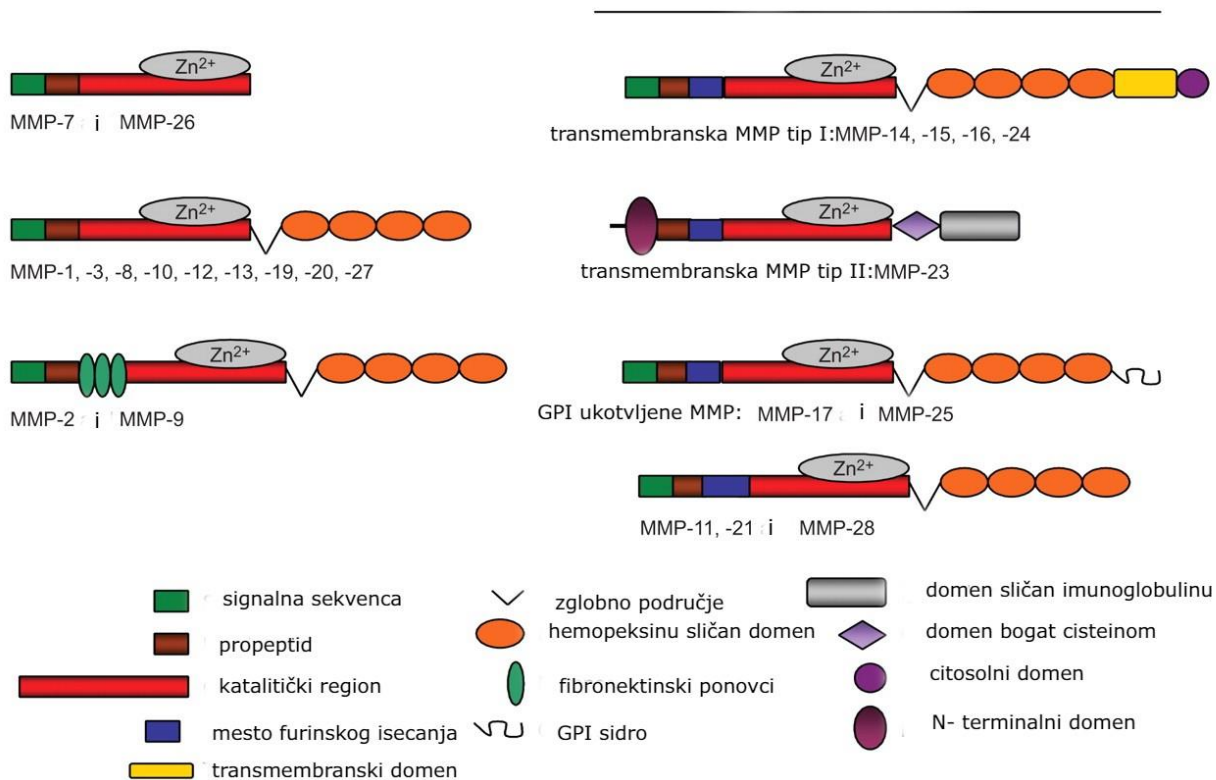
Do sada je otkriveno 28 članova porodice MMP od kojih su 23 nađene kod čoveka (pregled dat u Cui i sar., 2017). Pokazuju visok nivo homologije sekvence i evolutivnu konzerviranost domenske strukture. Matriksne metaloproteinaze tipično sadrže sledeće domene:

- propeptid čijim se odstranjivanjem oslobađa aktivno mesto
- katalitički domen koji sadrži aktivno mesto i sadrži jone cinka i kalcijuma kao kofaktore;
- zglobno područje (engl. *hinge region*) koje doprinosi fleksibilnosti strukture enzima;
- hemopeksinu sličan C-terminalni domen koji je zadužen za protein-protein interakcije, određuje specifičnost za supstrat i za njega se vezuju tkivni inhibitori metaloproteinaza.

Izuzetak su MMP7, -23 i -26 kojima nedostaje zglobno područje i hemopeksinu sličan domen. MMP23 ima jedinstveni C-terminalni domen bogat cisteinom i imunoglobulinu sličan domen koji se nastavlja na katalitički domen enzima (**Slika 1.10**).

Kada je u pitanju specifičnost za supstrat, važno je istaći da iako svaki član porodice MMP ima glavni supstrat među molekulima VĆM, specifičnost za supstrat nije potpuna, tako da svaka MMP može da degradira više supstrata. Specifičnost za supstrat, organizacija različitih domena i lokalizacija u ćeliji su ujedno i kriterijumi za podelu MMP. Iako ne postoji univerzalno prihvaćena podela MMP, naječešće se koristi podela na:

1. Kolagenaze (MMP1, MMP8, MMP13);
2. Želatinaze (MMP2, MMP9);
3. Stromelizine (MMP3, MMP10);
4. Matrilizine (MMP7, MMP26, MMP11);
5. Metaloproteinaze membranskog tipa (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25);
6. Ostale MMP (MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP23, MMP27, MMP28); (Sekhon, 2010).



Slika 1.10. Prikaz strukture matriksnih metaloproteinaza. Preuzeto i modifikovano iz: Löffek i sar., 2011.

1.6.1 Matriksna metaloproteinaza 9

Želatinaze su najizučavaniji predstavnici familije enzima MMP koje obuhvataju MMP2 i MMP9, a imaju osnovnu ulogu u proteolizi kolagena IV. MMP2 je enzim veličine 72 kDa koji vrši proteolizu kolagena I i IV, a konstitutivno je eksprimiran u mnogim tkivima (pregledno prikazano u Woessner Jr, 1991). Nasuprot tome, MMP9 ima veličinu 92 kDa i vrši proteolizu kolagena IV (Wilhelm i sar., 1989), ali i adhezivnih molekula, receptora na ćelijskoj površini i drugih članova porodice MMP (pregledno prikazano u Bauvois, 2012). To je umnogome potvrdilo da ovaj enzim ima ključnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim procesima. Veliki broj tipova ćelija, uključujući neutrofile (Tschesche i sar., 2001), makrofage (Fang i sar., 2010) i fibroblaste (Siwik i sar., 2001) sintetiše MMP9. U fiziološkim uslovima MMP9 ima bitne uloge tokom ranog gestacijskog perioda u invaziji trofoblasta i implantaciji embriona, razvoju srčanog tkiva, neovaskularizaciji, razvoju kostiju, učenju i pamćenju, kao i imunskom odgovoru (Nagase i sar., 2006).

Što se strukture ovog enzima tiče, od ostalih MMP ga izdvaja postojanje domena sličnog fibronektinu II koji se sastoji od tri ponovka sa po 58 aminokiselina zahvaljujući kojima je olakšana degradacija velikih želatinoznih molekula supstrata. Katalitički domen MMP9 sadrži konzerviranu sekvencu AHGXGHXXGXXH u kojoj su tri histidina odgovorna za koordinaciju sa katalitičkim jonom cinka. Drugi jon cinka i tri jona kalcijuma imaju strukturnu ulogu (pregledno prikazano u Ra i Parks, 2007).

1.6.1.1 Regulacija aktivnosti MMP9

MMP9 je izuzetno aktivan enzim čija poremećena regulacija dovodi do brojnih patoloških stanja. Kako bi se izbegla neželjena proteoliza supstrata i održala tkivna homeostaza, njegova aktivnost mora biti strogo regulisana na svim nivoima: transkripcionom, posttranskripcionom, na nivou proteolitičke aktivacije latentne forme, inhibicije tkivnim inhibitorima kao i na nivou prostorne i vremenske pericelularne lokalizacije aktivnosti (pregledno prikazano u Vandooren i sar.,

2013). Prvi nivo regulacije ekspresije MMP9 je pod kontrolom komponenti različitih signalnih puteva koji mogu povećavati ili smanjivati transkripciju *MMP9* gena. Sledeći nivo je regulacija na posttranskripcionom nivou gde usled aktiviranja različitih signalnih puteva može doći do degradacije iRNK za MMP9 što posledično snižava nivo preproMMP9. Vreme i mesto sekrecije ovih proteina je još jedan vid regulacije, nakon čega sledi regulacija aktivacije enzima. Naime, kada se MMP9 sintetiše, ona je u vidu neaktivnog zimogena koji se nakon sekrecije aktivira proteolitičkom razgradnjom propeptida čime se dobija aktivan enzim. Aktivna MMP9 može biti inhibirana različitim inhibitorima od kojih su najbitniji TIMP proteini (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) u tkivima i α 2-makroglobulin u plazmi (Edwards, 2016; Sottrup-Jensen i sar., 1989).

1.6.1.1.1 Regulacija transkripcije

Studije pokazuju da je regulacija transkripcije dominantan nivo na kom se reguliše aktivnost MMP9. Humani gen za MMP9 je mapiran na hromozomskom regionu 20q11.2–q13.1 (Hutala i sar., 1991). Promotor gena za MMP9 sadrži veliki broj *cis*-elemenata koji predstavljaju mesta za vezivanje transkripcionih faktora. Promene u tim elementima mogu dovesti do poremećaja u vezivanju transkripcionih faktora što posledično može dovesti do poremećene transkripcije. Jedna od tih promena može biti polimorfizam u promotoru gena. Naime, polimorfizmi su različite varijacije genotipa ili alela u populaciji, sa učestalošću većom od 1%. Najčešći su polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotid polymorphism*; SNP), za koje se pretpostavlja da ih u genomu ima približno 10 miliona, ali ima i drugih, kao što su varijacije u broju ponovaka. Iako postoji veliki broj polimorfizama u genomu, vrlo mali broj njih je funkcionalan odnosno ima nekog uticaja na gen u kome se nalazi i takvi polimorfizmi se najčešće nalaze u promotoru gena gde promena sekvence može imati uticaja na vezivanje transkripcionih faktora a time posledično i na transkripciju tog gena. Zbog toga mogu biti korisni u kliničkoj praksi kao dodatni biomarkeri, kako bi se videlo koja je varijanta prisutna jer se do uzorka može doći lako, a analiza je relativno jeftina. Promotor gena za MMP9 sadrži dve polimorfne sekvence za koje se pokazalo da utiču na transkripcionu aktivnost: tranzicija citozina (C) u timin (T) na poziciji -1562 (-1562 C/T; NCBI SNP identifikacioni broj: rs3918242) i varijacija u broju nukleotidnih citozin-adenin (CA) ponovaka, od 13 do 25, na poziciji -131 (CA)₁₃₋₂₅; (CA)_n; NCBI identifikacioni broj: rs3222264).

Tranzicija C u T na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 dovodi do nemogućnosti represora transkripcije da se veže za ovaj region i posledično povećanja nivoa transkripcije. Ovo je pokazano u MALU ćelijskoj liniji makrofaga, gde rezultati pokazuju da prisustvo T alela dovodi do 1,5 puta povećane transkripcione aktivnosti u odnosu na CC genotip (Zhang i sar., 1999). Većina studija se slaže sa ovim rezultatima. Hoelzle i saradnici (2016) su takođe pokazali 1,5 puta višu ekspresiju kod pacijenata sa kancerom debelog creva koji su u promotoru gena za MMP9, na poziciji -1562 imali T alel, a čak pet puta višu ekspresiju MMP9, kod CT i TT u poređenju sa CC genotipom, pokazali su Medley i saradnici (2004). Ipak, veza između T alela i transkripcione aktivnosti MMP9 nije potvrđena u studiji iz 2002. godine rađenoj na primarnim ćelijskim kulturama amniotskih epitelnih ćelija, WISH (izvedene iz HeLa ćelija) i THP-1 (ćelijska linija humane monocitne leukemije) (Ferrand i sar., 2002). Rollin i saradnici (2007) su takođe pokazali da T alel nema uticaj na nivo iRNK za MMP9 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća.

Još jedan potvrđeni funkcionalni polimorfizam u promotoru gena za MMP9 je varijacija u broju CA ponovaka na poziciji -131. Slično kao i -1562 C/T polimorfizam, (CA)_n varijacija, može uticati na transkripcionu aktivnost *MMP9* usled njene lokalizacije koja je blizu mesta vezivanja nekoliko transkripcionih faktora. Pokazano je da se, usled promene u broju ovih ponovaka, menja konformacija DNK što modulise transkripcionu aktivnost *MMP9*. Ovo je pokazano *in vitro* na humanim HT1080 fibroblastima (Peters i sar., 1999), zatim humanim ćelijskim linijama kancera jednjaka (Shimajiri i sar., 1999) kao i WISH ćelijskoj liniji (Ferrand i sar., 2002). Pokazano je da je distribucija broja ponovaka bimodalna u skoro svim ispitivanim populacijama, sa jednim pikom na 14, a drugim na 21, 22 ili 23 ponovka, dok aleli sa 16 i 17 ponovaka nisu nađeni u populacijama belaca i ljudi azijskog porekla (Peters i sar., 1999; Nelissen i sar., 2000, 2002; Zhang i sar., 2001).

Izuzetak su Japanci, kod kojih je pokazano da postoji samo jedan pik, na 21 ili preko 22 ponovka uz vrlo retke subjekte koji su nosioci 14, 18 ili 19 CA ponovaka (Shimajiri i sar., 1999; Maeda i sar., 2001). Dostupni podaci nisu u potpunosti usaglašeni kada je u pitanju veza između nivoa transkripcione aktivnosti i određenog broja CA ponovaka u promotoru gena za MMP9. Shimajiri i saradnici su u studiji iz 1999. godine pokazali da je transkripciona aktivnost za 50% manja kod gena za MMP9 koji imaju 14 CA ponovaka u odnosu na one koji imaju 21 ponovak, dok je u drugoj studiji iz iste godine ta razlika iznosila 60% kada se uporede transkripcione aktivnosti gena za MMP9 koji imaju 14 i 23 ponovka u promotoru (Peters i sar., 1999). Ipak, Cotignola i saradnici (2007) nisu uspeli da nađu vezu između broja ponovaka i transkripcione aktivnosti ovog gena.

Transkripcioni faktori koji se vezuju za *cis* elemente su delovi važnih signalnih puteva koji aktiviraju ili suprimiraju ekspresiju i mnogih drugih gena, a u ove regulatore se između ostalog ubrajaju aktivacioni protein 1 (engl. *activating protein 1*; AP-1), faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*; TNF- α), ETS (engl. *erythroblast transformation specific*), nukleusni faktor kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*; NF- κ B), specifični protein 1* (engl. *specifity protein 1**; Sp-1) (He, 1996; Robert i sar., 2009).

Transkripcioni faktor AP-1 je kompleks proteina sastavljen od članova proteinskih familija Jun, Fos, ATF i MAF. Funkcioniše kao homo- ili heterodimer ali valja napomenuti da ne mogu svi njegovi proteini formirati homodimere niti su sve kombinacije heterodimera moguće (pregledno prikazano u Chinenov i sar., 2001). Različiti dimeri se razlikuju u svojim mestima vezivanja za DNK kao i transkripcionim aktivnostima, pa npr. dimeri c-Jun/c-Fos se češće vezuju za TRE (engl. *TPA responsive elements*) dok se c-Jun/ATF češće vezuju za CRE (engl. *cAMP responsive elements*), ili c-Jun/c-Fos dimeri imaju veći afinitet za TRE od c-Jun/c-Jun dimera (Wu i sar., 2021). Proteini kompleksa AP-1 regulišu mnoge procese kao što su ćelijski ciklus, proliferacija, apoptoza, migracija i invazija, a pokazano je i da imaju važnu ulogu u nastanku i progresiji kancera (pregledno prikazano u Eferl i Wagner, 2003). Pokazano je da u promotoru gena za MMP9 postoje dva mesta vezivanja proteina AP-1: proksimalno, na poziciji -71 do -80 i distalno, na poziciji -529 do -580 (Farina i Mackay, 2014).

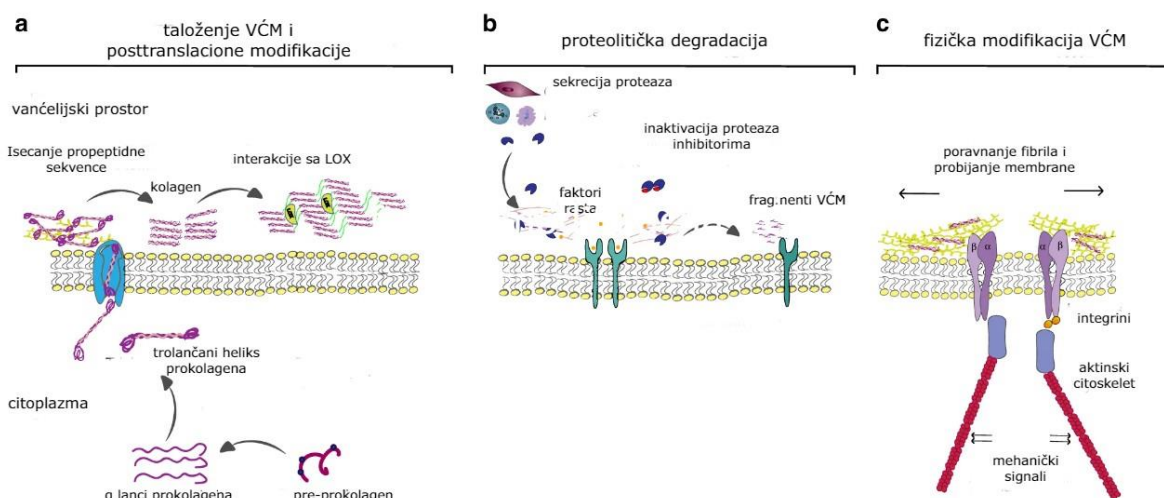
Protein c-Jun je označen kao glavni član kompleksa transkripcionog faktora AP-1. Ovaj protein učestvuje u MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) putu gde utiče na transkripciju različitih gena, pa i MMP9. Aktivnost c-Jun je regulisana različitim posttranslacionim hemijskim modifikacijama koje su pod kontrolom različitih komponenti MAPK puta. Te modifikacije se javljaju na 3 mesta u proteinu: u N-terminalnom regionu dolazi do fosforilacije serina (Ser) na pozicijama 63 i 73 i treonina (Thr) na pozicijama 91 i 92 (Smeal i sar., 1991; Morton i sar., 2003), kao i do defosforilacije Thr na poziciji 239 (Morton i sar., 2003), dok blizu C-terminalnog regiona dolazi do acetilacije lizina (Lys) na poziciji 268, 271 i 273 (Vries i sar., 2001). Fosforilacija c-Jun je dobro izučena i pokazano je da je preduslov za aktivaciju c-Jun. Ipak, analiza acetilovane forme c-Jun (ac c-Jun) pokazala je oprečne rezultate. Vries i saradnici su u studiji iz 2001, pokazali da usled acetilacije na Lys271 dolazi do represije aktivnosti c-Jun. Sa druge strane, Wang i saradnici (2006) su, ispitujući gensku regulaciju keratina 16, došli do zaključka da acetilacija određenih lizinskih rezidua u c-Jun dovodi do aktivacije ovog proteina. Ovo su potvrdili Mishra i saradnici (2016), kada su pokazali da hiperacetilacija c-Jun pojačava vezivanje AP-1 za DNK, a isti rezultat su dobili i Xie i saradnici (2013).

1.6.1.2 MMP9 u kanceru

Promene u VCM u tumorskom tkivu su rezultat različitih mehanizama remodelovanja koji mogu biti svrstani u četiri glavna procesa:

- taloženje VCM što menja količinu i kompoziciju komponenti VCM i tako utiče na biohemijske i mehaničke karakteristike VCM;
- posttranslacione modifikacije komponenti VCM čime se menjaju biohemijska svojstva i strukturne karakteristike VCM;
- proteolitička degradacija komponenti VCM čime se oslobađaju različiti bioaktivni molekuli koji imaju ulogu u relaksaciji migratornih barijera;

- “prisilno” fizičko remodelovanje matriksa što utiče na organizaciju VCM tako što se fibrili poravnavaju i otvaraju se prolazi za migraciju kancerskih ćelija (**Slika 1.11.**).



Slika 1.11. Mehанизmi remodelovanja VCM tokom progresije tumora. **a.** Taloženje VCM i posttranslacione modifikacije: dat je primer kolagena koji nakon sinteze, inicijalno u formi prokolagena prolazi kroz niz posttranslacionih modifikacija tokom kojih sazreva i nastaje trolančani heliks koji se sekretuje u vanćelijski prostor gde dolazi do asebliranja u kolagena vlakna. **b.** Degradacija VCM: proteaze, uključujući i MMP seku proteine VCM čime se oslobađaju faktori rasta i citokini, fragmentišu komponente VCM i uklanja barijera za migraciju ćelija. **c.** Fizičko remodelovanje VCM: vezivanjem integrina za molekule VCM vrši se pritisak mehaničkom silom, dolazi do poravnane fibrila i probijanja bazalne membrane što omogućava invaziju tumorskih ćelija. Preuzeto i modifikovano iz: Winkler i sar., 2020.

Ukratko, kancerske ćelije i faktori poreklom iz tumora aktiviraju ćelije strome što dovodi do sekrecije i taloženja velikih količina komponenata VCM. Uz to, enzimi koji modifikuju VCM poreklom kako iz tumora, tako i iz strome, interaguju i poravnavaju fibrile u matriksu čime se povećava rigidnost matriksa oko tumora i stvara se barijera čime se izbegava nadzor imunskog sistema. Povećana kompaktnost VCM dovodi komponente VCM i tumorske ćelije u neposrednu blizinu i to im omogućava dodatnu interakciju što je okidač za signalizaciju posredovanu integrinima, a rezultat je oslobađanje i aktivacija različitih proteaza, uključujući i matriksne metaloproteinaze, koje degraduju VCM i svojim delovanjem promovišu tumorsku proliferaciju, migraciju, invaziju tumorskih ćelija i angiogenezu. Visoka aktivnost MMP i angiogenezu na primarnom mestu tumora, remete vaskulaturu što omogućava tumorskim ćelijama da uđu u cirkulaciju. Povećana aktivnost MMP na mestu metastaze povećava propustljivost vaskulature što omogućava cirkulišućim tumorskim ćelijama da uđu u tkivo. Sa druge strane, uz pomoć različitih faktora poreklom od primarnog tumora, kao što su faktori rasta, kao i fibronektin i drugi proteini VCM, MMP učestvuju u stvaranju premetastatske niše (pregledno prikazano u Erler i Weaver, 2009; Winkler i sar., 2020).

