



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Стефан З. Благојевић

**Експресија микроРНК и њихових
регулаторних гена као дијагностички
параметар у раном стадијуму карцинома
ендометријума**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Stefan Z. Blagojević

**Expression of microRNA and their
regulatory genes as diagnostic parameter
in early stage endometrial cancer**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Аутор	
Име и презиме: Стефан З. Благојевић	
Датум и место рођења: <i>05.08.1993. Крагујевац</i>	
Садашње запослење: <i>истраживач сарадник на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу</i>	
Докторска дисертација	
Наслов: Експресија микроРНК и њихових регулаторних гена као дијагностички параметар у раном стадијуму карцинома ендометријума	
Број страница: 105	
Број слика: 12 слика	
Број библиографских података: 224	
Установа и место где је рад израђен: <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>	
Научна област (УДК): Биолошке науке - Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија (577.2:618.14-006(497.11)(043.3))	
Ментор: <i>Др Данијела Цветковић, доцент, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу и др Милена Милутиновић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>	
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: <i>IV-01-91/6, 21.02.2024. године</i>	

Захвалница

Највећу захвалност дугујем **доц. др Данијели Цветковић** на прилици коју ми је пружила, вођству и усмеравању током мог истраживачког пута. Својим стручним саветима пружила ми је бескрајну подршку, помоћ и охрабривање током израде ове докторске дисертације. Велика част и задовољство ми је што сам имао прилике да усвајам сво знање и вештине од стручњака као што је она. Веома сам захвалан на огромној количини разумевања, стрпљења и пријатељском односу, нарочито у тренуцима највећих изазова које смо заједничким снагама пребродили. Надам се да ћемо у будућности имати још пуно овако дивних и успешних сарадњи.

Огромну захвалност дугујем **доц. др Милени Милутиновић** која ми је од самог почетка нашег познанства пренела своју велику љубав према молекуларној биологији. Својим квалитетом, трудом и несебичним залагањем у огромној мери допринела је мом истраживачком раду и развијању научне свести. Захвалан сам јој што ме је својим критичким погледом на науку и константним усавршавањем, годинама уназад мотивисала да се бавим науком. Хвала јој на стручној помоћи и смерницама током израде ове докторске дисертације.

Захвалио бих се и члановима комисије **проф. др Милошу Матићу, проф. др Петру Арсенијевићу и др Зорани Добријевић** на ажурности и стручним сугестијама које су подигле овај докторски рад на виши ниво. Посебно хвала дугујем **проф. др Петру Арсенијевићу** који је омогућио прикупљање узорака и спровођење истраживања на њима.

Захваљујем се својим колегама из Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију **Данијели, Јовани, Невени, Александри, Николи и Сари** на стрпљењу, помоћи и охрабривању. Њихова позитивна енергија и ведар дух дали су ми ветар у леђа у тренуцима када ми је највише требало. Међу њима, посебно хвала **Јовани Јованкић** на великој помоћи током експерименталног рада и стрпљењу приликом решавања безбројних недоумица.

Хвала свим **пријатељима** који су ме подржавали и охрабривали. Нарочиту захвалност дугујем мојој **Сари** што је била мој ослонац, веровала у моје снове и била уз мене у сваком кораку овог пута. Њена љубав ме је инспирисала да будем најбоља верзија себе, како у професионалном, тако и у личном животу.

Неизмерно сам захвалан својој породици, мами **Мирослави**, оцу **Зорану** и браћи **Милошу и Санију** на љубави, разумевању и подршци коју ми безусловно пружају свих ових година студирања. Свој успех дугујем њима, због чега им посвећујем своју докторску дисертацију.