Istraživanja pokazuju da MMP9 ima ulogu u svim fazama formiranja i progresije tumora i da njena izmenjena ekspresija može uticati kako na razvoj maligniteta tako i na tok bolesti. Prekomerna ekspresija MMP9 pokazana je u velikom broju malignih epitelnih tumora i često je korelisana sa lošom kliničkom slikom. U studiji iz 2021. godine, Zhang i saradnici su pokazali povišenu ekspresiju MMP9 u serumu pacijenata sa kancerom pluća u odnosu na zdrave osobe, takođe su našli vezu i između povišene ekspresije MMP9 i parametara povezanih sa agresivnim oblikom bolesti kao što su TNM kategorija, stepen diferencijacije, metastaze na limfnim čvorovima. U slučaju karcinoma jetre, pokazan je povišen nivo MMP9 u tkivu tumora u odnosu na susedno zdravo tkivo (Gerg i sar., 2008), a isto je pokazano i za karcinom usne duplje (Singh i sar., 2010). U tumorskom tkivu pacijenata sa kancerom želuca nađena je veza ekspresije MMP9 sa dubinom invazije i TNM kategorijom, a pokazana je i viša ekspresija u tumorskom nego u susednom

zdravom tkivu. Zbog dobijenih rezultata, autori su predložili da se ekspresija MMP9 može koristiti kao potencijalni biomarker za agresivne oblike raka želuca, ali i kao dijagnostičko sredstvo (Prathipaa i sar., 2021). Još jedna studija otkrila je povišenu ekspresiju MMP9 u pankreasnom soku i serumu kod pacijenata sa kancerom pankreasa, jednim od najsmrtonosnijih tipova kancera (Tian i sar., 2008). Ipak, ima izuzetaka gde je pokazana smanjena ekspresija ili fluktuacija ekspresije u zavisnosti od stadijuma bolesti. Koskensalo i saradnici (2012) su pokazali supresivnu ulogu MMP9 u karcinomu debelog creva, dok su Vilen i saradnici (2012) ukazali na različitu ulogu MMP9 u zavisnosti od stadijuma bolesti.

Što se tiče PTK, studije su pokazale povišenu ekspresiju MMP9 kod pacijenata u odnosu na zdrave ili one sa benignim promenama u štitastoj žlezdi, a takođe i višu ekspresiju u samom tumorskom tkivu u odnosu na susedno zdravo (Maeta i sar., 2001; Meng i sar., 2012; Marecko i sar., 2014; Bayadsi i sar., 2022). Na različitim kancerskim ćelijskim linijama tiroidee, Baldini i saradnici (2004) su našli povišenu aktivnost proteina MMP9. Ipak, u jednoj od prvih studija koje su izučavale MMP9 u tkivu štitaste žlezde, nivo MMP9 nije bio povišen u tumoru u odnosu na benigni adenom i zdravo tkivo (Nakamura i sar., 1999). U radu Marecko i saradnika iz 2014. je ispitivana ekspresija proteina MMP9 u tkivu štitaste žlezde i pokazana povišena ekspresija u tumorskom tkivu u odnosu na susedno netumorsko. U istoj studiji, pokazana je veza između aktivne, ali ne i ukupne forme MMP9 sa kliničkopatološkim parametrima koji su povezani sa agresivnim oblikom bolesti. Rezultate koji pokazuju vezu ekspresije MMP9 i agresivnog ponašanja tumora saopštile su i druge istraživačke grupe. Maeta i saradnici (2001) su pokazali korelaciju ekspresije MMP9 sa stepenom dubine infiltracije i prisustvom metastaza na limfnim čvorovima, dok je u studiji Meng i saradnika (2012) viša ekspresija MMP9 pokazana u tumorima većeg promera, više TNM kategorije i kod pacijenata starijih od 45 godina. Ipak, postoje i podaci koji nisu u saglasnosti sa navedenim. Bumber i saradnici (2020) nisu našli vezu između ekspresije MMP9 u tumorskom tkivu PTK sa kliničkopatološkim parametrima koji mogu ukazati na agresivan oblik bolesti, a sa tim se slažu i rezultati koje su dobili Ivković i saradnici u studiji iz 2022. godine.

1.6.1.3 Odabrani regulatori transkripcije MMP9 u kanceru

Regulacija ekspresije MMP9 se primarno odvija na transkripcionom nivou, pa promene sekvence u promotoru gena mogu imati uticaja na transkripciju i posledično na nivo proteina koji pak ima uticaja na sudbinu ćelije i njene okoline. Ovo je navelo istraživače da detaljnije ispituju funkcionalne polimorfizme u promotoru gena za MMP9.

Mnogobrojne studije su rađene kako bi se procenio uticaj polimorfizma -1562 C/T na povećan rizik od nastanka tumora ili na progresiju karcinoma. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju kontradiktorne rezultate kada se o ovom polimorfizmu govori kao o faktoru rizika za nastanak kancera ili prediktoru agresivnog ponašanja tumora. U studiji koju su izveli Wang i saradnici (2005), kao i Rollin sa saradnicima (2007) pokazano je da -1562 C/T polimorfizam u promotoru gena za MMP9 ne može biti faktor rizika za nesitnoćelijski kancer pluća, a takođe nije pokazana veza ovog polimorfizma sa kliničkopatološkim parametrima koji ukazuju na mogući loš ishod, kao što su veličina tumora, diferencijacija i metastaze na limfnim čvorovima. Rezultate koji povezuju -1562 C/T polimorfizam sa agresivnim fenotipskim karakteristikama tumora, pokazali su Matsumura i saradnici (2005) kod pacijenata sa kancerom želuca, gde su povezali prisustvo T alela sa stepenom invazije tumora, kategorijom i prisustvom metastaza na limfnim čvorovima. Schweigert i saradnici (2013) su pokazali vezu CC genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 sa višom stopom petogodišnjeg preživljavanja i generalno parametrima povezanim sa boljom prognozom. Rezultate suprotne tim, pokazali su Grieu i saradnici (2004) kada su prisustvo T alela povezali sa kliničkopatološkim parametrima koji su karakteristični za dobru prognozu bolesti. Sa ovime se slažu i rezultati studije koju su izveli Cotignola i saradnici (2007). U zanimljivoj studiji iz 2007. godine, u kohorti od 995 pacijenata sa malignim tumorom dojke i 952 kontrolnih slučajeva, pokazan je povećan rizik od bolesti kod TT homozigota, ali ne i efekat ovog genotipa na tok bolesti. Takođe, nije pronađena ni veza ovog polimorfizma sa veličinom tumora, statusom receptora

steroidnog hormona, prisustvom metastaza na limfnim čvorovima i diferencijacijom (Lei i sar., 2007).

Uticaj C/T polimorfizma na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 na progresiju bolesti kod pacijenata sa PTK ispitivali su Özgen i saradnici (2008). Oni nisu našli asocijaciju ovog polimorfizma sa kliničkopatološkim parametrima kao što su dubina invazije tumora, starost pacijenata, pol, metastaze na limfnim čvorovima, a isti rezultat prikazali su Dobrescu i saradnici u studiji iz 2022. godine.

Polimorfizam broja CA ponovaka u promotoru gena za MMP9 je povezan sa mnogim patološkim stanjima kao što su intrakranijalna aneurizma, multipla skleroza, hipertenzija (Peters i sar., 1999; Fiotti i sar., 2004; Lacchini i sar., 2010), ali ima malo podataka o njenoj vezi sa malignitetima. U melanomu, pokazana je bimodalna distribucija ovih ponovaka, ali nikakva druga veza nije nađena (Cotignola i sar., 2007). Nikakva asocijacija ovog polimorfizma nije nađena u studiji iz 2007, rađenoj na karcinomu debelog creva (Woo i sar., 2007).

Prekomerna ekspresija proteina c-Jun je pokazana u mnogim malignitetima. Szabo i saradnici su 1996. godine pokazali povišenu ekspresiju kod pacijenata sa kancerom pluća. Oni su pokazali pozitivno imunobojenje u histološki izmenjenim područjima pluća dok ekspresiju c-Jun nisu uspjeli detektovati u susednom, zdravom tkivu. Visok nivo proteina c-Jun je nađen u invazivnom tipu tumora dojke i povezan je sa proliferacijom i angiogenezom. U istoj studiji, korelacija je takođe nađena između ekspresije c-Jun i niže stope preživljavanja (Vleugel i sar., 2006). Pokazano je da prekomerna ekspresija ovog proteina u MCF-7 ćelijama (ćelijska linija kancera dojke) indukuje invazivni fenotip tumora (Smith i sar. 1999). U multicentričnoj analizi, Xu i saradnici (2017) su pokazali da je prekomerna ekspresija proteina c-Jun povezana sa lošijom prognozom kod pacijenata sa kancerom skvamoznih ćelija usne duplje, kao i da c-Jun može biti dobar prediktor visokog rizika od smrtnog ishoda kod ovih pacijenta. Eckhof i saradnici (2013) su pokazali da c-Jun može biti prediktor loše prognoze u kanceru dojke. O ulozi ovog transkripcionog faktora u PTK vrlo malo se zna. Veza c-Jun i početka PTK pokazana je bioinformatičkom analizom koju su izveli Chen i saradnici (2017), dok je eksperimentalno, prekomerna ekspresija proteina AP-1 u PTK pokazana u studiji Xiao i saradnika (2019). U ovoj studiji, povišena ekspresija je korelisala sa veličinom tumora dok sa ostalim parametrima agresivnosti PTK kao što su starost pacijenta, metastaze na limfnim čvorovima, multifokalnost i ekstratiroidna invazija nije nađena veza. U još jednoj studiji iz 2016. godine, pokazana je veza ekspresije proteina AP-1 sa veličinom tumora kod pacijenata sa PTK (Chen i sar., 2016). Na osnovu rezultata ovih studija, smatramo da bi bilo dobro detaljnije ispitati ulogu samog proteina c-Jun i njegove acetilovane forme u razvoju i progresiji PTK.

Rezultati dosadašnjih istraživanja otkrivaju da postoji još dosta pitanja bez odgovora o ulozi MMP9 u PTK, ali nam i ukazuju na potencijal ovog proteina kao biomarkera u prognostičkoj stratifikaciji pacijenata sa PTK. Takođe, podaci nas navode da istražimo uticaj regulatora ekspresije MMP9 u tkivu PTK, kao i njihov potencijal kao dodatnih biomarkera za PTK.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ove disertacije mogu se grupisati u biološke i kliničke. Iz biološke perspektive, cilj je bio da se razjasne uzroci i posledice deregulacije aktivnosti MMP9 u PTK kao jednog od ključnih enzima tumorske invazije. Iz kliničke perspektive, među uzročnicima ove deregulacije su traženi novi kandidatski biomarkeri koji bi mogli da ukažu na tok bolesti i budu od pomoći u pre- i postoperativnoj stratifikaciji pacijenata. Kako bi zadati ciljevi bili postignuti, ispitivana je arhitektura dela promotora gena za MMP9 kao i prisustvo transkripcionih faktora koji utiču na modulaciju nivoa ekspresije ovog proteina, a zatim i njegovu *in situ* želatinolitičku aktivnost.

U skladu sa tim, postavljeni su neposredni ciljevi disertacije:

1. Ispitivanje faktora koji su mogući uzročnici deregulacije ekspresije MMP9:
 - a) Ispitivanje prisustva nukleotidne tranzicije C u T na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 i njene veze sa ekspresijom MMP9 na nivou iRNK i proteina i sa nepovoljnim tokom PTK;
 - b) Ispitivanje prisustva varijacija u broju CA tandemskih ponovaka koji počinju na poziciji -131 promotora gena za MMP9, njihove povezanosti sa proteinskom ekspresijom MMP9 i nepovoljnim tokom PTK;
 - c) Ispitivanje povezanosti imunoekspresije transkripcionog faktora c-Jun i njegove forme acetilovane na Lys271 sa ekspresijom MMP9 na nivou iRNK i proteina, kao i nepovoljnim kliničkopatološkim faktorima PTK;
2. Ispitivanje imunoekspresije MMP9 u uzorcima PTK i njene korelacije sa kliničkopatološkim faktorima koji su povezani sa agresivnim oblikom bolesti;
3. Ispitivanje *in situ* enzimske aktivnosti MMP9 u relaciji sa kliničkopatološkim faktorima PTK.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Prikupljanje i obrada uzoraka

U ovoj disertaciji korišćeni su uzorci tkiva štitaste žlezde pacijenata koji su podvrgnuti rutinskoj operaciji, neophodnoj za njihovo lečenje, na Klinici za endokrinu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS). Uzorci iz 2000-2019. godine pripadaju arhivskom materijalu, dok su uzorci svežeg tkiva dobijeni između 2019. i 2021. godine koje je dalje obrađeno na kasnije opisan način, uz saglasnost učesnika za korišćenje biološkog materijala u istraživačke svrhe. Kako bi se osigurala zaštita privatnosti pacijenata, svi uzorci su pseudominizirani pre nego što su korišćeni u istraživanju. Studija je sprovedena uz poštovanje etičkih smernica i odobrenje Etičkog odbora UKCS (br. 140/17 i 695/7 - B).

Ispitivana kohorta se sastojala od 137 uzoraka PTK, od toga:

- 71 uzorak klasične varijante
- 57 uzoraka folikularne varijante
- 9 uzoraka mešovite histološke varijante.

Kontrolnu grupu je činilo 49 uzoraka uslovno zdravog tiroidnog tkiva hirurški odstranjenog tokom tiroidektomije pacijenata obolelih od PTK. Kako bi se izbegla međusobna kontaminacija tumorskog i zdravog tkiva, zdravo tkivo je resekovano sa mesta što udaljenijeg od mesta tumora, po mogućnosti sa kontralateralnog lobusa.

Uzorci resekovanog tkiva su tretirani na dva načina u cilju dve odvojene grupe eksperimenata:

1. Uzorci svežeg tkiva

Deo tumorskog tkiva svakog pacijenta je odmah nakon operacije zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -80°C do upotrebe. Pored tumorskog, odstranjen je i deo uslovno zdravog tkiva na način koji je opisan ranije.

2. Arhivski materijal

U službi za patohistologiju UKCS, deo operativno resekovanog tkiva je fiksiran na jedan od dva različita načina i ukalupljen u parafinu.

- Standardno fiksiranje u formalinu je korišćeno u svrhe imunohistohemije i izolacije DNK.
- S obzirom na to da fiksiranje formalinom unakrsno povezuje (engl. *cross-linking*) aktivne funkcionalne grupe proteina i time onemogućava enzimsku aktivnost, u svrhe zimografije *in situ* korišćen je etanol koji fiksira tkivo precipitacijom.

Svi dobijeni kalupi su se dalje sekli na preseke debljine $5\ \mu\text{m}$ koji su nanošeni na mikroskopske pločice i koristili su se za dalje analize.

Na osnovu pregleda arhivskog materijala, patolog je u skladu sa kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (IARC, 2017) obavio patohistološku analizu i utvrdio dijagnozu PTK. Za svakog pacijenta prikupljeni su podaci iz istorije bolesti i protokola lečenja: starost, pol, patohistološka klasifikacija tumora, prisustvo metastaza, kliničkopatološki stadijum bolesti i drugo.

Kako bi se pacijenti stratifikovali po težini bolesti, korišćene su dve klasifikacije:

1. TNM klasifikacija usvojena od strane AJCC opisana u poglavlju 1.3. (Edge i sar., 2010)

Za potrebe ove studije tumori T statusa T1 i T2, kao i svi pacijenti TNM kategorija I i II su grupisani zajedno kao manje agresivni tumori dok su tumori T statusa T3 i T4 i pacijenti TNM III i TNM IV kategorija svrstani u grupu koja je predstavljala agresivnije tumore.

2. Klasifikacija na osnovu stepena dubine neoplastične infiltracije

Stepen dubine neoplastične infiltracije je parametar koji predstavlja stepen invazije tumora u okolno tkivo i određen je po kriterijumima koje su postavili Basolo i saradnici (2010). Tumori su kategorisani u sledeće grupe:

- 1 – potpuno inkapsulirani tumori sa intaktnom tumorskom kapsulom;
- 2 – nekapsulirani tumori ili tumori sa invazijom tumorske kapsule ali bez invazije kaspule štitaste žlezde;
- 3 – tumori sa invazijom kapsule štitaste žlezde;
- 4 – tumori koji probijaju kapsulu štitaste žlezde odnosno tumori sa ekstratiroidnom invazijom.

Za potrebe ove studije tumori stepena 1 i 2 su svrstani u grupu koja je označavala tumore sa manje agresivnim potencijalom, dok su tumori stepena 3 i 4 svrstani u grupu koja je označavala agresivnije tumore.

3.2 Izolacija DNK

Kako bi se dostigao što veći broj genotipiziranih uzoraka, DNK je izolovana na dva načina:

1. Iz svežeg tkiva DNK je izolovana Trizol reagensom (Ambion, SAD), po uputstvu proizvođača uz male modifikacije. Ukratko, u 0,1 g tkiva je dodato 400 μ l Trizola nakon čega je usledila homogenizacija tkiva u homogenizeru (Quiagen, Nemačka) 5 min na 20 Hz. Dodato je 80 μ l hloroforma i nakon kratke inkubacije, uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 x g na 4 °C čime su razdvojene organska, međufaza i vodena faza. Vodena faza je odvojena za izolaciju RNK, dok je za izolovanje DNK, u organsku i međufazu dodato 120 μ l etanola. Nakon inkubacije od 3 min, uzorci su centrifugirani 5 min na 2000 x g na temperaturi od 4 °C. Zatim je supernatant odbačen, a pelet je ispran 3 puta po 30 min inkubacijom 0,1 M natrijum-citrata u 10% etanolu ukupne zapremine 400 μ l. Nakon svakog ispiranja, uzorak je centrifugiran 5 min na 2000 x g na 4 °C, nakon čega je odbačen supernatant. Usledila je inkubacija od 20 min sa 800 μ l 75% etanola, a zatim centrifugiranje 5 min na 2000 x g na 4 °C. Nakon što je odbačen supernatant, pelet je osušen na sobnoj temperaturi i rastvoren u vodi inkubacijom preko noći na 4 °C.

2. Iz parafinskih kalupa DNK je izolovana uz pomoć komercijalno dostupnog Recover All Nucleid Acid kompleta (Ambion, SAD) po uputstvu proizvođača. Delovi debljine približno 20 μ m su sečeni iz parafinskih kalupa nakon čega su deparafinizovani inkubacijom u 1 ml ksilola 2 puta po 15 min na 50 °C. Nakon toga tkivo je isprano od ksilola 2 puta po 5 min inkubacijom u 1 ml 100% etanola, a zatim centrifugirano 2 minuta na maksimalnoj brzini. Nakon odbacivanja supernatanta, uzorci su ostavljeni da se suše na vazduhu kako bi se u potpunosti otklonio etanol. Dodata je smeša 200 μ l pufera za digestiju i 4 μ l proteaze po uzorku i usledila je inkubacija preko noći na 50 °C kako bi se uklonili proteini kovalentno vezani za DNK. Nakon toga, uzorcima je dodata smeša aditiva za izolaciju i 100% etanola u ukupnoj zapremini 395 μ l i uzorci su centrifugirani na 10000 x g tokom čega je supernatant propušten kroz filtere od silikata koji vezuju DNK. Ti filteri su zatim isprani sa reagensima Wash1 (700 μ l) i Wash 2/3 (500 μ l) koji se dobijaju u kompletu, a zatim je dodata RNaza uz inkubaciju od 30 min na sobnoj temperaturi. Usledilo je ponovno ispiranje sa Wash1 i Wash 2/3 reagensima nakon čega je DNK eluirana vodom temperature 95 °C.

Svi uzorci DNK su čuvani na temperaturi od -80 °C do dalje upotrebe.

3.3 Izolacija RNK

RNK je izolovana iz svežeg tkiva Trizol reagensom. Prvi koraci izolacije su identični za nukleinske kiseline do trenutka razdvajanja faza na organsku, međufazu i vodenu fazu. Vodena faza je odvojena za izolaciju RNK. Dodato je 4 μ l glikogena i 200 μ l izopropanola. Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi, smeša je stavljena 10 min na centrifugu na 12000 x g na 4 °C. Odbačen je supernatant i pelet je ispran sa 400 μ l 75% etanola. Nakon centrifugiranja u trajanju od 5 min na 7500 x g na 4 °C, supernatant je odbačen i pelet je ostavljen da se suši nakon čega je rastvoren u vodi tretiranoj dietil-pirokarbonatom (DEPC) na 55 °C inkubacijom od 15 min. Koncentracija ukupne RNK je određena na spektrofotometru i uzorci su čuvani na temperaturi od -80 °C do upotrebe.

3.4 PCR

Genotipizacija SNP -1562 C/T i (CA)_n ponovaka rađena je metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) na aparatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD). Izolovana DNK (100 ng) je dodata u reakcionu smešu koja je sadržala 1x AmpliTaq puffer (Thermo Fisher Scientific, SAD), dNTPs (Thermo Fisher Scientific, SAD), vodeći i reverzni prajmer (Invitrogen,

Thermo Fisher Scientific, SAD) i Taq polimerazu (Thermo Fisher Scientific, SAD), u ukupnoj zapremini od 25 μ l.

Prajmeri korišćeni u reakciji su bili:

-1562 C/T

Vodeći 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3'

Reverzni 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'

(CA)_n

Vodeći 5'-GACTTGGCAGTGGAGACTGCGGGC A-3'

Reverzni 5'-GACCCACCCCTCCTTGACAGGCAA-3'

Reakcija je rađena pod sledećim uslovima:

1. Za -1562 C/T: inicijalna denaturacija na 95 °C u trajanju od 3 min, zatim 35 ciklusa na temperaturama 95 °C, 57 °C, 72 °C, svaki po 30 s, nakon čega je usledila finalna elongacija na 72 °C (7 min) i hlađenje na 4 °C.
2. Za (CA)_n: inicijalna denaturacija na 95 °C u trajanju od 3 min, zatim 35 ciklusa na temperaturama 95 °C, 60 °C, 72 °C, svaki po 30 s, nakon čega je usledila finalna elongacija na 72 °C (7 min) i hlađenje na 4 °C.

3.5 RFLP

PCR produkti dugi 436 bp su digestirani restriktionim enzimom PaeI (Thermo Fisher Scientific, SAD), na 37 °C preko noći. Ovaj enzim seče fragmente dužine 248 i 188 bp u slučaju T alela, dok u slučaju C alela, produkt ostaje nedigestiran. PCR produkti su razdvojeni elektroforetskim razdvajanjem na 2% agaroznom gelu koji je sadržao fluorescentnu boju SYBR SAFE (Applied Biosystems, SAD) koja se kao interkalirajući agens vezuje za DNK. Uzorci su dalje analizirani pod UV svetlom na aparatu transiluminator (Vilber Lourmat, Nemačka).

3.6 Analiza polimorfizma broja tandemskih ponovaka

PCR produkti su razdvojeni elektroforetskim razdvajanjem na 12% poliakrilamidnom gelu koji sadrži ureu kao redukujući agens uz bojenje srebrom po metodi koju su opisali Byun i saradnici (2009). Ukratko, gel je fiksiran i obojen u rastvoru koji sadrži 10% etanola, 0,5% sirćetne kiseline i 0,3% srebro-nitrata inkubacijom u trajanju od 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Gel je zatim ispran 3 puta po 10 s u destilovanoj vodi. Usledilo je razvijanje boje rastvorom zagrejanim na 55 °C koji sadrži 3% natrijum hidroksida i 0,1% formaldehida i gel je inkubiran u razvijaju do pojave traka.

Po literaturi (CA)_n ponovci imaju binomnu raspodelu, sa prvim pikom na 14 ponovaka i drugim pikom na 21. Za potrebe ove studije, kao standard korišćen je uzorak DNK iste dužine kao što je PCR produkt koji ima 17 CA ponovaka i uzorci su razdvajani na uzorke koji imaju manje ili više od 17 ponovaka.

3.7 Reverzna transkripcija i kvantitativna PCR

3.7.1 Reverzna transkripcija (RT)

Za reakciju reverzne transkripcije korišćen je približno 1 μ g RNK rastvorene u vodi tretiranoj sa DEPC. RNK templat je dodato 0,2 μ g nasumičnih heksamernih prajmera (Thermo Fisher Scientific, SAD) i 1 mM dNTP nukleotida. Nakon inkubacije ove smeše 5 min na 70 °C, dodato je 4 μ l reakcionog pufera (Thermo Fisher Scientific, SAD) i 200 jedinica enzima reverzne transkriptaze (Thermo Fisher Scientific, SAD). Reakcija je nastavljena u uslovima: 25 °C 15 min, 42 °C 60 min, 70 °C 15 min i na kraju 4 °C 5 min.

3.7.2 Kvantitativna PCR (qPCR)

Metoda qPCR je upotrebljena za merenje nivoa ekspresije gena za MMP9 u tumorskom i udaljenom zdravom tkivu tiroidee. U 5 μ l 2x SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, SAD) dodato je po 4 μ l specifičnih prajmera i 1 μ l cDNK templata dobijenog metodom reverzne transkripcije čime je dobijena reakciona smeša. Kvantitativna PCR analiza urađena je na aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Kao endogena kontrola korišćen je gen za gliceraldehyd-3-fosfat hidrogenazu (GAPDH).

Sekvence prajmera su sledeće:

MMP9

Vodeći 5'-GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC-3'

Reverzni 5'-CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT-3'

GAPDH

Vodeći 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'

Reverzni 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

Reakcija umnožavanja je urađena po sledećem programu: 95 °C 10 min, zatim 40 ciklusa od 15 s na 95 °C i 1 min na 60 °C.

Pri svakom eksperimentu, korišćena je *interrun* kontrola koju je predstavljao jedan isti uzorak koji je davao pozitivan rezultat, kako bi se mogli uporediti rezultati različitih eksperimenata. Reakcije su rađene za svaki analizirani gen u duplikatu po uzorku.

Ekspresija gena GAPDH korišćena je za normalizaciju količine cDNK u qPCR reakcijama.

Relativni nivo ekspresije gena određen je komparativnom 2^{-ddct} metodom. Kako bi se dobila normalna raspodela, svi podaci su logaritmovani, a zatim takvi korišćeni za dalje statističke analize.

3.8 Imunohistohemija

Imunohistohemijsko bojenje je rađeno na parafinskim presecima tkiva fiksiranog u formalinu debljine 5 μ m u cilju analize ekspresije MMP9, c-Jun i njegove modifikovane forme acetilovane na Lys271. Tkivni preseki naneti na mikroskopske pločice su prvo deparafinizovani u ksilolu 15 min, a zatim su rehidratirani serijom etanola opadajuće koncentracije. Aktivnost endogene peroksidaze je dalje blokirana inkubacijom od 30 min u 0,3% H₂O₂ u 100% etanolu, nakon čega je usledilo ispiranje u 70% etanolu i fiziološkom rastvoru puferisanom fosfatom (engl. *phosphate buffered saline* - PBS). Nespecifično vezivanje je inhibirano inkubacijom u normalnom konjskom serumu (engl. *normal horse serum*, (Vector Laboratories Inc, UK)), nakon čega su uzorci inkubirani sa primarnim antitelima preko noći na 4 °C. Primarna antitela i njihova razblaženja data su u **Tabeli 1**. Da bi se proverila specifičnost signala, analizirani su kontrolni preseki svakog uzorka koji su inkubirani u PBS umesto primarnog antitela, a dalje je postupak bio identičan. Sledećeg dana eksperimenta, uzorci su, nakon ispiranja u PBS, inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi sa sekundarnim biotinizovanim antitelima (pregled dat u **Tabeli 2**), a zatim nakon ispiranja u PBS, još 30 min sa ABC reagensom (ABC: Vectastain Avidin-biotin complex kit (Vector Laboratories, SAD)). Usledilo je ispiranje u PBS 3 puta po 5 min, a zatim vizualizacija sa DAB reagensom (DAB: 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride kit, Peroxidase Substrate Kit; (Vector Laboratories, SAD)) koji sadrži 3,3'-diaminobenzidin kao supstrat za peroksidazu. Nakon ispiranja česmenskom vodom, preseki su bojeni kontrastnom bojom hematoksilinom (Vector Laboratories Inc, UK) do pojave plave boje a zatim opet isprani česmenskom vodom. Preseki su postepeno dehidratirani inkubacijom u 70% etanolu, 100% etanolu i ksilolu a zatim su montirani kanada balzomom i analizirani pod svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss Axio Imager 1.0 sa Canon A640 digitalnom kamerom (Carl Zeiss, Nemačka)).

Kako bi se obezbedilo što tačnije i nepristrasno ocenjivanje, svaki presek su analizirala dva istraživača, nezavisno jedan od drugog, koji nisu imali prethodno znanje o patohistološkom nalazu tog pacijenta. Bojenje je ocenjivano prema prisustvu i intezitetu bojenja na sledeći način:

0 - Odsustvo bojenja;

- 1 - Slabo difuzno ili fokalno bojenje (do 40%) tumorskih ćelija;
- 2 - Umereno bojenje u više od 40% tumorskih ćelija;
- 3 – Snažno difuzno bojenje u većini tumorskih ćelija.

Za potrebe ove studije, uzorci sa ocenama 0 i 1 su grupisani zajedno u grupu koja je označavala uzorke sa niskom ekspresijom proteina, dok su uzorci ocenjeni sa 2 i 3 spojeni u grupu koja je označavala uzorke sa visokom ekspresijom proteina.

Tabela 3.1. Primarna antitela korišćena u istraživanju

Antigen	Antitelo	Kataloški broj i proizvođač	Razblaženje
MMP9	Mišje monoklonsko	MA5-14228 Invitrogen, SAD	1:50
c-Jun	Mišje monoklonsko	sc-74543 Santa Cruz Biotechnology Inc, SAD	1:100
ac c-Jun (K271)	Zečje poliklonsko	CSB-PA000151 Cusabio, SAD	1:50

Tabela 3.2. Sekundarna antitela korišćena u istraživanju

Sekundarno antitelo	Proizvođač	Razblaženje
Biotinizovano kozje antimišje IgG antitelo	Vector Laboratories, UK	1:200
Biotinizovano kozje antizečje IgG antitelo	Vector Laboratories, UK	1:200

3.9 Zimografija *in situ*

Zimografija *in situ* je rađena po metodi koju su preporučili Hadler-Olsen i saradnici (2010). Uzorci su fiksirani u etanolu kako bi se očuvala enzimsko aktivnost i zatim ukalupljeni u parafin. Tkivni preseki su deparafinizovani u ksilolu a zatim rehidratirani serijom razblaženja etanola od 100-70%. Nakon što su isprani 3 puta po 5 min u PBS, presecima je kao supstrat dodat DQ želatin (engl. *dye-quenched*; želatin iz svinjske kože konjugovan sa fluoresceinom (Molecular Probes, SAD)) rastvoren u renaturacionom puferu. Takvi preseki su inkubirani 2 h na 37 °C u mračnoj, vlažnoj komori. Renaturacioni pufer je u svom sastavu sadržao ARP-100 (selektivni inhibitor MMP2, Santa Cruz Biotechnologies, SAD) u koncentraciji od 13,7 nM/l kojim se inhibira MMP2 ali ne i MMP9 kako bi se obezbedilo da enzimsko aktivnost potiče od MMP9. Pored toga, za svaki uzorak, rađene su i dve kontrole. Za kontrolu autofluorescence, preseki su inkubirani sa supstratom 2 h na -20 °C kako bi se zaustavila aktivnost svih enzima. Sav detektovani signal u ovom slučaju potiče od autofluorescence tkiva i reagenasa. Da bi se potvrdilo da signal ne dolazi od aktivnosti nekih drugih želatinolitičkih enzima, kontrolni preseki su inkubirani 1 h sa etilendiamintetra sirćetnom kiselinom (EDTA) koja blokira dejstvo metaloproteinaza, pa u tom slučaju detektovani signal dolazi od enzima koji nisu matriksne metaloproteinaze a koji seku želatin. Nakon inkubacije sa supstratom, mikroskopske pločice sa presecima, isprane su 2 puta u PBS, a zatim fiksirane sa NBF (engl. *neutral buffered formaline*). Kao kontrastna boja, korišćen je DAPI u glicerolu (4',6'-diamidino-2-fenilindol (Merck Millipore, SAD)) koji boji jedra plavom bojom, a kako njegov intezitet ne zavisi od aktivnosti enzima, predstavljao je i internu kontrolu bojenja.

Preseki su analizirani pod fluorescentnim mikroskopom (Carl Zeiss Axio Imager.A1 sa AxioCam MRm kamerom (Carl Zeiss, Nemačka)) gde se gledao intezitet zelene fluorescence na mračnoj pozadini što je označavalo mesta delovanja enzima, i ocenjivani su arbitrarno prema intezitetu bojenja kao jako obojeni i slabo obojeni.

3.10 Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka urađena je u programu SSPS 12.0.1 za Windows (SPSS Inc, SAD). Vrednost $p < 0.05$ je uzimana kao statistički značajna za sva poređenja. X^2 ili Fisher-ov test tačne verovatnoće, u zavisnosti od broja slučajeva, je korišćen za proveru postojanja asocijacije između genotipova i imunoekspresije ispitivanih parametara kao i njihove asocijacije sa kliničkopatološkim parametrima. Spearman korelacioni test je korišćen za proveru postojanja veze između ispitivanih parametara i veličine tumora. Studentov t test je korišćen za analizu razlika između logaritmovanih vrednosti stepena promene genske ekspresije. Za vizualizaciju rezultata korišćen je GraphPad Prism 8.0. (Dotmatics, SAD).

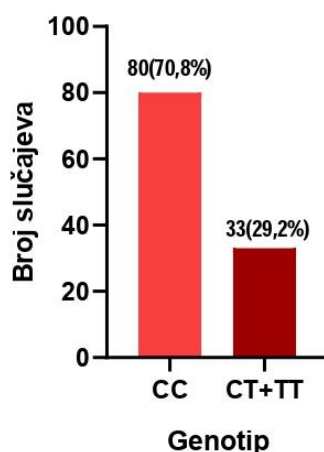
4 REZULTATI

4.1 Ispitivanje odabranih faktora koji su mogući uzročnici deregulacije ekspresije MMP9

U prvom delu istraživanja analizirani su faktori koji mogu uticati na transkripciju *MMP9* a time moguće i na nivo ekspresije proteina MMP9. Izabrani faktori su dva polimorfizma u promotoru gena za MMP9: -1562 C/T i -131 (CA)_n; i transkripcioni faktori c-Jun i njegova forma acetilovana na Lys271.

4.1.1 Prisustvo tranzicije C/T na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9

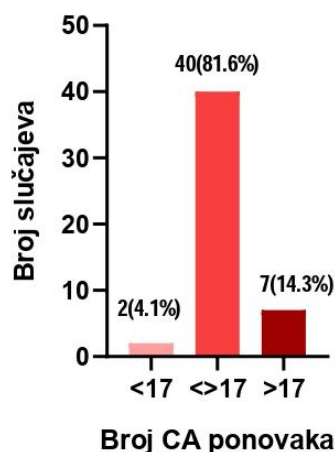
Genotipizacija -1562 C/T polimorfizma urađena je metodom PCR-RFLP na 113 uzoraka PTK. Na **Histogramu 4.1.** prikazana je zastupljenost genotipova na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9. CC genotip na poziciji -1562 imalo je 80 uzoraka (70,8%) dok je heterozigota bilo 31 (27,4%). U ovoj seriji, samo dva uzorka su imala recesivni genotip TT te su za potrebe ovog istraživanja ti uzorci pripojeni CT uzorcima čime je nastala grupa nosilaca T alela (CT+TT) sa udelom od 33 (29,2%) u ukupnom broju uzoraka naspram grupe CC.



Histogram 4.1. Zastupljenost genotipova na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 kod pacijenata sa PTK

4.1.2 Prisustvo varijacija u broju CA ponovaka koji počinju na poziciji -131 promotora gena za MMP9

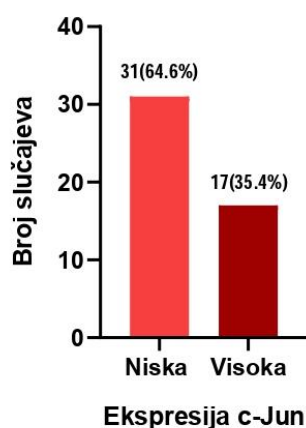
Broj -131 (CA)_n ponovaka određen je PCR metodom uz vizualizaciju srebrom na 12% poliakrilamidnom gelu na 49 uzoraka. Nakon poređenja dobijenih PCR produkata sa fragmentom DNK iste dužine kao uzorak sa 17 CA ponovaka, razdvajani su na uzorke koji imaju manje ili više od 17 ponovaka na oba alela kao i heterozigote koji na jednom alelu imaju manje, a na drugom alelu više od 17 ponovaka. Na **Histogramu 4.2.** može se videti da je čak 40 (81,6%) uzoraka heterozigotno, dakle nosioci jedne kopije sa malim brojem ponovaka (<17 CA ponovaka) i jedne kopije sa velikim brojem ponovaka (>17 CA ponovaka). Od preostalih uzoraka, dva (4,1%) uzorka su homozigoti sa oba alela kraća od 17 ponovaka dok 14,3% odnosno sedam uzoraka ima na oba alela broj ponovaka veći od 17. Usled ovakve distribucije ponovaka, onemogućena je statistička obrada te je ovaj polimorfizam isključen iz dalje analize.



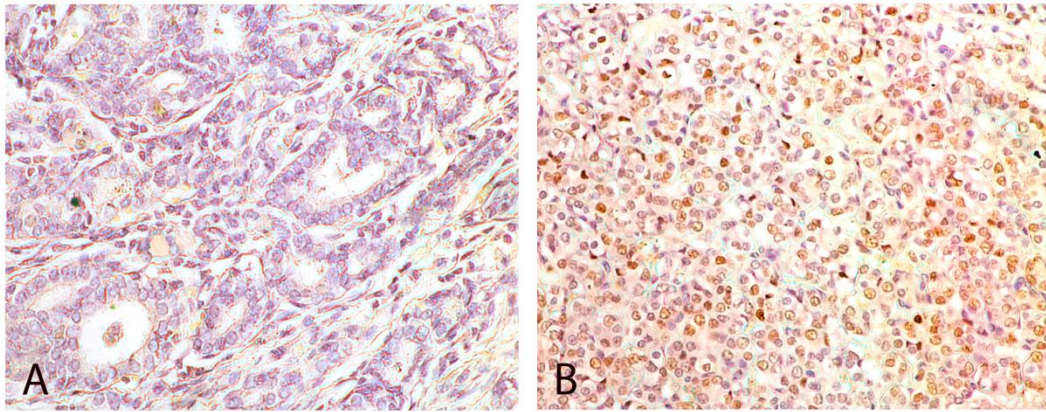
Histogram 4.2. Zastupljenost uzoraka sa različitim brojem CA ponovaka u promotoru gena za MMP9 počev od mesta -131 u uzorcima pacijenata sa PTK nakon uvođenja *cutoff* na 17 ponovaka

4.1.3 Analiza nivoa ekspresije transkripcionog faktora c-Jun i njegove forme modifikovane acetilacijom na Lys271

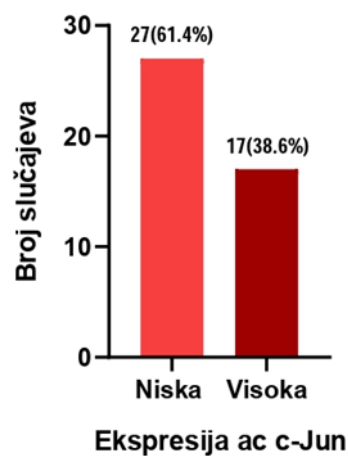
U ovom delu studije analizirana je imunohistohemijaska ekspresija transkripcionog faktora c-Jun na 48 uzoraka i njegove forme acetilovane na Lys271 na 44 uzorka PTK. Značajan broj uzoraka dobio je visoku ocenu obojenosti za c-Jun, što se može videti na **Histogramu 4.3**. Uzorke sa niskom ekspresijom proteina činio je 31 uzorak odnosno 64,6% uzoraka, dok je grupu sa visokom ekspresijom c-Jun činilo 17 tj. 35,4% uzoraka. Na **Slici 4.1**. prikazane su reprezentativne mikrografije imunobojenja c-Jun u uzorcima tkiva pacijenata sa PTK koji po ocenjenom intenzitetu imunobojenja pripadaju grupi niskog intenziteta (**Slika 4.1.A.**) i visokog intenziteta bojenja (**Slika 4.1.B.**). Na **Histogramu 4.4**. predstavljena je zastupljenost različitih imunohistohemijaskih bojenja za formu proteina c-Jun acetilovanog na Lys271. Nisku ocenu obojenosti imalo je 27 (61,4%) uzoraka dok je grupu uzoraka sa visokom ekspresijom činilo 17 uzoraka tj. 38,6% slučajeva. Na **Slici 4.2**. su prikazane reprezentativne mikrografije imunobojenja acetilovanog c-Jun u uzorcima tkiva pacijenata sa PTK koji po ocenjenom intenzitetu imunobojenja pripadaju grupi niskog (**Slika 4.2.A.**) i visokog inteziteta bojenja (**Slika 4.2.B.**).



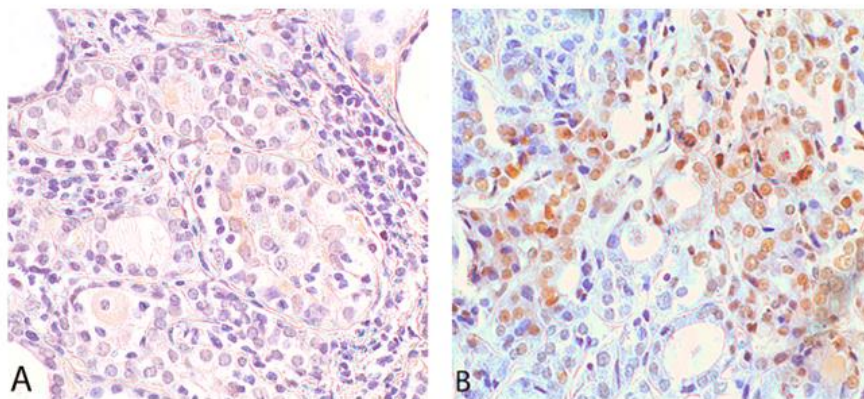
Histogram 4.3. Zastupljenost različito ocenjenih imunohistohemijaskih bojenja c-Jun u uzorcima pacijenata sa PTK



Slika 4.1. Reprezentativne mikrografije imunobojenja c-Jun u uzorcima tkiva PTK: **4.1.A** uzorak niskog intenziteta imunobojenja; **4.1.B.** uzorak visokog intenziteta imunobojenja. Uvećanje x10



Histogram 4.4. Zastupljenost različito ocenjenih imunohistochemijskih bojenja c-Jun acetilovanog na Lys271 u uzorcima pacijenata sa PTK



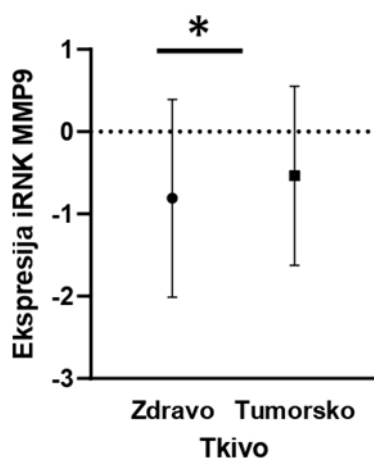
Slika 4.2. Reprezentativne mikrografije imunobojenja c-Jun acetilovanog na Lys271 u uzorcima tkiva PTK: **4.2.A.** uzorak niskog intenziteta imunobojenja; **4.2.B.** uzorak visokog intenziteta imunobojenja. Uvećanje x20

4.2 Analiza nivoa ekspresije MMP9

U ovom delu istraživanja određen je nivo ekspresije MMP9 na nivou iRNK i proteina. Ova analiza je bila potrebna za dalje ispitivanje uticaja prethodno analiziranih faktora na ekspresiju MMP9.

4.2.1 Ekspresija MMP9 na nivou iRNK i proteina u tumorskom i uslovno zdravom tkivu štitaste žlezde

Analizirano je 49 uzoraka tumorskog i pripadajućeg zdravog tkiva kako bi se videlo da li postoji razlika u ekspresiji MMP9 na nivou iRNK i rezultati su prikazani na **Grafiku 4.1.** u vidu srednjih vrednosti stepena promene genske ekspresije i njihovih standardnih devijacija. Statistički značajno viša ekspresija je pokazana u malignom tkivu u poređenju sa njegovim pripadajućim zdravim tkivom ($p=0,001$).

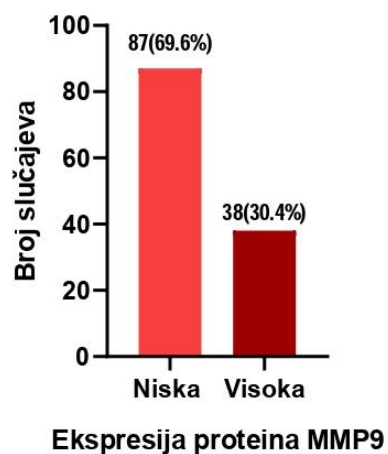


Grafik 4.1. Relativna ekspresija *MMP9* na nivou iRNK u malignom i susednom uslovno zdravom tkivu štitaste žlezde; * $p<0,05$

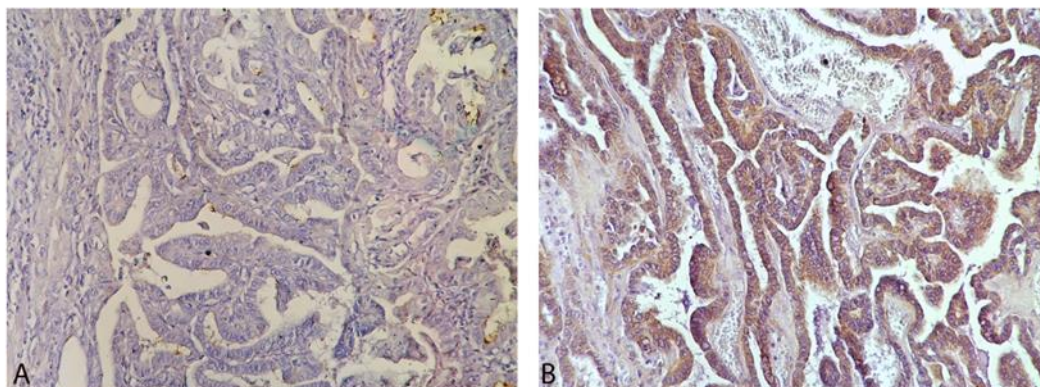
4.2.2 Ekspresija proteina MMP9 u malignom tiroidnom tkivu

Nivo ekspresije MMP9 određen je metodom imunohistohemije na 125 uzoraka malignog tkiva uz korišćenje monoklonskog antitela specifičnog za ukupnu (latentnu i aktivnu) formu MMP9. Zastupljenost različitog imunohistohemijskog bojenja MMP9 u uzorcima malignog tkiva prikazana je na **Histogramu 4.5.** Odsustvo bojenja ili slabo difuzno ili fokalno bojenje u do 40% tumorskih ćelija pokazalo je 87 uzoraka odnosno 69,6% ukupnog broja analiziranih uzoraka i pripali su grupi niskog intenziteta bojenja. Grupu visokog intenziteta bojenja činili su uzorci koji su pokazali umereno bojenje u više od 40% tumorskih ćelija ili snažno difuzno bojenje u većini tumorskih ćelija i ta grupa je imala 38 članova tj. 30,4% ukupnog broja uzoraka. Na **Slici 4.3.** su prikazane reprezentativne mikrografije imunobojenja acetilovanog c-Jun u uzorcima tkiva pacijenata sa PTK koji po ocenjenom intenzitetu imunobojenja pripadaju grupi niskog intenziteta (**Slika 4.3.A.**) i visokog intenziteta bojenja (**Slika 4.3.B.**).

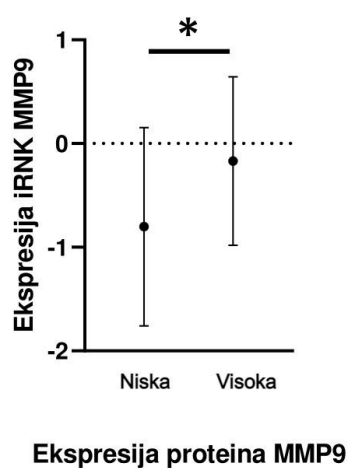
Kako je u ovom istraživanju reč o MMP9 kao potencijalnom prognostičkom markeru u PTK kod čoveka, ispitana je ekspresija MMP9 na nivou iRNK i proteinskom nivou u tumorskom tkivu i pokazano je da pacijenti sa PTK sa visokom ekspresijom proteina MMP9 imaju i višu ekspresiju iRNK MMP9 i obrnuto. Ove razlike su prikazane na **Grafiku 4.2.** i bile su statistički značajne sa p vrednošću od 0,048.



Histogram 4.5. Zastupljenost različitih ocena imunohistohemijskog bojenja ukupne forme MMP9 u uzorcima pacijenata sa PTK



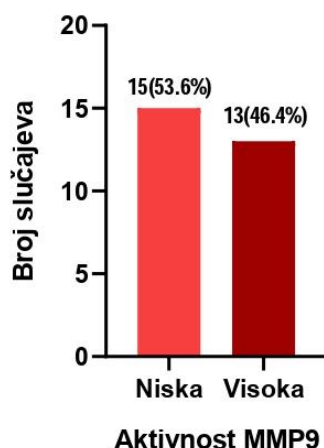
Slika 4.3. Reprezentativne mikrografije imunobojenja MMP9 u uzorcima tkiva PTK: **A.** uzorak niskog intenziteta imunobojenja; **B.** uzorak visokog intenziteta imunobojenja. Uvećanje x10



Grafik 4.2. Relativna ekspresija iRNK MMP9 u grupama sa niskom i visokom imunoekspresijom proteina MMP9 kod pacijenata sa PTK; * $p < 0.05$

4.3 Utvrđivanje nivoa enzimske aktivnosti MMP9 u tumorskom tkivu pacijenata sa PTK

Aktivnost MMP9 analizirana je na uzorku od 28 papilarnih tiroidnih karcinoma metodom *in situ* zimografije. Nakon analize inteziteta fluorescence, uzorci su klasifikovani u dve kategorije: nizak i visok intezitet fluorescence odnosno nizak i visok nivo enzimske aktivnosti MMP9 i kao takvi su korišćeni u daljim analizama. Na **Histogramu 4.6.** su prikazani rezultati gde se vidi da 53,6% (15/28) uzoraka ima nisku aktivnost MMP9, dok 13 tj. 46,6% od ukupnog broja uzoraka ima visoku aktivnost MMP9.



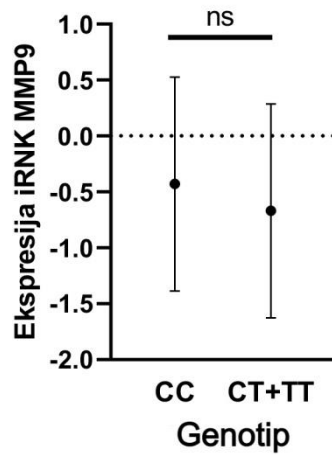
Histogram 4.6. Zastupljenost uzoraka sa niskim i visokim nivoom enzimske aktivnosti MMP9 kod pacijenata sa PTK

4.4 Ispitivanje uticaja odabranih faktora na ekspresiju MMP9

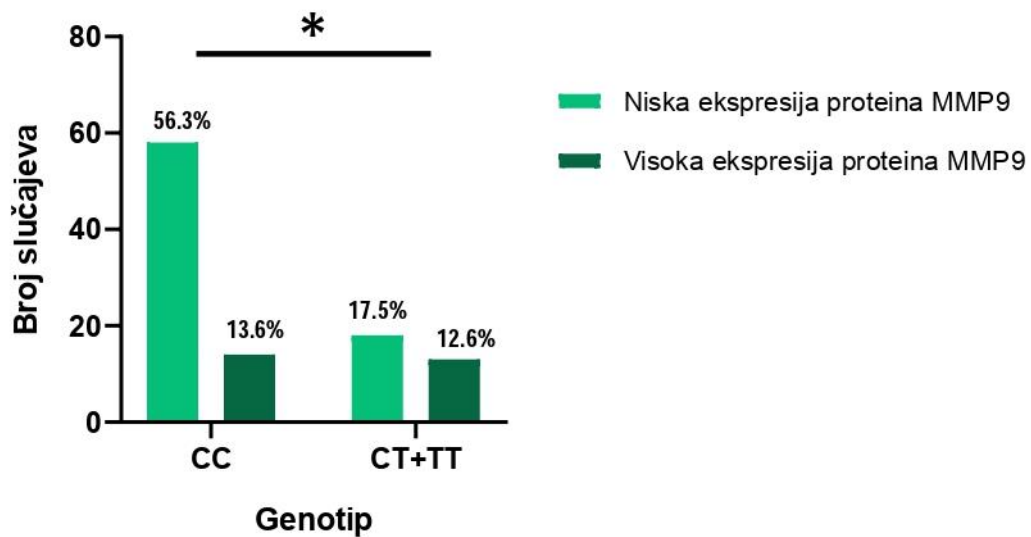
U ovom delu studije analizirana je povezanost polimorfizma -1562 C/T, transkripcionog faktora c-Jun i njegove forme modifikovane acetilacijom na Lys271 sa ekspresijom MMP9 u uzorcima PTK.

4.4.1 Povezanost polimorfizma -1562 C/T sa ekspresijom MMP9 na nivou iRNK i proteina

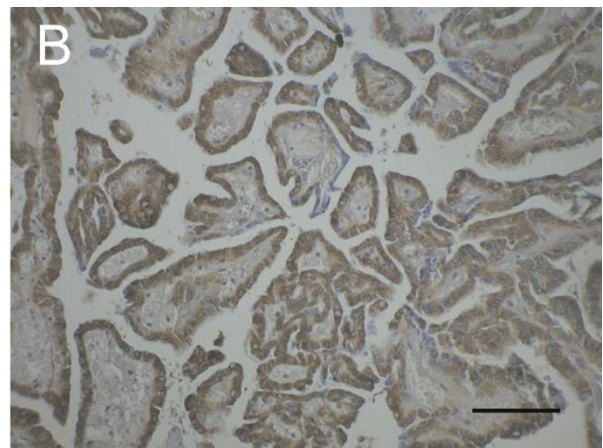
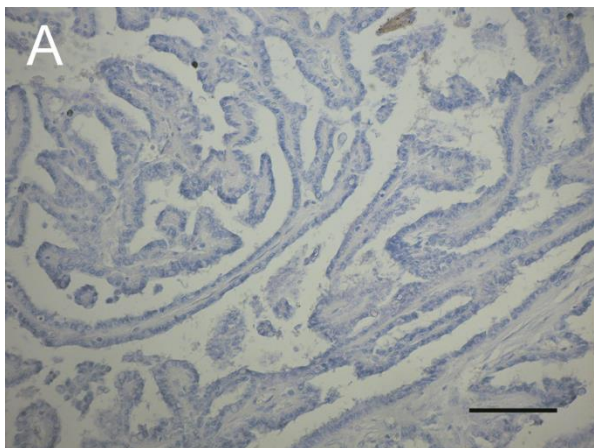
Analizirano je da li određeni genotip na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 utiče na ekspresiju MMP9 na nivou iRNK i proteina. Na **Grafiku 4.3.** se vidi da razlike u količini iRNK za MMP9 u uzorcima genotipa CC i CT+TT nisu statistički značajne, iako se primećuje da nosioci T alela imaju nižu ekspresiju iRNK MMP9. **Histogram 4.7.** pokazuje da u ukupnom broju slučajeva, kod CC homozigota dominira nizak nivo MMP9 proteina sa udelom od 56,3%, dok 13,6% pokazuje visoku ekspresiju proteina MMP9. Sa druge strane, kod nosilaca T alela približan je broj slučajeva sa visokom i niskom ekspresijom MMP9. Naime, nosioci T alela u 17,5% slučajeva ekspimiraju nizak nivo MMP9 dok je u preostalim 12,6% od ukupnog broja slučajeva protein MMP9 visoko ekspimiran (**Histogram 4.7.**). Statistika pokazuje da su kod nosilaca T alela češće prisutni oni koji imaju više proteina MMP9 u poređenju sa CC homozigotima ($p=0,017$). **Slika 4.4.** predstavlja reprezentativne mikrofografije koje oslikavaju ekspresiju proteina MMP9 u uzorcima PTK sa različitim genotipovima. Na **Slici 4.4.A.** predstavljen je slučaj malignog tiroidnog tkiva koji pokazuje odsustvo imunobojenja MMP9 i koji ima genotip CC na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9. **Slika 4.4.B.** predstavlja slučaj koji je nosilac T alela i koji pokazuje intenzivno imunohistohemijsko bojenje na ukupnu formu MMP9.



Grafik 4.3. Relativna ekspresija iRNA MMP9 u uzorcima sa CC i CT+TT genotipom; ns – nije statistički značajno



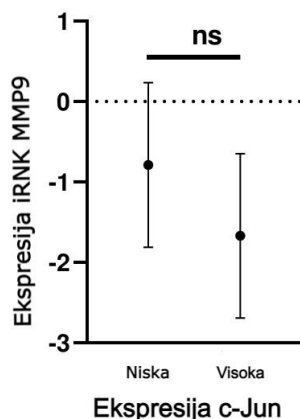
Histogram 4.7. Zastupljenost uzoraka sa niskom odnosno visokom imunoekspresijom MMP9 u uzorcima sa različitim genotipom na poziciji -1562 promotora gena za MMP9; * $p < 0,05$



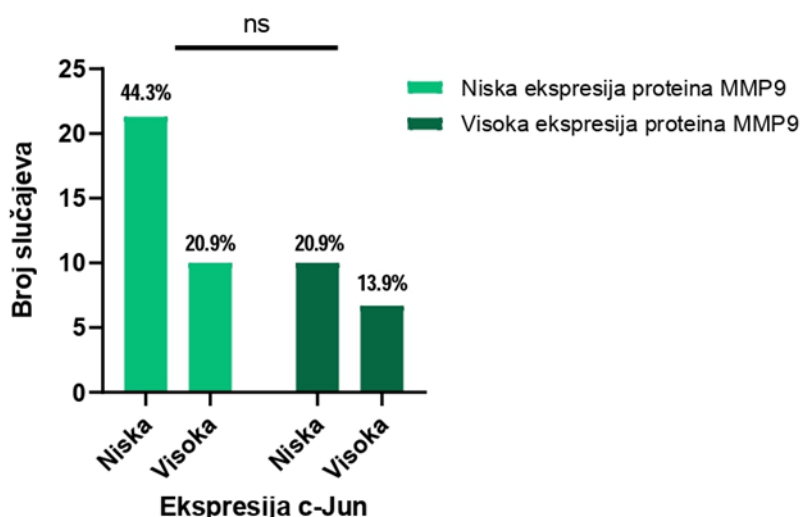
Slika 4.4. Reprezentativne mikrografije imunobojenja ukupne forme MMP9 u uzorcima PTK: **A.** Odsustvo bojenja za MMP9 u uzorku PTK koji je genotipa CC; **B.** Intenzivno bojenje na MMP9 u uzorku PTK koji je genotipa CT. Uvećanje x10

4.4.2 Povezanost nivoa c-Jun i njegove forme acetilovane na Lys271 sa ekspresijom MMP9 na nivou iRNK i proteina

Nivo transkripcionog faktora c-Jun ne koreliše sa nivoom ekspresije *MMP9* na nivou iRNK što je predstavljeno na **Grafiku 4.4**. Dalje, na **Histogramu 4.8**, uočava se da uzorci sa niskim nivoom c-Jun imaju i niže nivoe proteina *MMP9* ali ta razlika nije statistički značajna. Od ispitivanih slučajeva, 44,3% ekspresira *MMP9* i c-Jun na niskom nivou dok u 20,9% slučajeva nizak nivo c-Jun prati visok nivo *MMP9*. U grupi pacijenata sa visokim nivoom c-Jun, sličan procenat pacijenata je ekspresiralo nizak (20,9%) i visok (13,9%) nivo proteina *MMP9*.



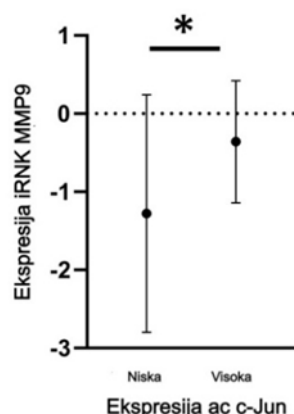
Grafik 4.4. Relativna ekspresija iRNK *MMP9* u uzorcima sa niskom odnosno visokom ekspresijom c-Jun; ns – nije statistički značajno



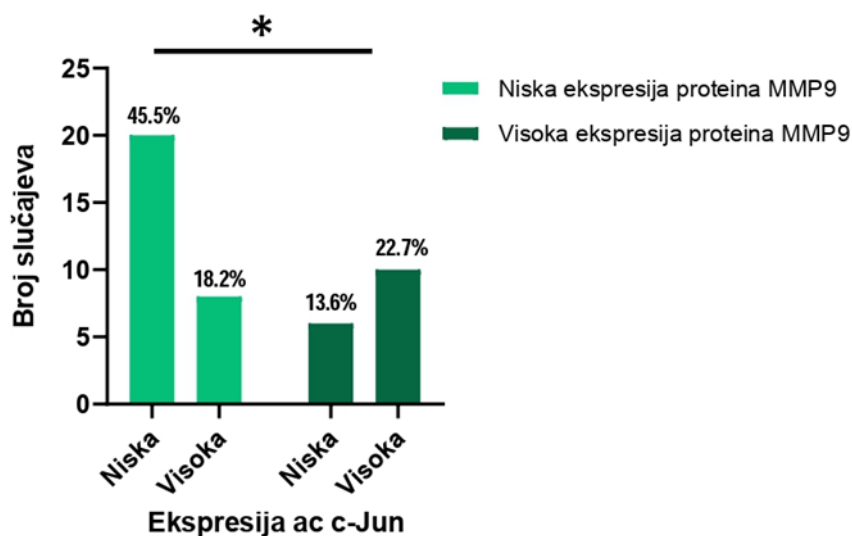
Histogram 4.8. Zastupljenost uzoraka sa niskom odnosno visokom ekspresijom proteina *MMP9* u uzorcima koji pripadaju grupi uzoraka sa niskom odnosno visokom ekspresijom proteina c-Jun; ns – nije statistički značajno

Sa druge strane, analizom korelacije acetilovane forme c-Jun na Lys271 i ekspresije *MMP9* pokazano je da postoji veza. **Grafik 4.5.** predstavlja prikaz nivoa iRNK *MMP9* u slučajevima različitog nivoa c-Jun acetilovanog na Lys271. Grupa sa višom ekspresijom ac c-Jun ima statistički značajno viši nivo iRNK *MMP9* ($p=0,044$). Kada je u pitanju nivo proteina *MMP9*, u grupi sa

niskom ekspresijom ac c-Jun, 45,5% slučajeva je iskazalo i nisku ekspresiju MMP9 dok je 18,2% imalo visoku ekspresiju MMP9. Grupa visoke ekspresije ac c-Jun je imala sličan broj uzoraka niske (13,6%) i visoke (22,7%) ekspresije MMP9. Korelacija između nivoa ac c-Jun i MMP9 proteina je prikazana na **Histogramu 4.9.** i u ovom slučaju je bila statistički značajna ($p=0,027$).



Grafik 4.5. Relativna ekspresija iRNA *MMP9* u uzorcima sa različitom ekspresijom c-Jun acetilovanog na Lys271; * $p<0,05$

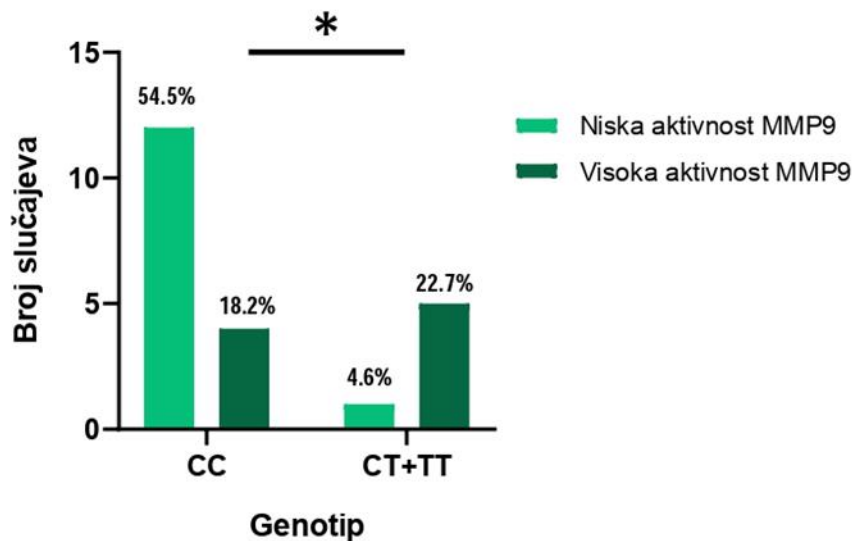


Histogram 4.9. Zastupljenost uzoraka sa nikom odnosno visokom ekspresijom proteina MMP9 u uzorcima sa niskom odnosno visokom ekspresijom c-Jun acetilovanog na Lys271; * $p<0,05$

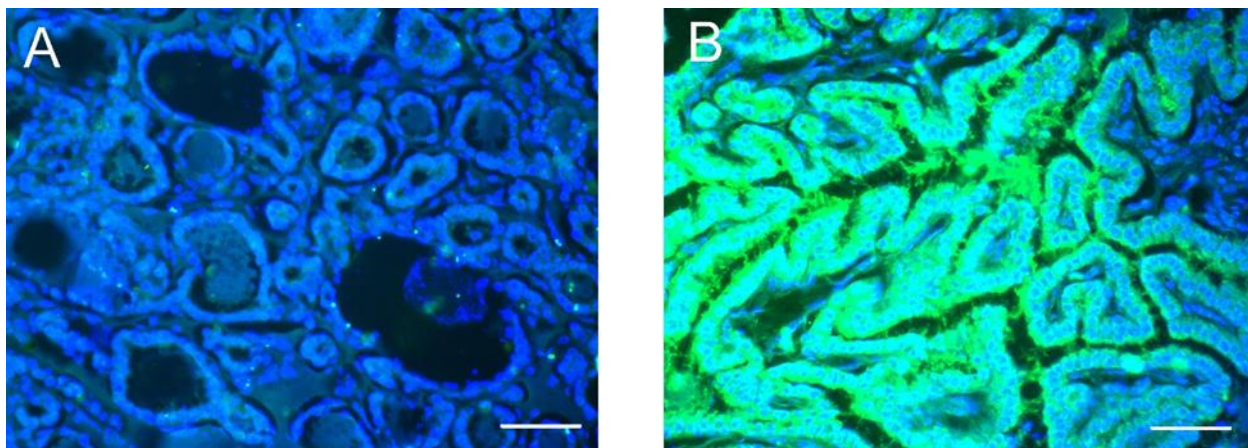
4.5 Analiza veze *MMP9* genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za *MMP9* i želatinolitičke aktivnosti *MMP9*

Histogram 4.10. predstavlja raspodelu analiziranih uzoraka metodom zimografije *in situ* u odnosu na različite genotipove na poziciji -1562 u promotoru gena za *MMP9*. Većina CC homozigota je imala nisku aktivnost (54,5%) dok je 18,2% uzoraka pokazalo visoku aktivnost *MMP9*. Kod nosilaca T alela, 4,6% uzoraka je imalo nisku aktivnost dok je kod 22,7% od ukupnog broja uzoraka detektovana visoka aktivnost *MMP9*. Statistička analiza pokazuje da je niska aktivnost *MMP9* proteina povezana sa CC genotipom ($p=0,23$). **Slika 4.5.** predstavlja reprezentativne mikrografije želatinolitičke aktivnosti *MMP9* u uzorcima različitog genotipa. **Slika**

4.5.A. predstavlja uzorak genotipa CC koji ima slabu želatinolitičku aktivnost, sa vrlo malo zelene boje, dok je na **Slici 4.5.B.** dominantna fluorescentna zelena boja koja označava visoku MMP9 aktivnost u uzorku CT genotipa.



Histogram 4.10. Zastupljenost različitih genotipova u uzorcima sa niskom odnosno visokom želatinolitičkom aktivnošću MMP9; * $p < 0,05$



Slika 4.5. Zimografija *in situ* MMP9 aktivnosti u uzorcima PTK sa i bez ekstratiroidne invazije: **A.** Nizak nivo fluorescence koji potiče od MMP9 aktivnosti u uzorku PTK CC genotipa bez ekstratiroidne invazije, označenog i kao neagresivni; **B.** Visok nivo aktivnosti MMP9 PTK uzorku koji je heterozigot na -1562 mestu u promotoru gena za MMP9 koji ima ekstratiroidnu invaziju i označen je kao agresivan. Uvećanje x20

4.6 Analiza korelacije odabranih faktora sa kliničkopatološkim parametrima

U poslednjem delu ovog istraživanja analizirana je povezanost polimorfizma -1562 C/T, ekspresionog profila c-Jun, njegove forme acetilovane na Lys271 i MMP9 kao i aktivnosti MMP9 sa kliničkopatološkim parametrima koji su povezani sa agresivnim oblikom bolesti. Cilj je bio da se sazna da li postoji prognostički potencijal nekog od ovih faktora. Karakteristike povezane sa agresivnim oblikom bolesti bile su veličina tumora gde se pretpostavlja da što je veći tumor, agresivniji je oblik tumora; zatim starost gde je pretpostavljeno da pacijenti koji imaju preko 45

godina, imaju znatno veću šansu da razviju agresivnu formu bolesti; ekstratiroidna invazija i metastaze na okolnim limfnim čvorovima gde njihovo prisustvo označava lošiju kliničkopatološku sliku; različita dubina infiltracije pri čemu je veća dubina povezana sa lošijim ishodom bolesti i na kraju T status i TNM kategorije gde veća vrednost predstavlja veću šansu da se kod pacijenta ispolji teži oblik bolesti. Rezultati su prikazani u **Tabeli 4.1**.

Analiza je pokazala da su uzorci različitih genotipova slično raspoređeni unutar starosnih grupa. Takođe, razlika u veličini tumora između CC homozigota i nosilaca T alela nije bila statistički značajna. Uzorci u grupi CC genotipa imali su manje ekstratiroidnih invazija ($p=0,033$) od nosilaca T alela. Isto tako, CC homozigoti su se češće svrstavali u niže kategorije TNM ($p=0,022$) i imali niži T status ($p=0,032$). Nije ustanovljena povezanost različitih genotipova sa dubinom infiltracije tumora niti sa nastankom metastaza na okolnim limfnim čvorovima.

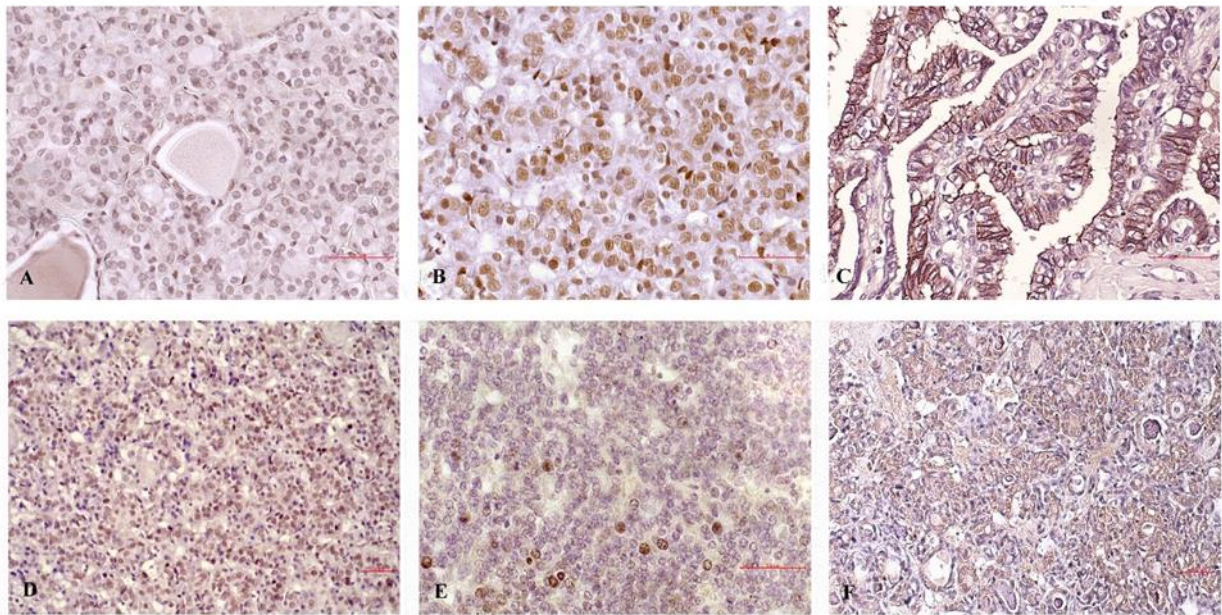
Nivo ekspresije c-Jun nije bio povezan ni sa jednim od ispitivanih kliničkopatoloških parametara.

Međutim, ekspresija c-Jun acetilovanog na Lys271 je pokazala statistički značajan efekat na nekoliko kliničkopatoloških parametara povezanih sa agresivnim ponašanjem tumora. Uzorci koji su imali višu ekspresiju acetilovanog c-Jun su imali veću dubinu infiltracije tumora ($p=0,010$) i u više slučajeva ekstratiroidnu invaziju ($p=0,029$). Ipak, viši nivo ekspresije acetilovanog c-Jun nije doprineo stvaranju metastaza na okolnim limfnim čvorovima niti je razlika u nivou ekspresije bila statistički značajna kada su se poredile grupe uzoraka različitih T statusa ($p=0,582$) kao ni TNM kategorija ($p=0,431$). Iako je na prvi pogled bila velika razlika između veličine tumora kod uzoraka sa manjom i većom ekspresijom c-Jun acetilovanog na Lys271, ta razlika nije bila statistički značajna. Takođe, nije bilo razlike između starosnih grupa u pogledu ekspresije ovog proteina.

Uzorci sa niskom ekspresijom MMP9 pokazali su manju tendenciju za širenje van štitaste zležde ($p=0,005$) ali veza između imunoekspresije i širenja na limfne čvorove nije pokazana. Ekspresija MMP9 bila je statistički značajno povezana sa starošću pacijenata ($p=0,026$), TNM kategorijom ($p=0,018$) i uzorci sa nižom ekspresijom su češće svrstavani u grupu uzoraka sa manjim T statusom ($p=0,027$). Ovaj trend je nastavljen kada su uzorci sa nižom ekspresijom MMP9 češće svrstavani u grupu sa manjom dubinom infiltracije tumora ($p=0,005$). Ipak, nivo ekspresije MMP9 nije uticao na veličinu tumora.

Aktivnost MMP9 bila je značajno povezana sa T statusom ($p=0,02$), ali ne i sa TNM kategorijom koja ima graničnu statističku značajnost ($p=0,051$). Grupa uzoraka sa manje aktivnom MMP9 pokazala je statistički značajno manji nivo dubine infiltracije tumora ($p=0,006$), značajno manje metastaza na limfnim čvorovima ($p=0,011$) i u manje slučajeva ekstratiroidnu invaziju ($p=0,006$). Pacijenti sa različitim nivoom aktivnosti MMP9 nisu se razlikovali po godinama. Takođe, nije pokazana veza između aktivnosti MMP9 i veličine tumora.

Slika 4.6. predstavlja reprezentativne mikrografije koje oslikavaju rezultate dobijene u **Tabeli 4.1**. Mikrografije pokazuju obojenosti c-Jun, acetilovanog c-Jun i MMP9 u uzorcima papilarnog tiroidnog karcinoma različite agresivnosti.



Slika 4.6. Mikrografije koje prikazuju imunoekspresiju c-Jun, acetilovanog c-Jun i MMP9 u reprezentativnim uzorcima PTK: **A.** Uzorak sa ekstratiroidnom invazijom i slabo obojenim c-Jun; **B.** Uzorak sa ekstratiroidnom invazijom i jakim difuznim bojenjem acetilovanog c-Jun; **C.** Uzorak sa ekstratiroidnom invazijom i jakim difuznim bojenjem MMP9; **D.** Indolentan uzorak sa umerenim bojenjem u više od 40% ćelija na c-Jun. **E.** Indolentan uzorak sa slabim bojenjem acetilovanog c-Jun; **F.** Uzorak koji je indolentan i slabo se boji na MMP9. Uvećanje x10

Tabela 4.1. Korelacija polimorfizma -1562 C/T, ekspresije c-Jun i njegove forme acetilovane na Lys271, ekspresije MMP9 i aktivnosti MMP9 sa kliničkopatološkim parametrima PTK kod čoveka.

	-1562 C/T			Ekspresija c-Jun			Ekspresija ac c-Jun			Ekspresija MMP9			Aktivnost MMP9		
	Broj slučajeva			Broj slučajeva			Broj slučajeva			Broj slučajeva			Broj slučajeva		
	CC	CT+TT	p	Niska	Visoka	p	Niska	Visoka	p	Niska	Visoka	p	Niska	Visoka	p
T 1/2	60	18	0.032*	19	11	0.815	15	8	0.582	59	18	0.027*	12	4	0.020*
T 3/4	20	15		12	6		12	9		24	18		3	9	
TNM Niska	63	19	0.022*	20	10	0.697	19	8	0.431	62	19	0.018*	12	3	0.051
TNM Visoka	17	14		11	7		10	7		21	17		5	8	
EI 0	62	19	0.033*	23	9	0.135	20	7	0.029*	65	19	0.005*	13	4	0.006*
EI 1	18	14		8	8		7	10		18	17		2	9	
LNM 0	59	21	0.282	24	10	0.175	22	9	0.092	63	22	0.101	14	6	0.011*
LNM 1	21	12		7	7		5	8		20	14		1	7	
starost <45god	33	12	0.788	10	3	0.175	9	4	0.733	37	8	0.026*	6	5	0.934
starost ≥45god	39	16		13	12		16	10		40	24		9	8	
veličina tumora mm	24.55	25.76	0.308	24.2	25.25	0.745	26.83	18.39	0.212	24.57	30.14	0.241	29.5	28.2	0.797
DI 1/2	46	14	0.092	23	9	0.135	20	6	0.010*	52	13	0.005*	13	4	0.006*
DI 3/4	27	17		8	8		7	11		26	21		2	9	

T 1/2 -T status (grupe 1 i 2). T3/4 – T status (grupe 3 i 4). TNM niska – uzorci TNM kategorije I i II. TNM Visoka – uzorci TNM kategorije III i IV. EI 0 – odsustvo ekstratiroidne invazije. EI 1 prisustvo ekstratiroidne invazije. LNM 0 odsustvo metastaza na regionalnim limfnim čvorovima. LNM 1 - prisustvo metastaza na regionalnim limfnim čvorovima. DI 1/2 - dubina infiltracije tumora kategorije 1 i 2. DI 3/4 - dubina infiltracije tumora kategorije 3 i 4. * p<0.05 statistički značajno.

5 DISKUSIJA

Razvoj tumora je vrlo kompleksan proces u kome učestvuje veliki broj činitelja i koji se sastoji iz više faza. Mnogi koraci u progresiji tumora koji uključuju proliferaciju kancerskih ćelija, epitelno-mezenhimsku tranziciju, dediferencijaciju, migraciju, invaziju i metastazu zahtevaju remodelovanje vanćelijskog matriksa, pri čemu su matriksne metaloproteinaze označene kao ključni regulatori ovih procesa. Član ove familije enzima, MMP9, degraduje kolagen IV, glavnu komponentu lamine i tako igra važnu ulogu u metastatskom potencijalu maligne ćelije. Nivo ovog proteina u fiziološkim uslovima je veoma nizak a uloga mu se prevashodno sastoji u kontrolisanoj razgradnji vanćelijskog matriksa tokom embrionalnog razvića, remodelovanja tkiva, zaceljivanja rana, organogeneze i angiogeneze (Nagase i sar., 2006). MMP9 sintetišu i sekretuju uglavnom endotelne ćelije, fibroblasti i limfociti. Međutim, kako onkogenezu prate poremećaji u signalnim putevima koji utiču na rast, proliferaciju i preživljavanje, epitelne ćelije koje prolaze kroz malignu transformaciju ispoljavaju izmenjen nivo MMP9. Istraživanja ukazuju da MMP9 ima ulogu u svim koracima formiranja malignog tkiva, rasta i progresije tumora pre svega zbog svojih proteolitičkih svojstava zahvaljujući kojim uklanja fizičku barijeru i omogućava malignoj ćeliji da se kreće kroz VCM u susedno zdravo tkivo. Takođe, MMP9 učestvuje u oslobađanju više različitih bioaktivnih molekula vezanih za matriks kao što su faktori rasta, hemokini, citokini i matrikini koji su odgovorni za migraciju ćelija, diferencijaciju i preživljavanje, kao i angiogenezu. Ovaj protein učestvuje i u razgradnji međućelijskih adhezivnih veza u sklopu epitelno-mezenhimske tranzicije kao i formiranju povoljne mikrosredine na mestu metastaze stvarajući metastatsku nišu (Mondal i sar., 2020, Augoff i sar., 2022). I zaista, deregulacija i prekomerna ekspresija MMP9 je pokazana u različitim patološkim stanjima kao što su neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti, artritis, bolesti pluća, različiti tipovi kancera, između ostalih i PTK koji čini 80% svi primarnih tiroidnih maligniteta koji nastaju malignom transformacijom folikularnih ćelija.

U novijim studijama postignut je veliki napredak u ispitivanjima mogućnosti da se MMP9 koristi kao biomarker za različite tipove tumora. Mnoge studije su pokazale izmenjenu ekspresiju MMP9 u različitim malignim tumorima. Chu i saradnici (2011) su pokazali povišenu ekspresiju proteina MMP9 u tumorskom tkivu u odnosu na okolno zdravo tkivo kod pacijenata sa kancerom želuca, a iste rezultate su dobili i Li i saradnici (2017) kod pacijenata sa tumorom dojke, među kojima je skoro 79% imalo visok nivo proteina MMP9. U drugom delu studije, Li i saradnici su koristili različite vrste ćelijskih linija kancera dojke i nemaligne ćelijske linije kako bi potvrdili razlike u ekspresiji MMP9 između ovih grupa ćelija. U studiji iz 2022. godine, Bayadsi i saradnici su pokazali povišenu ekspresiju MMP9 u PTK u odnosu na netumorsko tiroidno tkivo, a takođe i u metastazama na limfnim čvorovima. Rezultati ove doktorske disertacije, gde jedna trećina pacijenata sa PTK ima visoku ekspresiju proteina MMP9, se slažu sa rezultatima Maeta i saradnika (2001) koji su pokazali povišen nivo MMP9 u PTK u odnosu na netumorsko tkivo u studiji u kojoj je visoka ekspresija uočena kod 25% pacijenata. Suprotno, Nakamura i saradnici (1999) nisu našli razliku u ekspresiji MMP9 između tkiva PTK i kontrolnog zdravog tkiva koristeći ELISA metodu. Marecko i saradnici (2014) su pokazali povišenu ekspresiju proteina MMP9 u tkivu PTK u odnosu na zdravo. Kako je prva tačka kontrole ekspresije ovog enzima na transkripcionom nivou, analizirane su razlike u količini iRNK *MMP9* kod pacijenata sa PTK. Rezultati pokazuju da je nivo iRNK *MMP9* u malignom tkivu značajno veći u odnosu na zdravo tkivo. Takođe je pokazano da nivo proteina statistički značajno prati nivo iRNK u tumorskom tkivu. Oba rezultata su u skladu sa ranije objavljenim podacima. U studiji iz 2008. godine, Gerg sa saradnicima (2008) je pokazao značajno viši nivo iRNK *MMP9* u tumorskom u odnosu na susedno zdravo tkivo jetre. Iste rezultate su demonstrirali i Rollin i saradnici (2007) kod pacijenata sa malignim tumorom pluća. U tkivu štitaste žlezde, Meng i saradnici su upoređivali ekspresiju MMP9 u tumorskom u odnosu na netumorsko tkivo i pokazali su veću ekspresiju i na nivou iRNK i proteina u tumorskom tkivu (Meng i sar., 2012). Studija Meng i saradnika se razlikuje od ove, jer su upoređivana tkiva pacijenata sa PTK i kontrolnih tkiva koja su činili uzorci pacijenata sa benignim oboljenjima štitaste žlezde i uzorci osoba bez ikakvih oboljenja štitaste žlezde, dok su u ovoj studiji analizirane razlike u nivou MMP9 kod istih pacijenata u tumorskom i susednom zdravom tkivu štitaste žlezde. Rezultate slične dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji, su saopštili i Zarkesh i saradnici (2018). Sve ovo ide

u prilog i dodatno potvrđuje teoriju da je ekspresija MMP9 izmenjena u tumorskom tkivu štitaste žlezde, te bi se mogla koristiti kao marker za identifikaciju maligniteta štitaste žlezde. Takođe, ovakav rezultat navodi na dalje ispitivanje uloge MMP9 u PTK, a njena povezanost sa napredovanjem bolesti je jedan od aspekata ispitivanih ovoj doktorskoj disertaciji.

Sve uloge koje MMP9 ima, kako u fiziološkim tako i u patološkim uslovima, čine ga vrlo značajnim enzimom i njegova regulacija se odvija na svim nivoima, a primarno na transkripcionom. Stoga je razumno pretpostaviti da se i među regulatorima MMP9 mogu naći potencijalni biomarkeri. Funkcionalni polimorfizmi u promotoru gena za MMP9 imaju različit afinitet za vezivanje transkripcionih faktora i na taj način mogu uticati na nivo transkripcije a posledično i ekspresiju proteina MMP9 i tako doprineti razlikama među pacijentima u prognozi napretka bolesti što ih čini dobrim potencijalnim prognostičkim markerima. Kako se ovi polimorfizmi mogu detektovati iz različitih bioloških uzoraka, mogu se smatrati neinvazivnim preoperativnim markerima koji mogu pomoći u određivanju opsega operativnog zahvata kod pacijenata sa PTK. U potrazi za novim kandidatima za biomarkere, istraživana su dva polimorfizma u promotoru gena za MMP9 za koje se pokazalo da mogu uticati na nivo transkripcije a time i na količinu MMP9.

Jedan od proučavanih polimorfizama je tranzicija C u T na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9. Po literaturi, prisustvo T alela rezultuje neefikasnim vezivanjem represora transkripcije što posledično dovodi do povećanja nivoa transkripcije gena za MMP9. Nađeno je da nosioci T alela imaju dva puta veću ekspresiju gena u odnosu na nosioce C alela (Zhang i sar., 1999). To može imati uticaja na razvoj kancera i njegovo metastaziranje. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je CC genotip zastupljen kod dve trećine pacijenata sa PTK dok su preostala trećina slučajevi koji su nosioci T alela. Ovakva distribucija alela je u skladu sa prethodnim istraživanjima. U studiji Cotignola i saradnika iz 2007. godine, od 1000 pacijenata sa melanomom, 716 ih je bilo CC genotipa dok su preostalih 277 bili nosioci T alela. Grieu i saradnici (2004) su takođe pokazali da 76% pacijenata sa tumorom dojke ima CC genotip, dok je njih 26% imalo CT genotip i samo 2% TT genotip. I druge studije su pokazale sličnu distribuciju genotipova na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 kod pacijenata sa različitim tumorima (Matsumura i sar., 2005; Elander i sar., 2006; Lei i sar., 2007).

Rezultati ovog rada pokazuju da nosioci CC genotipa produkuju značajno manje proteina MMP9 od nosilaca T alela. To je u skladu sa prethodnim istraživanjima koja pokazuju da je CC varijanta efikasnija u vezivanju transkripcionog represora (Zhang i sar., 1999). Lin i saradnici su takođe pokazali vezu T alela sa višim nivoima MMP9 u serumu pacijenata sa akutnom limfoblastičnom leukemijom T ćelija (Lin i sar., 2017). I Hoelzle i saradnici (2016) su pokazali da nosioci T alela imaju 1,5 puta višu ekspresiju u odnosu na nosioce genotipa CC u grupi pacijenata sa kancerom debelog creva. Sa druge strane, u studiji iz 2020. godine, kod 111 pacijenata sa PTK nije nađena veza genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 sa nivoom MMP9 u serumu pre hirurške intervencije (Dobrescu i sar., 2020). Različiti rezultati ovih studija se mogu objasniti na više načina. U studiji Dobrescu i saradnika (2020) je nivo ekspresije MMP9 određen metodom ELISA iz seruma dok je u ovom ispitivanju to određeno metodom imunohistohemije u tkivu PTK tako da je to mogući razlog za različite rezultate. Ipak, razlike u rezultatima između studija Dobrescu saradnika (2020) i druge dve pomenute studije (Hoelzle i sar., 2016, Lin i sar., 2017) se ne mogu objasniti razlikom u metodi, s obzirom da je u svim studijama korišćena ELISA metoda za određivanje nivoa MMP9 i rađeno je na istoj vrsti biološkog uzorka (serum), ali razlika može biti u različitoj produkciji MMP9 kod različitih vrsta karcinoma. Ovo ukazuje na moguće različite uloge MMP9 u različitim vrstama i fazama oboljenja.

Podaci dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da korelacija ovog polimorfizma sa nivoom ekspresije *MMP9* ne važi za iRNK, gde je pokazano da prisustvo T alela ne utiče na nivo iRNK. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su saopštili Ferrand i saradnici (2002) koji nisu našli razliku u aktivnosti promotora u zavisnosti od genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 u WISH i THP-1 ćelijama. Ni Rollin i saradnici (2007) nisu našli asocijaciju nivoa iRNK *MMP9* i određenog genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 kod pacijenata sa

nesitnoćelijskim kancerom pluća, a slične rezultate su saopštili i Glebauskiene i saradnici (2017) kod pacijenata sa adenomom hipofize.

Sledeći polimorfizam koji je ispitivan u ovoj studiji je varijacija u broju CA ponovaka na poziciji -131 u promotoru gena za MMP9 koja se nalazi u blizini mesta vezivanja transkripcionog faktora AP-1. Broj ovih ponovaka utiče na stabilnost promotorske sekvence tako što menjaju konformaciju DNK i time posledično utiču i na vezivanje transkripcionog faktora (Shimajiri i sar., 1999, Peters i sar., 1999). Literatura prikazuje da postoje dva pika u broju ponovaka, prvi na 14, i drugi na 21, 22 ili 23 ponovka dok aleli sa 16 i 17 ponovaka nisu nađeni u populaciji belaca (Peters i sar., 1999; Zhang i sar., 2001; Woo i sar., 2007).

Postoji vrlo malo radova koji prikazuju uticaj ovog polimorfizma u tumoru. *In vitro* ispitivanja na ćelijskim linijama karcinoma jednjaka, pokazala su da je promotorska aktivnost za 50% manja u genu za MMP9 sa 14 CA ponovaka na poziciji -131 u odnosu na 21 CA ponovak kao i da jačina vezivanja transkripcionog faktora za to mesto zavisi od broja CA ponovaka (Shimajiri i sar., 1999). Peters i saradnici su 1999. godine, pokazali u HT1080 ćelijama razliku u aktivnosti promotora u zavisnosti od broja CA ponovaka. Naime, oni su pokazali da je aktivnost promotora koji sadrži 14 CA ponovaka 60% niža u odnosu na promotor koji sadrži 23 CA ponovka na poziciji -131 u promotoru gena za MMP9. Cotignola i saradnici (2007) su potvrdili binominalnu distribuciju broja CA ponovaka na poziciji -131 u promotoru gena za MMP9, ali nisu našli vezu ovog polimorfizma sa lošijim ishodom u slučaju melanoma. Takođe, u studiji iz 2007, Woo i saradnici su ispitivali broj CA ponovaka kao mogući faktor rizika za tumor debelog creva ali nisu našli asocijaciju.

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je utvrditi da li veći broj CA ponovaka utiče na ekspresiju MMP9 kod pacijenata sa PTK a posledično i na tok bolesti. Da bi se to postiglo i da bi se olakšala statistička analiza, uveden je *cutoff* na 17 ponovaka čime su kao rezultat dobijena tri moguća rešenja: homozigoti koji imaju ispod ili iznad 17 ponovaka i heterozigoti tj. slučajevi koji imaju i ispod i iznad 17 CA ponovaka. Dobijeni rezultat onemogućava dalju statističku analizu u cilju povezivanja ovog polimorfizma sa izmenjenom ekspresijom MMP9 ili kao potencijalnog prognostičkog markera za PTK. Naime, hipoteza je bila da veći broj ponovaka pozitivno utiče na transkripciju, a kako je u ispitivanoj kohorti preko 80% uzoraka koji imaju i veći i manji broj od 17 ponovaka, statistička analiza ne bi mogla da sa sigurnošću ukaže da li veći ili manji broj ponovaka utiče na nivo ekspresije gena za MMP9.

Pregledom literature nije nađen podatak o ovom polimorfizmu i njegovoj ulozi u PTK, pa se može reći da je ova studija prva gde je ispitivan ovaj polimorfizam u PTK. Zbog toga se ovi rezultati smatraju važnim i bilo bi dobro nastaviti istraživanje u ovom pravcu kako bi se sa sigurnošću moglo utvrditi da li postoji uticaj ovog polimorfizma na transkripciju *MMP9* u PTK.

Još jedan od razloga u varijaciji transkripcije gena za MMP9 može biti poremećaj u nivou transkripcionih faktora. Njihov nivo, afinitet za vezivanje za određena mesta u genu kao i dostupnost tih mesta i samih transkripcionih faktora u različitim fiziološkim i patološkim uslovima su samo neki od činilaca koji utiču na njihovu ulogu u transkripciji određenog gena. Transkripcioni faktori, u zavisnosti od konteksta, posttranslacionih modifikacija i prisustva drugih faktora mogu smanjiti ili povećati transkripciju gena za koje se vezuju i na taj način uticati na sudbinu određene ćelije.

U ovom istraživanju analizirana je subjedinica AP-1, c-Jun i njegova forma acetilovana na Lys271. c-Jun učestvuje u MAPK putu potpomažući transkripciju različitih gena uključenih u invaziju karcinoma, uključujući i *MMP9*. Prekomerna ekspresija c-Jun je pokazana u različitim tipovima kancera, kao što su nazofaringealni karcinom (Jin i sar., 2007), glioblastom (Blau i sar., 2012), melanom (Spangler i sar., 2011), Hodžkinov limfom (Mathas i sar., 2002), adenokarcinom debelog creva (Wang i sar., 2000), kancer pluća (Szabo i sar., 1996) i mnogi drugi. Ipak, svega nekoliko studija se može naći o c-Jun i njegovoj ulozi u PTK. Chen i saradnici su 2017. godine bioinformatičkom analizom zaključili da je c-Jun tesno povezan sa pojavom PTK, dok su Xiao i saradnici (2019) pokazali povišenu ekspresiju AP-1 u PTK. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je jedna trećina uzoraka imala visoku ekspresiju c-Jun. Ovo se slaže sa studijom koju

su izveli Szabo i saradnici (1996), koji su pokazali prekomernu ekspresiju c-Jun proteina u 31% tumorskih uzoraka u tkivu pluća.

Kako c-Jun formira homodimere ili heterodimere sa drugim proteinima, pokazano je da u zavisnosti od kombinacije dimera, AP-1 može prepoznati različite sekvence u promotorima gena. Takođe, u zavisnosti od kombinacije subjedinica i partnerskih proteina u transkripcionom kompleksu, ovi proteini mogu imati različite regulatorne uloge tj. mogu biti pro-apoptotski ili mogu imati ulogu u signalu koji obezbeđuje preživljavanje ćelije (Raivich i sar., 2008). U ovoj doktorskoj disertaciji, zastupljenost ocena imunobojenja c-Jun u uzorcima PTK je bila vrlo slična ocenama imunobojenja MMP9. Kada je ispitano da li ekspresija c-Jun ima uticaja na nivo MMP9, rezultati su pokazali da c-Jun ne utiče na ekspresiju MMP9 ni na nivou iRNK ni na nivou proteina. Ovo se može objasniti mogućnošću da neki drugi protein ima prevagu u regulaciji ekspresije MMP9 kao i da su potrebne dodatne modifikacije c-Jun proteina kako bi on ostvario svoju ulogu. Kako je po pregledanim literaturnim podacima ovo prvi eksperimentalni opis ekspresije c-Jun u PTK, ovi rezultati se smatraju novitetom.

Aktivnost c-Jun proteina je regulisana različitim posttranslacionim modifikacijama koje dovode do promena u interakciji sa drugim proteinima ili sa DNK (Vries i sar., 2001). Dok je fosforilacija dobro dokumentovana kao preduslov za aktivaciju c-Jun, acetilacija lizinskih ostataka je i dalje predmet rasprave. Vries i saradnici (2001) su pokazali da je acetilacija na Lys271 esencijalna za represiju c-Jun dok je Raivich (2008) saopštio da acetilacija lizinskih ostataka rezultuje aktivacijom c-Jun. Istraživanje iz 2016. godine (Mishra i sar., 2016), pokazalo je da usled hiperacetilacije subjedinica c-Jun i c-Fos, AP-1 pojačava svoje vezivanje za promotor gena za MMP9, a time i transkripcionu aktivnost. Ovo je u saglasnosti sa studijom iz 2013. godine, kada su Xie i saradnici pokazali da acetilacija AP-1 pojačava vezivanje za DNK. Analiza acetilovane forme c-Jun u ovom istraživanju, pokazala je da njegov nivo pozitivno utiče na nivo iRNK i proteina MMP9. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da je acetilacija jedan od mehanizama aktiviranja c-Jun u PTK, koji posledično utiče na transkripciju, a samim tim i nivo MMP9.

Kao što je već rečeno, MMP9 je regulisana na različitim nivoima: transkripcionom, regulacijom poluživota iRNK, posttranslacionim modifikacijama, proteolitičkom aktivacijom latentnih enzima, regulacijom vremena i mesta sekrecije, inhibicijom endogenim inhibitorima. Upravo zbog kompleksne regulacije, MMP9 se u biološkom materijalu može naći u različitim formama kao neaktivni zimogen, aktiviran enzim ili inhibiran u kompleksu sa tkivnim inhibitorima. Različite tehnike se koriste za identifikaciju i karakterizaciju MMP u uzorcima. Metodama Northern blot i RT-PCR se mogu kvantifikovati iRNK *MMP* u ćelijskim i ekstraktima tkiva dok je *in situ* hibridizacijom moguće lokalizovati iRNK na ćelijskom nivou u tkivnim presecima. Ipak, genetičke tehnike ne mogu pokazati da li i u kojoj meri dolazi do translacije. Sa druge strane, imunološkim tehnikama kao što su Western blot i imunohistohemija se može odrediti količina i lokalizacija MMP na proteinskom nivou ali ove tehnike ne daju nikakvu informaciju o njenoj aktivnosti jer se MMP sintetišu kao neaktivne pro- ili preforme koje zahtevaju proteolitičku obradu da bi postale aktivne. Dalje, inhibitori endogenih proteaza ih mogu inhibirati. Biohemijske tehnike, kao što je gel zimografija, su razvijene kako bi se detektovala aktivnost MMP u ekstraktima tkiva. Ipak, homogenizacija tkiva za ove metode ne omogućava lokalizaciju enzimske aktivnosti. Dodatno, sama procedura ekstrakcije može veštački aktivirati inače neaktivne enzime ili izazvati interakciju aktivnih enzima i njihovih inhibitora koji se inače nalaze u različitim delovima intaktnog tkiva. Dakle, budući da MMP9 može biti u latentnoj formi ili inhibirana lokalnim tkivnim inhibitorima, potencijalna prekomerna ekspresija proteina MMP9 pokazana metodom imunohistohemije ne podrazumeva i povećanu enzimsku aktivnost. Zato je u ovoj studiji, pored imunohistohemijske analize ekspresije MMP9, metodom *in situ* zimografije detektovana i aktivnost MMP9 u histološkim presecima PTK. Ukoliko se pogledaju rezultati *in situ* zimografije, vidi se da je na ispitivanim uzorcima približno ista raspodela tj. približno je isti broj uzoraka sa niskom i visokom aktivnošću MMP9. Želatinolitička aktivnost MMP9 je ispitivana u malignitetima kao što su tumor dojke (Kanomata i sar., 2013), pluća (Kaji i sar., 2003), bubrega (Kamiya i sar., 2003), bešike (Kawamura i sar., 2004). Iwata i saradnici (2001) su detektovali aktivnost MMP9 u 91%

uzoraka kancera dojke, ali su se intenzitet i rejon aktivnosti razlikovali po slučajevima. U studiji iz 2009. godine, pokazano je da se želatinolitička aktivnost pokreće na početku invazije karcinoma skvamoznih ćelija kože, pre svega u tumorskoj stromi (Vosseler i sar., 2009). Prve rezultate detekcije želatinolitičke aktivnosti u tiroidnim karcinomima objavili su Nakamura i saradnici (1999). Oni su FIZ metodom (detekcija želatinolitičke aktivnosti na filmu, engl. *film in situ zymography*) pokazali razliku *in situ* želatinolitičke aktivnosti između papilarnog karcinoma i susednog tiroidnog tkiva kada su locirali želatinolitičku aktivnost isključivo u maligno transformisanim tirocitama, dok je reakcija izostala u nemalignim ćelijama. Marecko i saradnici (2014) su prvi upotrebili metodu *in situ* zimografije sa DQ želatinom na tiroidnim tumorima i pokazali višu želatinolitičku aktivnostu kod folikularnih ćelija PTK nego kod normalnih folikularnih ćelija, a ovakva distribucija se slagala sa radovima Kaneyoshi i saradnika (2001) i Kaji i saradnika (2003). Ovi rezultati ukazuju na značaj funkcionalnih metoda kao što je *in situ* zimografija kako bi se doneli tačni zaključci o ulozi proteaza, između ostalih i MMP9 u kanceru.

U delu ovog istraživanja, analiziran je niz od polimorfizma na poziciji -1562 u promotoru gena, zatim povišene transkripcije odnosno povišene količine iRNK, preko nivoa proteina do aktivnosti MMP9 u PTK. Metodom *in situ* zimografije je određen nivo aktivnosti MMP9 u uzorcima različitog genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 što bi moglo da predstavlja korak u prepoznavanju slučajeva koji će razviti agresivnu formu bolesti. Statistički značajna veza je nađena između genotipa na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 i enzimske aktivnosti MMP9, što prati korelaciju genotipa i ekspresije MMP9 proteina. Veza je verovatno indirektna, posledica manje produkcije MMP9 u uzorcima sa CC genotipom pre nego sposobnosti T alela da povećava aktivnost ali ipak demonstrira uticaj ovog polimorfizma posledično na aktivnost MMP9. Ove rezultate moramo uzeti sa rezervom jer je rađeno na vrlo malom broju uzoraka, te bi ovo bilo dobro ponoviti na većem skupu uzoraka gde bi se dobili potpuniji rezultati.

PTK je karcinom koji je obično povezan sa odličnom prognozom, ali postoje pacijenti koji će ispoljiti agresivnu formu bolesti (Ito i sar., 2018; Ho i sar., 2020). Sistem za stratifikaciju pacijenata koji postoji nije savršen. Prognozička stratifikacija pacijenata vrši se pre- i postoperativno. Preoperativni parametri za prognozu toka bolesti su podaci pacijenta dobijeni anamnezom, ultrazvuk štitaste žlezde i okolnih limfnih čvorova i citološki nalaz dobijen iz aspirata finom iglom, metodom koja u čak 15-30% slučajeva daje neodređen rezultat na osnovu kojeg nije moguće postaviti dijagnozu niti predvideti tok bolesti (Ralhan i sar., 2015). Postoperativni parametri se baziraju na patohistološkoj analizi uz korišćenje međunarodne TNM klasifikacije AJCC (Edge i sar., 2010). U sklopu ove klasifikacije u obzir se uzimaju kliničkopatološki parametri kao što su pol i starost pacijenta, veličina tumora, prisustvo ekstratiroidne invazije i metastaza u okolnim limfnim čvorovima kao i prisustvo udaljenih metastaza. TNM klasifikacija dosta dobro razdvaja niskorizične od visokorizičnih pacijenata ali ne može da predvidi koji će pacijenti razviti agresivni oblik bolesti i time zahtevati agresivniju terapiju. Sadašnja terapija pacijenata sa papilarnim tumorom se sastoji od parcijalne ili totalne tiroidektomije, terapije radioaktivnim J^{131} i supresijske terapije tiroksinom. Ipak, to predstavlja previše agresivnu terapiju za veliki broj pacijenata. Međutim, kako njihov broj raste iz godine u godinu, broj pacijenata sa agresivnom formom postaje sve veći i javlja se sve veća potreba da se takvi pacijenti što pre otkriju kako bi im se omogućila adekvatna terapija. Kada se na to doda da je, bez obzira na rast broja pacijenata, stopa smrtnosti ostala približno ista, jasno je da je balans po pitanju agresivnosti terapije veoma bitan kako bi se zaštitili ostali pacijenti od previše agresivnog tretmana. Zato se traže novi pre- i postoperativni markeri koji mogu poboljšati ovaj sistem prognostičke stratifikacije i uz koje će se bolje predvideti kojim pacijentima treba agresivnija terapija a kojima bi i klasična bila previše.

U ovom delu studije, ispitivana je asocijacija analiziranih markera sa kliničkopatološkim parametrima koji se koriste u prognostičkoj stratifikaciji pacijenata sa PTK. Cilj je bio da se ustanovi prognostički potencijal polimorfizma -1562 C/T, profila ekspresije c-Jun, forme c-Jun acetilovane na Lys271 i MMP9 kao i aktivnosti MMP9 u PTK. Ukoliko bi se pokazalo da je neki od ovih markera dobar u izdvajanju pacijenta sa PTK kod koga će doći do razvoja agresivnog oblika bolesti, to bi pomoglo da se odredi najefikasnija terapija i prilagodi lečenje.

Promotor *MMP9* ima više mesta za vezivanje različitih transkripcionih faktora od kojih jedno sadrži upravo poziciju na kojoj je ovaj polimorfizam i pokazano je da T alel može sprečiti vezivanje represora transkripcije čime kod nosilaca T alela dolazi do povećane ekspresije *MMP9* (Zhang i sar., 1999). Kako je pokazano da *MMP9* protein ima ulogu u svim aspektima progresije tumora, može se pretpostaviti da ukoliko zamena C u T na poziciji -1562 u promotoru gena za *MMP9* utiče na transkripciju i posledično na nivo proteina to može uticati na razvoj i napredovanje tumora. Pozitivan rezultat ove analize bi značio da bi ovaj polimorfizam mogao da se upotrebi kao dodatni prognostički marker za pacijente sa PTK koji bi omogućio lakši izbor načina lečenja. I zaista, kada je analiziran efekat T alela na nepoželjne kliničkopatološke karakteristike kod pacijenata sa PTK dobijeni su obećavajući rezultati. Pokazano je da nosioci T alela imaju ekstratiroidne invazije češće nego pacijenti sa CC genotipom te su češće kategorisani u više TNM kategorije, a takođe su i višeg T statusa. Ovakav rezultat povezuje nosioce T alela sa kliničkopatološkim parametrima asociranim sa agresivnom fenotipom tumora i ukazuje da -1562 CT genotipizacija može biti korisna u prognostičkoj stratifikaciji pacijenata. Ipak, u studijama koje su se bavile ovom temom saopšteni su različiti rezultati. Matsumura i saradnici (2005) su u studiji od 177 pacijenata sa tumorom želuca, pokazali da je polimorfizam -1562 C/T tj. prisustvo T alela značajno povezano sa povećanom invazijom tumora, višim stadijumom kancera, invazijom limfnim tokom i dubljom infiltracijom tumora. Sa druge strane, Cotignola i saradnici (2007) su saopštili oprečne rezultate, a slično su pronašli i Grieu i saradnici (2004) koji su T alel korelisali sa parametrima povezanim sa dobrom prognozom kancera dojke zbog čega su zaključili da je T alel protektivan u odnosu na C alel na istom mestu. U studiji iz 2007, Lei i saradnici nisu našli asocijaciju između ovog polimorfizma i veličine tumora, metastaza na limfne čvorove ili diferencijacije u kanceru dojke. Slične rezultate su saopštili i Wang i saradnici (2005) kada su analizirali ovaj polimorfizam u kanceru pluća na 243 pacijenta. Postoji tek nekoliko studija o mogućem prognostičkom potencijalu CT polimorfizma na poziciji -1562 u promotoru gena za *MMP9* u PTK. U studiji iz 2008, Özgen i saradnici nisu našli nikakvu asocijaciju ovog polimorfizma sa prognostičkim parametrima kao što su godine (<45 godina, ≥ 45 godina), pol, multifokalnost tumora, dubina invazije okolnog mekog tkiva i metastaze na okolnim limfnim čvorovima. Sličan rezultat dobili su i Dobrescu i saradnici (2022) koji nisu uspeli da povežu ovaj polimorfizam sa histološkim podtipom PTK, dubinom invazije tumora i TNM kategorijom. Ovi različiti rezultati ukazuju da postoje i neki drugi faktori koji imaju ulogu u regulaciji *MMP9* transkripcije koji mogu zavisiti od vrste tkiva, kao i stadijuma bolesti.

Mnogi transkripcioni faktori čija regulacija i aktivnost mogu biti izmenjeni su ključni regulatori progresije karcinoma kroz njihovu ulogu u deobi ćelija, proliferaciji, diferencijaciji, apoptozi, epitelno-mezenhimskoj tranziciji. Zbog uloge u svim navedenim procesima, c-Jun se postavio kao mogući postoperativan prognostički marker koji bi mogao pomoći u određivanju načina daljeg lečenja pacijenata. Uloga c-Jun u kanceru je opisana u više studija. Vleugel i saradnici (2006) su pokazali drastično viši nivo proteina c-Jun u invazivnom tumoru dojke u odnosu na netumorske ćelije, a nađena je korelacija visokog nivoa ekspresije c-Jun sa proliferacijom i angiogenezom. Takođe, ekspresija c-Jun je asocirana sa stepenom maligniteta kod glioblastoma gde je nađeno da c-Jun promovise proliferaciju, migraciju i invaziju tumora (Blau i sar, 2012). Huang i saradnici (2022) su, analizirajući ekspresiju c-Jun kod 99 pacijenata sa hipofaringealnim karcinomom skvamoznih ćelija, pokazali da je nivo c-Jun značajno korelisao sa T stadijumom, stepenom diferencijacije, veličinom tumora i brojem metastaza na limfnim čvorovima i još bitnije, pokazali su da je ekspresija c-Jun nezavisni faktor preživljavanja od momenta dijagnoze do završetka praćenja ili smrti nezavisno od bolesti. I Xu i saradnici (2017) su našli značajnu razliku u ekspresiji c-Jun kod 313 pacijenata sa različitim stadijumima oralnog karcinoma skvamoznih ćelija, brojem metastaza na limfnim čvorovima i TNM kategorije, a takođe su pacijenti sa višim nivoom c-Jun imali kraće vreme preživljavanja. Nedavna studija je prikazala vezu između AP-1, transkripcionog faktora čija je c-Jun subjednica, i veličine tumora kod pacijenata sa PTK (Xiao i sar, 2019). U ovoj doktorskoj disertaciji, ukupni c-Jun nije korelisao ni sa jednim od kliničkopatoloških parametara. Međutim, kada je analizirana veza između c-Jun acetilovanog na

Lys271 sa kliničkopatološkim parametrima povezanim sa agresivnošću tumora dobijena je asocijacija između ekspresije acetilovanog c-Jun i ekstratiroidne invazije kao i dubine infiltracije tumora. Po saznanjima autora, uloga c-Jun u PTK nije do sada dokumentovana. Takođe, do sada nije dokumentovan ni njegov prognostički potencijal, te je ovo prva studija koja se bavila ulogom forme c-Jun acetilovane na Lys271 i njegovog prognostičkog potencijala u PTK. Dobijeni rezultati pokazuju da acetilovani c-Jun može biti dobar prediktor širenja PTK van okvira štitaste žlezde i mogu predstavljati dorpinos polju biologije tumora.

U ovoj doktorskoj disertaciji, analiziran je prognostički potencijal ekspresije proteina MMP9 kod pacijenata sa PTK. Rezultati pokazuju da je visok nivo MMP9 proteina u vezi sa većinom kliničkopatoloških parametara povezanih sa agresivnim oblikom PTK: starost, viši T status i TNM kategorija, veći stepen dubine infiltracije, kao i prisustvo ekstratiroidne invazije. Ovo ukazuje da bi MMP9 bio dobar postoperativni prognostički marker koji bi mogao ukazati na to koji će pacijent razviti agresivni oblik bolesti te zahtevati agresivnije lečenje. Iako je pregledom literature utvrđeno da ima radova na ovu temu, oni pokazuju kontradiktorne rezultate. Li i saradnici (2017) su povezali ekspresiju MMP9 sa metastazama na limfnim čvorovima i stadijumom bolesti, ali ne i sa veličinom tumora i starošću kod pacijenata sa malignim tumorom dojke. Asocijaciju sa parametrima povezanim sa lošom prognozom su dobili i Zhang i saradnici u studiji iz 2012. godine, kada su imunohistohemijskom metodom analizirali ekspresiju MMP9 kod pacijenata sa kancerom debelog creva. U zanimljivoj studiji iz 2007. godine, Sillanpää i saradnici su pokazali da u zavisnosti od lokacije, nivo ekspresije proteina MMP9 ima različit uticaj na progresiju kancera. U rezultatima ove studije, veća količina proteina MMP9 u tumorskim ćelijama je značila duže vreme preživljavanja dok je kada je prisutan u stromi povezan sa kraćim vremenom od operacije do trenutka smrti kao posledice tumora. Oni su zaključili da uloga MMP9 u progresiji tumora zavisi od lokacije ovog proteina u tkivu tako što on ima supresivnu ulogu u progresiji karcinoma kada je eksprimiran u epitelu, a promovise napredak kada je prisutan u stromi. Vilen i saradnici (2012) su, opsežnom analizom prethodnih studija, takođe ukazali na različitu ulogu MMP9 tokom progresije kancera u zavisnosti od stadijuma i lokacije u karcinomu usne duplje. Sa druge strane, Scorilas i saradnici (2001) su pokazali da pacijenti sa negativnim MMP9 imunobojeanjem u tumorima dojke imaju češće velike tumore, histološki klasifikovane kao invazivni tip i češće imaju viši stadijum bolesti ukazujući na moguću protektivnu ulogu MMP9. Na karcinomu debelog creva, Koskensalo i saradnici (2012) su takođe našli da MMP9 ima supresivnu ulogu sa čim se slažu rezultati studija koje su izveli Walter i saradnici (2016) kao i Pujada i saradnici (2017). Sve ovo potvrđuje kompleksnu ulogu koju ima MMP9 u patološkim uslovima. U studijama u PTK su nađeni slični, nekonzistentni rezultati. Jednu od prvih studija o mogućoj vezi ekspresije MMP9 sa kliničkopatološkim parametrima povezanim sa agresivnim oblikom PTK su radili Maeta i saradnici 2001. godine koji su pokazali da je ekspresija MMP9 u tumorskom tkivu pacijenata pozitivno korelirala sa metastazama na limfnim čvorovima, kao i stepenom intratiroidne i vaskularne invazije tumora. Bumber i saradnici (2020) su, sa druge strane, prikazali rezultate koji pokazuju da MMP9 nema nikakvog efekta na progresiju karcinoma što je slično rezultatima studije Ivković i saradnika (2022). Ipak, većina literaturnih podataka ukazuje da je viši nivo MMP9 povezan sa lošijim ishodom kod pacijenata sa papilarnim tiroidnim karcinomom, sa čime se slažu i rezultati ove doktorske disertacije. Wang i saradnici (2014) su našli asocijaciju između ekspresije MMP9 i prisustva metastaza na limfnim čvorovima i veličine tumora dok su Meng i saradnici (2012) pronašli da viši nivoi MMP9 proteina odgovaraju tumorima većeg dijametra, višeg TNM statusa i češći su kod pacijenata starijih od 45 godina. Meta-analiza Wen i saradnika iz 2023. godine prikazuje da pacijenti sa višom ekspresijom proteina MMP9 imaju veće tumore koji su više TNM kategorije koji češće metastaziraju na okolne limfne čvorove. Ove studije zaključuju da MMP9 ima bitnu ulogu u progresiji PTK. Razlike u rezultatima studija koje su se bavile prognostičkim potencijalom MMP9 u PTK se mogu objasniti na više načina. Metoda imunohistohemije, koja je korišćena u ovoj studiji, je semikvantitativna pa time zahteva subjektivno ocenjivanje istraživača koje može imati uticaj na rezultate. Da bi izbegli ovo, svako ocenjivanje u ovoj studiji vršila su dva istraživača, nezavisno jedan od drugog i bez prethodnog znanja o kliničkopatološkim

karakteristikama ovih slučajeva. Razlike bi mogle biti zbog razlike u metodama, jer se osim imunohistohemije, za analizu ekspresije MMP9 koriste i metode poput ELISA, Western blot, gel zimografije, RT-PCR. Dalje, razlike bi mogle biti usled različitih bioloških uzoraka ili dela tkiva na kojima se vrši ocenjivanje kao i korišćenja antitela različitih specifičnosti. Još jedan razlog mogao bi biti i različiti fokus studija pa tako neke studije traže razliku između ekspresije MMP9 u metastazama i primarnim tumorima, druge pak imaju različito definisane kategorije za statističke analize. Sve ovo se odražava na zaključke studija o prognostičkom potencijalu MMP9 kod pacijenata sa PTK.

Ono što se mora napomenuti je, da je u ovoj kao i u navedenim studijama korišćeno antitelo koje ne razlikuje zimogenu od aktivne forme ovog proteina, te se ne može sa sigurnošću reći koliko je aktivnog enzima. Iz tog razloga, rezultati *in situ* zimografije su korelisani sa vrednostima prognostičkih kliničkopatoloških parametara PTK. Rezultati prikazuju da su visoki nivoi aktivne forme nađeni u uzorcima kod kojih je došlo do invazije okolnog tkiva i metastaza na limfnim čvorovima. Ovo je dalje podržano vezom aktivnosti MMP9 i stepena dubine infiltracije kao i T statusa dok je korelacija sa TNM kategorijom bila na granici statističke značajnosti. I druge istraživačke grupe su ispitivale vezu aktivne MMP9 sa agresivnim fenotipom tumora. Iwata i saradnici su u studiji iz 2001. godine istraživali aktivnost želatinaza na uzorcima tumora dojke. Oni su podelili uzorke u tri grupe po stepenu lize supstrata i pokazali razliku u želatinolitičkoj aktivnosti među različitim histološkim tipovima tumora. Takođe, pokazali su da je želatinolitička aktivnost snažna u invazivnim tipovima dok je kod neinvazivnih tumora pokazana slaba aktivnost MMP2 i MMP9. Pokazani uticaj aktivne MMP9 u ovom istraživanju prati rezultat analize asocijacije ukupne forme MMP9 sa kliničkopatološkim parametrima povezanim sa agresivnošću tumora kao što su T status, dubina infiltracije tumora i prisustvo ekstratiroidne invazije, što se može objasniti time da procenat aktivnog enzima raste sa procentom ukupne forme MMP9. U radu iz 2014. godine, Marecko i saradnika pokazano je da je više latentne i aktivne MMP9 u PTK nego u susednom netumorskom tkivu, kao i da je udeo aktivne u ukupnoj MMP9 značajno povišen u PTK. Takođe, pokazano je da je ovaj udeo bitno povećan u tumorima koji imaju agresivniji fenotip. I zaista, nekoliko istraživačkih grupa je potvrdilo da procenat aktivne MMP9 raste u tumorima koji iskazuju agresivno ponašanje. Patel i saradnici (2005) su objavili da je udeo aktivne MMP9 značajno povećan u malignom tkivu u odnosu na normalno tkivo kod pacijenata sa kancerom usne duplje. Ipak, Weng i saradnici (2013) su pokazali suprotno u karcinomu pluća. Koyama i saradnici (2000) su, metodama imunohistohemije i *in situ* zimografije, pak pokazali neslaganje između biosinteze MMP9 i aktivnosti u kanceru jednjaka; nije pronađena asocijacija ukupne forme MMP9 ni sa jednim analiziranim kliničkopatološkim parametrom dok je aktivna forma pokazala asocijaciju sa vaskularnom invazijom. Sa ovim se slažu i rezultati Marecko i saradnika (2014) gde je ekspresija aktivne, ali ne i ukupne forme MMP9 korelisala sa parametrima povezanim sa agresivnim fenotipom tumora. Kako je u ovoj doktorskoj disertaciji pronađena veza i aktivne i ukupne forme MMP9 sa kliničkopatološkim parametrima, ovo neslaganje sa drugim studijama se može objasniti uzorcima koji su obrađivani u različitim stadijumima bolesti, jer se tada menja i aktivnost različitih signalnih puteva koji kontrolišu između ostalog i matriksne metaloproteinaze.

Ovo istraživanje ima nekoliko nedostataka koji se moraju pomenuti. Pre svega, broj uzoraka u ovoj studiji je bio mali. Drugo, metode koje su korišćene za analizu ekspresije proteina su semikvantitativne te je dodeljeni skor podložan subjektivnoj oceni istraživača. Iako je učinjeno sve da se ovaj uticaj smanji, valjalo bi uraditi dodatne analize kvantitativnim metodama kako bi se ovi rezultati dodatno validirali. Sledeće, ova studija je rađena na uzorcima iz samo jedne medicinske ustanove, te bi se trebale uraditi dodatne, šire studije sa različitim etničkim grupama kako bi se dobile potpunije informacije. I kao poslednje, ali ne i najmanje važno, da bi se rezultati ove doktorske disertacije mogli koristiti u kliničkoj praksi, prognostičkoj stratifikaciji pacijenata i određivanju daljeg toka lečenja, neophodno je pored svega navedenog, uraditi studiju praćenja pacijenata kako bi se dublje analizirala veza između ovih potencijalnih markera i prognoze bolesti pacijenta i kako bi se sa sigurnošću neki od ovih markera mogli nazvati prognostičkim. Zbog svega

navedenog, ovi rezultati se smatraju preliminarnim i može se reći, početnim korakom za dalje istraživanje.

Analiza ekspresije MMP9 u PTK, zajedno sa određenim regulatorima njene ekspresije, poslužila je da se dobije bolji uvid u načine na koje se tumor može ponašati. Cilj ovih analiza bio je da se identifikuju molekularne izmene koje mogu poslužiti kao dodatni ili paralelni biomarkeri u tiroidnoj patologiji. Najveći doprinos ove studije je analiza prognostičkog potencijala MMP9, polimorfizma na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 i c-Jun, kako totalnog tako i forme acetilovane na Lys271. Svi pomenuti kandidati izuzev ukupne forme c-Jun su se pokazali kao obećavajući prediktori nepovoljnog kliničkog toka PTK i to može biti iskorišćeno u prognostičkoj stratifikaciji pacijenata sa PTK.

6 ZAKLJUČCI

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

- Analizom polimorfizma -1562 C/T u promotoru gena za MMP9 pokazano je da uzorci CC genotipa imaju niži nivo MMP9 što sugeriše da je CC varijanta efikasnija u vezivanju represora transkripcije;
- Analizom broja CA ponovaka na -131 poziciji u genu za MMP9 pokazano je da su velika većina pacijenata sa PTK (80%) heterozigoti koji imaju na jednom alelu manje od 17 CA ponovaka, a na drugom više od 17 ponovaka. Profil distribucije CA ponovaka isključio je korišćenje ovog pokazatelja u daljoj analizi;
- Primenom imunohistohemijske metode pokazano je da je zastupljenost imunopozitivnosti c-Jun vrlo slična sa MMP9, ali ekspresija c-Jun nije statistički značajno povezana sa ekspresijom MMP9 što ukazuje na to da postoji neki drugi regulatorni element ili mehanizam;
- Pokazano je da je ekspresija forme c-Jun acetilovane na Lys271 povezana sa povišenom ekspresijom MMP9 što ukazuje na mogućnost da je acetilacija jedan od mehanizama aktiviranja c-Jun u tkivu pacijenata sa PTK;
- Pokazana je veza između prisustva T alela u promotoru gena za MMP9 na poziciji -1562 sa enzimskom aktivnošću MMP9 koja prati nivo ukupne MMP9 kod pacijenata sa PTK. Veza je verovatno indirektna, posledica manje produkcije MMP9 u uzorcima sa CC genotipom pre nego sposobnosti T alela da poveća aktivnost;
- Ekspresija *MMP9* na nivou iRNK je značajno viša u tumorskom nego u susednom zdravom tkivu kod pacijenata sa PTK. Takođe, nivo proteina MMP9 značajno prati nivo iRNK *MMP9* u tumorskom tkivu pacijenata sa PTK što potvrđuje prekomernu ekspresiju MMP9 u tumorskom tkivu;
- Statistička analiza pokazala je da nosioci T alela na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9 imaju češće ekstratiroidne invazije nego pacijenti sa CC genotipom, te su češće kategorisani u više TNM kategorije i višeg T statusa što ukazuje da -1562 CT genotipizacija može biti korisna u boljoj proceni opsega operativnog zahvata kod pacijenata sa PTK;
- Odsustvo korelacije između rezultata imunohistohemijskog bojenja c-Jun sa kliničkopatološkim parametrima povezanim sa agresivnim fenotipom tumora ukazuje da c-Jun nema potencijal kao prognostički marker za PTK;
- Poređenjem imunohistohemijske ekspresije forme c-Jun acetilovane na Lys271 sa kliničkopatološkim parametrima pacijenata sa PTK pokazano je da je visoka ekspresija ovog proteina u korelaciji sa dubinom infiltracije tumora i ekstratiroidnom invazijom zbog čega bi on mogao biti dobar prediktor širenja PTK van okvira štitaste žlezde;
- Povišena ekspresija proteina MMP9 je u vezi sa većinom kliničkopatoloških parametara koji su povezani sa agresivnim fenotipom PTK što ukazuje da je ekspresija ovog proteina povezana sa lošijom prognozom PTK;
- Poređenjem rezultata dobijenih metodom *in situ* zimografije sa kliničkopatološkim parametrima pacijenata sa PTK pokazano je da je visoka aktivnost MMP9 u korelaciji višim T statusom, dubinom infiltracije tumora, ekstratiroidnom invazijom i metastazama na limfnim čvorovima što ukazuje na ulogu aktivirane MMP9 u progresiji PTK i njegovom širenju putem limfe.

Σ

U ovoj doktorskoj disertaciji pokušano je da se reevaluira uloga MMP9 i alela u promotoru na poziciji -1562 u progresiji PTK. Dalje, po prvi put je pokazana zastupljenost CA ponovaka u promotoru *MMP9* kod pacijenata sa PTK, kao i ekspresija transkripcionog faktora c-Jun i njegove forme acetilovane na Lys271. Ukupni rezultati ove doktorske disertacije jasno ukazuju na to da prisustvo T alela na poziciji -1562 u promotoru gena za MMP9, zajedno sa izmenjenom ekspresijom forme c-Jun acetilovane na Lys271, ima uticaj na ekspresiju MMP9 što posledično dovodi do progresije PTK. Podaci dobijeni ovom studijom ukazuju na to da bi se genotipizacijom promotora MMP9 na poziciji -1562 moglo na brz i ekonomičan način, vrlo precizno utvrditi

prisustvo T alela. Pomenuti alel može, kao dodatni preoperativni marker, biti koristan za planiranje opsega operacije. Takođe, u histološkim preparatima dobijenim nakon operacije može se odrediti nivo proteina MMP9 i acilovanog c-Jun. Oni bi se, u kliničkoj praksi, koristili kao dodatni postoperativni markeri za određivanje daljeg toka lečenja. Sa biološke strane, rezultati ove studije su pokazali da je regulacija MMP9 kod pacijenata sa PTK veoma kompleksna i uključuje brojne faktore koji se međusobno prepliću u još uvek nedovoljno ispitanom intrigantnoj mreži.

7 LITERATURA

- Al-Brahim, N., & Asa, S. L. (2006). Papillary thyroid carcinoma: An overview. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 130(7), 1057-1062. <https://doi.org/10.5858/2006-130-1057-PTCAO>
- Augoff, K., Hryniewicz-Jankowska, A., Tabola, R., & Stach, K. (2022). MMP9: A tough target for targeted therapy for cancer. *Cancers (Basel)*, 14(7), 1847. <https://doi.org/10.3390/cancers14071847>
- Baldini, E., Toller, M., Graziano, F. M., Russo, F. P., Pepe, M., et al. (2004). Expression of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors in normal and different human thyroid tumor cell lines. *Thyroid*, 14(11), 881-888. <https://doi.org/10.1089/thy.2004.14.881>
- Baloch, Z. W., Asa, S. L., Barletta, J. A., Ghossein, R. A., Juhlin, C. C., et al. (2022). Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocrine Pathology*, 33(1), 27-63. <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09707-3>
- Barret, K. E., Boitano, S., Barman, S. M., & Brooks, H. L. (2010). *Ganong's Review of Medical Physiology* (23rd ed.). McGraw-Hill Medical.
- Basolo, F., Torregrossa, L., Giannini, R., Miccoli, M., Lupi, C., et al. (2010). Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: Analysis of 1060 cases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(9), 4197-4205. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0337>
- Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825(1), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.001>
- Bayadsi, H., Barghout, G., Gustafsson, M., Sund, M., & Hennings, J. (2022). The expression of stromal biomarkers in small papillary thyroid carcinomas. *World Journal of Surgical Oncology*, 20(1), 340. <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02805-w>
- Bhattacharyya N. (2003). Surgical treatment of cervical nodal metastases in patients with papillary thyroid carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 129(10), 1101-1104. <https://doi.org/10.1001/archotol.129.10.1101>
- Bidey, S. P., & Tomlinson, S. (1988). The regulation and integration of thyroid follicular differentiation and function. *Clinical Endocrinology*, 28(4), 423-444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1988.tb03674.x>
- Blau, L., Knirsh, R., Ben-Dror, I., Oren, S., Kuphal, S., et al. (2012). Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), E2875-E2884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203659109>
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 786-801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., et al. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Bumber, B., Marjanovic Kavanagh, M., Jakovcevic, A., Sincic, N., Prstacic, R., et al. (2020). Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the development of cervical metastases in papillary thyroid cancer. *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*, 45(1), 55-62. <https://doi.org/10.1111/coa.13466>
- Byun, S. O., Fang, Q., Zhou, H., & Hickford, J. G. (2009). An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 385(1), 174-175. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.024>
- Califf R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 243(3), 213-221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>

- Cao, Y. M., Zhang, T. T., Li, B. Y., Qu, N., & Zhu, Y. X. (2021). Prognostic evaluation model for papillary thyroid cancer: a retrospective study of 660 cases. *Gland surgery*, *10*(7), 2170–2179. <https://doi.org/10.21037/gs-21-100>
- Chen, W., Liu, Q., Lv, Y., Xu, D., Chen, W., et al. (2017). Special role of JUN in papillary thyroid carcinoma based on bioinformatics analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, *15*(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1190-8>
- Chen, X., Wu, W., Chen, X., & Gong, X. (2016). Roles of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha, activator protein-1, and programmed cell death 4 in diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Tumor Biology*, *37*(5), 6519-6526. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4476-x>
- Chinenov, Y., & Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, *20*(19), 2438-2452. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204385>
- Chu, D., Zhang, Z., Li, Y., Zheng, J., Dong, G., et al. (2011). Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease-free survival and overall survival in patients with gastric cancer. *International Journal of Cancer*, *129*(4), 887-895. <https://doi.org/10.1002/ijc.25734>
- Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R., Kloos, R. T., Lee, S. L., et al. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, *19*(11), 1167–1214. <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0110>
- Cotignola, J., Reva, B., Mitra, N., Ishill, N., Chuai, S., et al. (2007). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Medical Genetics*, *8*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-10>
- Cramer, J. D., Fu, P., Harth, K. C., Margevicius, S., & Wilhelm, S. M. (2010). Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results national cancer data registry. *Surgery*, *148*(6), 1147-1152; discussion 1152-1153. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.10.016>
- Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A. (2017). Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *147*, 1-73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
- Das, S. S., Mishra, S., & Kaul, J. M. (2017). Development of Parafollicular Cells and their Relationship with Developing Thyroid Follicles in Human Foetuses. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *11*(7), AC01–AC04. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/26211.10225>
- Ding, J., Wu, W., Fang, J., Zhao, J., & Jiang, L. (2020). Male sex is associated with aggressive behaviour and poor prognosis in Chinese papillary thyroid carcinoma. *Scientific reports*, *10*(1), 4141. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60199-9>
- Dobrescu, R., Schipor, S., Picu, C., Manda, D., Caragheorghopol, A., et al. MMP-9 1562 C/T polymorphism may be associated with an increased susceptibility to develop micropapillary thyroid cancer but not more advanced tumours; Presented at European Society for Endocrinology ECE2020 *Endocrine Abstracts* (2020) **70** AEP945; DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP945
- Dobrescu, R., Schipor, S.V., Manda, D., Caragheorghopol, A., & Badiu, C. (2022). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promoter -1562C/T functional polymorphism is associated with an increased risk to develop micropapillary thyroid carcinoma. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers.*, 555-562. DOI: 10.3233/CBM-20119
- Eckhof, K., Flurschütz, R., Trillsch, F., Mahner, S., Jänicke, F., et al. (2013). The prognostic significance of Jun transcription factors in ovarian cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *139*(10), 1673-1680. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1435-1>
- Edge, S. B., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Green, F.L., et al. (2010). *AJCC Cancer Staging Manual* (7th ed.). Springer-Verlag.

- Edwards, D. R. (2001). Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. In N. J. Clendeninn & K. Appelt (Eds.), *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy* (pp. 67-84). Humana Press.
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 859-868. <https://doi.org/10.1038/nrc1209>
- Elander, N., Söderkvist, P., & Fransén, K. (2006). Matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -3 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Anticancer Research*, 26(1B), 791-795.
- Erler, J. T., & Weaver, V. M. (2009). Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(1), 35-49. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9209-8>
- Fang, L., Du, X. J., Gao, X. M., & Dart, A. M. (2010). Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction. *Clinical Science*, 119(4), 175-183. <https://doi.org/10.1042/CS20100011>
- Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2014). Gelatinase B/MMP-9 in tumour pathogenesis and progression. *Cancers (Basel)*, 6(1), 240-296. <https://doi.org/10.3390/cancers6010240>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., et al. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., et al. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England:1990)*, 49(6), 1374-1403. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Ferrand, P. E., Parry, S., Sammel, M., Macones, G. A., Kuivaniemi, H., et al. (2002). A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Molecular Human Reproduction*, 8(5), 494-501. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.5.494>
- Fiotti, N., Zivadinov, R., Altamura, N., Nasuelli, D., Bratina, A., et al. (2004). MMP-9 microsatellite polymorphism and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 152(1-2), 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.03.006>
- Gayton, A. C., & Hall, J. E. (2006). *Textbook of Medical Physiology* (11th ed.). Elsevier Saunders.
- Gerg, M., Kopitz, C., Schaten, S., Tschukes, A., Kahlert, C., et al. (2008). Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Molecular Cancer Research*, 6(3), 341-351. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2032>
- Glebauskiene, B., Liutkeviciene, R., Vilkeviciute, A., Kriauciuniene, L., Jakstiene, S., et al. (2017). Does MMP-9 Gene Polymorphism Play a Role in Pituitary Adenoma Development? *Disease markers*, 2017, 5839528. <https://doi.org/10.1155/2017/5839528>
- Griew, F., Li, W. Q., & Iacopetta, B. (2004). Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Research and Treatment*, 88(3), 197-204. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-0595-6>
- Hadler-Olsen, E., Kanapathippillai, P., Berg, E., Svineng, G., Winberg, J. O., et al. (2010). Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: Zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(1), 29-39. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954354>
- Hall, J. E. (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (13th ed.). Elsevier Saunders.
- Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., et al. (2016). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, 26(1), 1-133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>
- Havelka, M., & Tatić, S. (2003). *Štitasta žlezda: kliničke, morfološke i patohistološke karakteristike*. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet.

- He C. (1996). Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter. *Cancer letters*, 106(2), 185–191. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(96\)04318-2](https://doi.org/10.1016/0304-3835(96)04318-2)
- Ho, A. S., Luu, M., Barrios, L., Chen, I., Melany, M., et al. (2020). Incidence and Mortality Risk Spectrum Across Aggressive Variants of Papillary Thyroid Carcinoma. *JAMA oncology*, 6(5), 706–713. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.6851>
- Hoelzle, C. R., Magalhães, K. C., Carvalho, S. S., Santos, G. A., Maia, I. M., et al. (2016). Matrix metalloproteinase 9 -1562C/T polymorphism increased protein levels in patients with colorectal cancer in a sample from southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017478>
- Huang, Q., Ye, M., Li, F., Lin, L., & Hu, C. (2022). Prognostic and clinicopathological significance of transcription factor c-Jun in hypopharyngeal squamous cell carcinoma: A 3-year follow-up retrospective study. *BMC Cancer*, 22(1), 1019. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10113-5>
- Hutala, P., Tuuttila, A., Chow, L. T., Lohi, J., Keski, O. J., et al. (1991). Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression of the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-180 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 16485–16490.
- IARC. WHO Classification of Tumours Editorial Board. (2022). *Endocrine and neuroendocrine tumours* (5th ed., Vol. 8). International Agency for Research on Cancer. <https://tumourclassification.iarc.who.int>
- Ito, Y., & Miyauchi, A. (2012). Prognostic factors of papillary and follicular carcinomas in Japan based on data of Kuma Hospital. *Journal of Thyroid Research*, 2012, 973497. <https://doi.org/10.1155/2012/973497>
- Ito, Y., Amino, N., Yokozawa, T., Ota, H., Ohshita, M., et al. (2007). Ultrasonographic evaluation of thyroid nodules in 900 patients: comparison among ultrasonographic, cytological, and histological findings. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 17(12), 1269–1276. <https://doi.org/10.1089/thy.2007.0014>
- Ito, Y., Miyauchi, A., Kihara, M., Fukushima, M., Higashiyama, T., et al. (2018). Overall survival of papillary thyroid carcinoma patients: A single-institution long-term follow-up of 5897 patients. *World Journal of Surgery*, 42(3), 615–622. <https://doi.org/10.1007/s00268-018-4479-z>
- Ivković, I., Limani, Z., Jakovčević, A., Huić, D., & Prgomet, D. (2022). Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in locally invasive papillary thyroid cancer. *Biomedicines*, 10(12), 3178. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123178>
- Iwata, H., Yamamoto, M., Nemori, R., Mizutani, M., Iwase, T., et al. (2001). Localization of gelatinolytic activity can be detected in breast cancer tissues by film in situ zymography. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 8(2), 111–115. <https://doi.org/10.1007/BF02967489>
- Jin, X., Song, X., Li, L., Wang, Z., Tao, Y., et al. (2007). Blockade of AP-1 activity by dominant-negative TAM67 can abrogate the oncogenic phenotype in latent membrane protein 1-positive human nasopharyngeal carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 46, 901–911.
- Juhlin, C., Mete, O., & Baloch, Z. W. (2022). The 2022 WHO classification of thyroid tumors: Novel concepts in nomenclature and grading. *Endocrine-Related Cancer*, 30(2), e220293. <https://doi.org/10.1530/ERC-22-0293>
- Kaji, M., Moriyama, S., Sasaki, H., Saitoh, Y., Kiriya, M., et al. (2003). Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in lung cancer studied using film in situ zymography stamp method. *Lung Cancer*, 39(2), 125–130. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(02\)00453-1](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(02)00453-1)
- Kamiya, N., Kishimoto, T., Suzuki, H., Sekita, N., Nagai, Y., et al. (2003). Increased in situ gelatinolytic activity in renal cell tumor tissues correlates with tumor size, grade and vessel invasion. *International Journal of Cancer*, 106(4), 480–485. <https://doi.org/10.1002/ijc.11272>
- Kaneyoshi, T., Nakatsukasa, H., Higashi, T., Fujiwara, K., Naito, I., et al. (2001). Actual invasive potential of human hepatocellular carcinoma revealed by in situ gelatin zymography. *Clinical Cancer Research*, 7(12), 4027–4032.

- Kanomata, N., Hasebe, T., Moriya, T., & Ochiai, A. (2013). Simultaneous demonstration of gelatinolytic activity, morphology, and immunohistochemical reaction using zymography film. *Medical Molecular Morphology*, 46(4), 193-197. <https://doi.org/10.1007/s00795-013-0021-4>
- Kawamura, K., Kamiya, N., Suyama, T., Shimbo, M., Oosumi, N., et al. (2004). In situ gelatinolytic activity correlates with tumor progression and prognosis in patients with bladder cancer. *The Journal of Urology*, 172(4 Pt 1), 1480-1484. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000137749.99255.3e>
- Kim, H. I., Hyeon, J., Park, S. Y., Ahn, H. S., Kim, K., et al. (2019). Impact of Extranodal Extension on Risk Stratification in Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 29(7), 963–970. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0541>
- Koskensalo, S., Hagström, J., Linder, N., Lundin, M., Sorsa, T., et al. (2012). Lack of MMP-9 expression is a marker for poor prognosis in Dukes' B colorectal cancer. *BMC clinical pathology*, 12, 24. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-12-24>
- Koyama, H., Iwata, H., Kuwabara, Y., Iwase, H., Kobayashi, S., et al. (2000). Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma: A study using in situ zymography. *European Journal of Cancer*, 36(16), 2164–2170. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00297-5](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00297-5)
- Lacchini, R., Jacob-Ferreira, A. L., Luizon, M. R., Coeli, F. B., Izidoro-Toledo, T. C., et al. (2010). Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 411(23-24), 1940-1944. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.008>
- Lei, H., Hemminki, K., Altieri, A., Johansson, R., Enquist, K., et al. (2007). Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: Few associations with breast cancer susceptibility and progression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 103(1), 61-69. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9345-2>
- Li, H., Qiu, Z., Li, F., & Wang, C. (2017). The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncology letters*, 14(5), 5865–5870. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6924>
- Lin, C. M., Zeng, Y. L., Xiao, M., Mei, X. Q., Shen, L. Y., et al. (2017). The relationship between MMP-2-1306C/T and MMP-9-1562C/T polymorphisms and the risk and prognosis of T-cell acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population: A case-control study. *Cell Physiology and Biochemistry*, 42, 1458-1468.
- LiVolsi, V. A. (2011). Papillary thyroid carcinoma: An update. *Modern Pathology*, 24(Suppl 2), S1-S9. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.129>
- Lloyd, R. V., Buehler, D., & Khanafshar, E. (2011). Papillary thyroid carcinoma variants. *Head and Neck Pathology*, 5(1), 51-56.
- Löffek, S., Schilling, O., & Franzke, C. W. (2011). Series "Matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: A critical balance. *European Respiratory Journal*, 38(1), 191-208. <https://doi.org/10.1183/09031936.00146510>
- Maeda, S., Haneda, M., Guo, B., Koya, D., Hayashi, K., et al. (2001). Dinucleotide repeat polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with diabetic nephropathy. *Kidney International*, 60(4), 1428-1434. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00945.x>
- Maeta, H., Ohgi, S., & Terada, T. (2001). Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Archiv*, 438(2), 121-128. <https://doi.org/10.1007/s004280000286>
- Marecko, I., Cvejic, D., Selemetjev, S., Paskas, S., Tatic, S., et al. (2014). Enhanced activation of matrix metalloproteinase-9 correlates with the degree of papillary thyroid carcinoma infiltration. *Croatian Medical Journal*, 55(2), 128-137. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.128>
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., et al. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation

- and synergize with NF-kappa B. *EMBO Journal*, 21(15), 4104-4113. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf389>
- Matsumura, S., Oue, N., Nakayama, H., Kitadai, Y., Yoshida, K., et al. (2005). A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(1), 19-25. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0621-4>
- Medley, T. L., Cole, T. J., Dart, A. M., Gatzka, C. D., & Kingwell, B. A. (2004). Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), 1479-1484. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000135656.49158.95>
- Meng, X., Hua, T., Zhang, Q., Pang, R., Zheng, G., et al. (2012). Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in papillary thyroid carcinomas. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 3075-3079.
- Mils, V., Piette, J., Barette, C., Veyrone, J., Tesniere, A., et al. (1997). The proto-oncogene c-fos increases the sensitivity of keratinocytes to apoptosis. *Oncogene*, 14, 1555-1561.
- Miranda-Filho, A., Lortet-Tieulent, J., Bray, F., Cao, B., Franceschi, S., et al. (2021). Thyroid cancer incidence trends by histology in 25 countries: a population-based study. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 9(4), 225-234. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00027-9)
- Mishra, M., Flaga, J., & Kowluru, R. A. (2016). Molecular mechanism of transcriptional regulation of matrix metalloproteinase-9 in diabetic retinopathy. *Journal of Cellular Physiology*, 231, 1709-1718. <https://doi.org/10.1002/jcp.25268>
- Miyauchi, A., Kudo, T., Miya, A., Kobayashi, K., Ito, Y., et al. (2011). Prognostic impact of serum thyroglobulin doubling-time under thyrotropin suppression in patients with papillary thyroid carcinoma who underwent total thyroidectomy. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 21(7), 707-716. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.0355>
- Mondal, S., Adhikari, N., Banerjee, S., Amin, S. A., & Jha, T. (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *European journal of medicinal chemistry*, 194, 112260. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112260>
- Morton, S., Davis, R. J., McLaren, A., & Cohen, P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *The EMBO journal*, 22(15), 3876-3886. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg388>
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
- Nakamura, H., Ueno, H., Yamashita, K., Shimada, T., Yamamoto, E., et al. (1999). Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Research*, 59(2), 467-473.
- Naveed, N., Javed, U., Atiq, U., Ahmad, S., Maqsood, K., et al. (2023). Alterations in serum thyroid and reproductive hormone levels in occupationally exposed pesticide sprayers. *Albus Scientia*, 2023, 1-6. <https://doi.org/10.56512/AS.2023.1.e230504>
- Nelissen, I., Dubois, B., Goris, A., Ronsse, I., Carton, H., et al. (2002). Gelatinase B, PECAM-1, and MCP-3 gene polymorphisms in Belgian multiple sclerosis. *Journal of Neurological Sciences*, 200, 43-48. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(02\)00107-1](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(02)00107-1)
- Nelissen, I., Vandenbroeck, K., Fiten, P., Hillert, J., Olsson, T., et al. (2000). Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not a susceptibility factor for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 105, 58-63. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(00\)00371-5](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(00)00371-5)
- Nikiforov, Y. E., Rowland, J. M., Bove, K. E., Monforte-Munoz, H., & Fagin, J. A. (1997). Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer research*, 57(9), 1690-1694.
- Özgen, A. G., Karadeniz, M., Erdogan, M., & Berdeli, A. (2008). Matrix metalloproteinases (MMP)-1, -2, and -9 gene polymorphism in papillary thyroid cancers (PTC). *The Endocrinologist*, 18(3), 137-141. <https://doi.org/10.1097/ten.0b013e318174bca3>

- Patel, B. P., Shah, P. M., Rawal, U. M., Desai, A. A., Shah, S. V., et al. (2005). Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, *90*, 81–88. <https://doi.org/10.1002/jso.20240>
- Peters, D. G., Kassam, A., St Jean, P. L., Yonas, H., & Ferrell, R. E. (1999). Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke*, *30*(12), 2612–2616. <https://doi.org/10.1161/01.str.30.12.2612>
- Prathipaa, R., Priyathersini, N., & Thanka, J. (2021). Expression of matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer. *Cureus*, *13*(9), e18195. <https://doi.org/10.7759/cureus.18195>
- Pujada, A., Walter, L., Patel, A., Bui, T. A., Zhang, Z., et al. (2017). Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer. *Oncotarget*, *8*(55), 94650–94665. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21841>
- Ra, H. J., & Parks, W. C. (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology*, *26*(8), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.07.001>
- Raivich, G. (2008). c-Jun expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair. *Journal of Neurochemistry*, *107*(4), 898–906. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05684.x>
- Ralhan, R., Veyhl, J., Chaker, S., Assi, J., Alyass, A., et al. (2015). Immunohistochemical Subcellular Localization of Protein Biomarkers Distinguishes Benign from Malignant Thyroid Nodules: Potential for Fine-Needle Aspiration Biopsy Clinical Application. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, *25*(11), 1224–1234. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0114>
- Randolph, G. W., Duh, Q. Y., Heller, K. S., LiVolsi, V. A., Mandel, S. J., et al. (2012). The prognostic significance of nodal metastases from papillary thyroid carcinoma can be stratified based on the size and number of metastatic lymph nodes, as well as the presence of extranodal extension. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, *22*(11), 1144–1152. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0043>
- Robert, I., Aussems, M., Keutgens, A., Zhang, X., Hennuy, B., et al. (2009). Metalloproteinase-9 gene induction by a truncated oncogenic NF-kappaB2 protein involves the recruitment of MLL1 and MLL2 H3K4 histone methyltransferase complexes. *Oncogene*, *28*, 1626–1628. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.5>
- Rollin, J., Régina, S., Vourc'h, P., Iochmann, S., Bléchet, C., et al. (2007). Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, *56*(2), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.11.021>
- Schweigert, D., Valuckas, K. P., Kovalcis, V., Ulys, A., Chvatovic, G., et al. (2013). Significance of MMP-9 expression and MMP-9 polymorphism in prostate cancer. *Tumori*, *99*(4), 523–529. <https://doi.org/10.1700/1348.14645>
- Scorilas, A., Karameris, A., Arnogiannaki, N., Ardavanis, A., Bassilopoulos, P., et al. (2001). Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: A potential favorable indicator in node-negative patients. *British Journal of Cancer*, *84*(11), 1488–1496. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1810>
- SEER. Surveillance Research Program, National Cancer Institute. (n.d.). *SEERExplorer: An interactive website for SEER cancer statistics**. Retrieved February 23, 2023, from <https://seer.cancer.gov/explorer/>
- Sekhon, B. S. (2010). Matrix metalloproteinases—an overview. *Research and Reports in Biology*, *1*, 1–20.
- Shaulian, E., & Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, *20*, 2390–2400.
- Shimajiri, S., Arima, N., Tanimoto, A., Murata, Y., Hamada, T., et al. (1999). Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Letters*, *455*(1-2), 70–74. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00863-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00863-7)

- Sillanpää, S., Anttila, M., Voutilainen, K., Ropponen, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., et al. (2007). Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, *104*(2), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.09.004>
- Singh, R. D., Haridas, N., Patel, J. B., Shah, F. D., Shukla, S. N., et al. (2010). Matrix metalloproteinases and their inhibitors: Correlation with invasion and metastasis in oral cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *25*(3), 250–259. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0060-8>
- Siwik, D. A., Pagano, P. J., & Colucci, W. S. (2001). Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, *280*(1), C53–C60. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.1.C53>
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., & Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, *354*(6353), 494–496. <https://doi.org/10.1038/354494a0>
- Smith, L. M., Wise, S. C., Hendricks, D. T., Sabichi, A. L., Bos, T., et al. (1999). cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*, *18*(44), 6063–6070. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202989>
- Sottrup-Jensen, L., & Birkedal-Hansen, H. (1989). Human fibroblast collagenase- α -macroglobulin interactions: Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian α -macroglobulins. *Journal of Biological Chemistry*, *264*, 393–401.
- Spangler, B., Vardimon, L., Bosserhoff, A. K., & Kuphal, S. (2011). Post-transcriptional regulation controlled by E-cadherin is important for c-Jun activity in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *24*(1), 148–164. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00787.x>
- Stathatos, N. (2019). Anatomy and physiology of the thyroid gland. In M. Luster, L. Duntas, & L. Wartofsky (Eds.), *The thyroid and its diseases* (pp. 1-18). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72102-6_1
- Szabo, E., Riffe, M. E., Steinberg, S. M., Birrer, M. J., & Linnoila, R. I. (1996). Altered cJUN expression: An early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Research*, *56*(2), 305–315.
- Tanaka, A., Matsuse, M., Saenko, V., Nakao, T., Yamanouchi, K., et al. (2019). TERT mRNA Expression as a Novel Prognostic Marker in Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, *29*(8), 1105–1114. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0695>
- Tian, M., Cui, Y. Z., & Song, G. H. (2008). Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1, and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Cancer*, *241*, 1–11.
- Toraih, E. A., Hussein, M. H., Zerfaoui, M., Attia, A. S., Marzouk Ellythy, A., et al. (2021). Site-specific metastasis and survival in papillary thyroid cancer: The importance of brain and multi-organ disease. *Cancers (Basel)*, *13*(7), 1625. <https://doi.org/10.3390/cancers13071625>
- Tschesche, H., Zölzer, V., Triebel, S., & Bartsch, S. (2001). The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *European Journal of Biochemistry*, *268*(7), 1918–1928. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02066.x>
- Vaccarella, S., Franceschi, S., Bray, F., Wild, C. P., Plummer, M., et al. (2016). Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis. *The New England journal of medicine*, *375*(7), 614–617. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1604412>
- Vander, A. J., Sherman, J. H., & Luciano, D. S. (2001). *Human physiology: The mechanisms of body function* (8th ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Vandooren, J., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2013). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *48*(3), 222–272. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.770819>

- Vilen, S. T., Salo, T., Sorsa, T., & Nyberg, P. (2013). Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *The Scientific World Journal*, 2013, 920595. <https://doi.org/10.1155/2013/920595>
- Vleugel, M. M., Greijer, A. E., Bos, R., van der Wall, E., & van Diest, P. J. (2006). c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Human Pathology*, 37(6), 668–674. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.01.022>
- Volante, M., Lam, A. K., Papotti, M., & Tallini, G. (2021). Molecular pathology of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer: What do pathologists need to know? *Endocrine Pathology*, 32(1), 63–76. <https://doi.org/10.1007/s12022-021-09665-2>
- Vosseler, S., Lederle, W., Airola, K., Obermueller, E., Fusenig, N. E., et al. (2009). Distinct progression-associated expression of tumor and stromal MMPs in HaCaT skin SCCs correlates with onset of invasion. *International Journal of Cancer*, 125(10), 2296-2306. <https://doi.org/10.1002/ijc.24589>
- Vries, R. G., Prudenziati, M., Zwartjes, C., Verlaan, M., Kalkhoven, E., et al. (2001). A specific lysine in c-Jun is required for transcriptional repression by E1A and is acetylated by p300. *EMBO Journal*, 20(21), 6095-6103. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6095>
- Walter, L., Pujada, A., Mohammadian, S., Bialkowska, A., Yang, V., et al. (2016). Matrix metalloproteinase 9 has a novel tumor suppressive role in inflammation-associated colorectal cancer by modulating intrinsic tumor microenvironment. *Cancer Research*, 76, 3670-3670.
- Wang, H., Birkenbach, M., & Hart, J. (2000). Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 21(7), 1313-1317. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.7.1313>
- Wang, N., Jiang, R., Yang, J. Y., Tang, C., Yang, L., et al. (2014). Expression of TGF- β 1, SNAIL and MMP-9 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Journal of molecular histology*, 45(4), 391–399. <https://doi.org/10.1007/s10735-013-9557-9>
- Wang, Y. N., Chen, Y. J., & Chang, W. C. (2006). Activation of extracellular signal-regulated kinase signaling by epidermal growth factor mediates c-Jun activation and p300 recruitment in keratin 16 gene expression. *Molecular Pharmacology*, 69(1), 85-98. <https://doi.org/10.1124/mol.105.016220>
- Wang, Y., Fang, S., Wei, L., Wang, R., Jin, X., et al. (2005). No association between the C-1562T polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 49(2), 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.04.006>
- Wen, J., Qin, X., Zhang, J., Wu, X., Yan, X., et al. (2023). Clinical significance of matrix metalloproteinase-9 expression in papillary thyroid carcinoma: A meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 21(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s12957-023-03101-x>
- Weng, Y., Cai, M., Zhu, J., Geng, J., Zhu, K., et al. (2013). Matrix metalloproteinase activity in early-stage lung cancer. *Onkologie*, 36, 256-259. <https://doi.org/10.1159/000350304>
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A., et al. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17213-17221. Erratum in: *Journal of Biological Chemistry*, 265(36), 22570.
- Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J., & Werb, Z. (2020). Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nature Communications*, 11(1), 5120. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>
- Woessner, J. F. Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal*, 5(8), 2145-2154.
- Woo, M., Park, K., Nam, J., & Kim, J. C. (2007). Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(7), 1064-1070. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04424.x>
- Wu, Z., Nicoll, M., & Ingham, R. J. (2021). AP-1 family transcription factors: A diverse family of proteins that regulate varied cellular activities in classical Hodgkin lymphoma and ALK+

- ALCL. *Experimental Hematology & Oncology*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00197-9>
- Xiao, C., Huang, Y., Gao, Q., Feng, Z., Li, Q., et al (2019). Expression of activator protein-1 in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance. *World Journal of Surgical Oncology*, 17(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12957-019-1568-x>
- Xie, J., Zhang, X., & Zhang, L. (2013). Negative regulation of inflammation by SIRT1. *Pharmacological Research*, 67(1), 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.010>
- Xing M. (2019). Genetic-guided Risk Assessment and Management of Thyroid Cancer. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 48(1), 109–124. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.11.007>
- Xu, H., Jin, X., Yuan, Y., Deng, P., Jiang, L., et al. (2017). Prognostic value from integrative analysis of transcription factors c-Jun and Fra-1 in oral squamous cell carcinoma: A multicenter cohort study. *Scientific Reports*, 7(1), 7522. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05106-5>
- Yang, B., Tang, F., Zhang, B., Zhao, Y., Feng, J., et al. (2014). Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer. *World journal of surgical oncology*, 12, 24. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-24>
- Zarkesh, M., Zadeh-Vakili, A., Akbarzadeh, M., Fanaei, S. A., Hedayati, M., et al. (2018). The role of matrix metalloproteinase-9 as a prognostic biomarker in papillary thyroid cancer. *BMC cancer*, 18(1), 1199. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5112-0>
- Zhang, B., Dhillon, S., Geary, I., Howell, W. M., Iannotti, F., et al. (2001). Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 32, 2198-2202. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.10.2198>
- Zhang, B., Ye, S., Herrmann, S. M., Eriksson, P., de Maat, M., et al. (1999). Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 99(14), 1788-1794. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.14.1788>
- Zhang, H., Zhao, B., Zhai, Z. G., Zheng, J. D., Wang, Y. K., et al. (2021). Expression and clinical significance of MMP-9 and P53 in lung cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(3), 1358-1365. https://doi.org/10.26355/eurrev_202102_24844

<https://healthjade.com/thyroid-gland/>

<https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=32>

<https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=32&types=1>

<https://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillaryclassic.html>

Biografija autora

Jelena V. Rončević, rođena 29. septembra 1987. godine u Beogradu, završila je osnovne akademske studije 2014. godine, u okviru modula Molekularna biologija fiziologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Master akademske studije je završila 2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, nakon odbranjene master teme pod naslovom: “Glikobiohemijska karakterizacija mucina semene tečnosti čoveka”, čime je stekla zvanje master biologa. Doktorske akademske studije, studijski program Biologiju, modul Biologija ćelija i tkiva, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2017/2018 godine. Od 2017. godine je zaposlena na Institutu za primenu nuklearne energije – INEP, na odeljenju za endokrinologiju i radioimunologiju, gde je i uradila eksperimentalni deo doktorske disertacije.

Do sada je objavila 7 radova u međunarodnim časopisima. Imala je 10 saopštenja na naučnim skupovima domaćeg i međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Рончевић

број индекса 63026/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Полиморфизми у промотору гена за матриксну металопротеиназу 9 и статус ацетилације c-Jun као потенцијални прогностички маркери папиларног тироидног карцинома код човека“

- 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.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Рончевић

Број индекса Б3026/2017

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада Полиморфизми у промотору гена за матриксну металопроотеиназу 9 и статус ацетилације c-Jun као потенцијални прогностички маркери папиларног тироидног карцинома код човека

Ментори др Илона Ђорић, виши научни сарадник Института за примену нуклеарне енергије
др Мирела Укропина, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Потписани/а Јелена В. Рончевић

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.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Полиморфизми у промотору гена за матриксну металопротеиназу 9 и статус ацетилације c-Jun као потенцијални прогностички маркери папиларног тироидног карцинома код човека

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, _____

1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.