Стефан Благојевић

АПСТРАКТ

Карцином ендометријума (КЕ) је најчешћи малигнитет женског гениталног тракта. С обзиром на то да још увек не постоји поуздан дијагностички тест за детекцију КЕ, неопходно је истражити нове биомаркере који би могли да детектују овај тип карцинома у његовом раном стадијуму. Претходна испитивања су показала да молекули микроРНК поседује велики потенцијал у детекцији различитих болести, укључујући и малигне. Циљ докторске дисертације био је да се испита експресија молекула микроРНК (miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a), иРНК (*DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A*, *VEGFA*) и протеина (PTEN и MMP-9), као и њихов дијагностички потенцијал за детекцију КЕ у раној фази болести. Додатно, истражена је асоцијација генетичких варијанти у оквиру гена за miR-196a2 и miR-146a са ризиком за развој КЕ. Показано је да молекули miR-200a, miR-21 и miR-210 имају битну улогу у регулацији пролиферације, ангиогенезе и инвазије, с обзиром на значајну корелацију са експресијом гена *DICER1*, *PTEN* и *HIF1A* и концентрацијама протеина MMP-9 у узорцима КЕ. Профил експресије молекула miR-200a и miR-210, гена *DICER1* и *PTEN*, као и протеина MMP-9 и PTEN, испољио је снажан дијагностички потенцијал у детекцији узорака карцинома ендометријума у раном стадијуму болести. Комбиновањем ових маркера формиран су панели од три и пет различитих молекула који су показали да одлично дискриминишу пацијенткиње са КЕ у раној фази болести од бенигних промена ендометријума са AUC вредношћу од 0.958 и 0.983. Узимајући у обзир да је КЕ излечив у раном стадијуму болести, формирањем дијагностичког теста драстично би се помогло у правовременој детекцији овог карцинома и излечењу оболелих пацијенткиња. Предложени панели могу бити потенцијални кандидати за формирање дијагностичког теста због чега су неопходна даља истраживања.

Кључне речи: Карцином ендометријума, микроРНК, дијагностички маркери, miR-200a, miR-210, *DICER1*, PTEN, MMP-9

ABSTRACT

Endometrial cancer (EC) is the most prevalent type of malignancy in the female genital tract, and at present, there is no reliable diagnostic test to detect it. Therefore, it is crucial to investigate new biomarkers that can identify this type of cancer in its early stages. Numerous studies have shown that miRNA molecules have great potential for the detection of various diseases, including malignancies. This doctoral dissertation aimed to examine the expression of miRNAs molecules (miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126, and miR-130a), mRNAs (*DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A* and *VEGFA*) and proteins (PTEN and MMP-9) for the diagnosis of EC in its early stages. Furthermore, the association of genetic variants within the genes encoding miR-196a2 and miR-146a with the risk of developing EC was evaluated. It was shown that miR-200a, miR-21, and miR-210 play an important role in the regulation of proliferation, angiogenesis, and invasion, given their significant correlation with the expression of *DICER1*, *PTEN*, *HIF1A* mRNAs and MMP-9 protein. Expression profiles of miR-200a, miR-210 molecules, *DICER1* and *PTEN* mRNAs, and proteins MMP-9 and PTEN showed significant diagnostic potential for the detection of EC samples in the early stage of the disease. By combining these markers, panels of three and five different molecules were formed that showed excellent discrimination of EC patients at an early stage of the disease with AUC values of 0.958 and 0.983, respectively. Early-stage EC is curable, and the development of a diagnostic test would greatly aid in its timely detection and treatment of affected patients. The proposed panels warrant further investigation as potential candidates for diagnostic tests.

Keywords: Endometrial cancer, microRNA, diagnostic markers, miR-200a, miR-210, *DICER1*, PTEN, MMP-9

САДРЖАЈ

I УВОД	1
1. Ендометријум	1
1.1. Анатомија материце	1
1.2. Хистологија и физиологија ендометријума	1
1.3. Патологија ендометријума	2
2. Карцином ендометријума	4
2.1. Епидемиологија карцинома ендометријума	4
2.2. Фактори ризика за настанак карцинома ендометријума	5
2.3. Стандардна дијагностичка процедура за карцином ендометријума	6
2.4. Хистолошки типови карцинома ендометријума	7
2.5. Одређивање градуса карцинома ендометријума	8
2.6. Одређивање стадијума карцинома ендометријума	8
2.7. Молекуларна класификација карцинома ендометријума	9
2.8. Молекуларне основе настанка и прогресије карцинома ендометријума	11
3. Хипоксија и ангиогенеза	15
4. МикроРНК	18
4.1. Биогенеза и механизам функционисања миРНК молекула	19
4.2. Улога микроРНК у малигној трансформацији карцинома ендометријума	21
4.3. миРНК као биомаркери у дијагностици карцинома ендометријума	25
4.4. Генетичке варијанте у оквиру миРНК молекула	26
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	30
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
1. Хемикалије и реагенси	31
2. Дизајн студије и критеријуми за укључивање пацијенткиња	31
3. Изолација молекула РНК	32
4. Реверзна транскрипција	32
5. Квантитативни PCR у реалном времену	33
6. Хомогенизација ткива за одређивање концентрација протеина	34
7. Bredford-ов тест	35
8. Мерење концентрације протеина PTEN методом Sandwich ELISA	35
9. Мерење концентрације протеина MMP-9 методом Sandwich ELISA	36
10. Изолација молекула ДНК636	
11. Генотипизација генетичких варијанти PCR-RFLP методом	37
11.1. Ланчана реакција полимеризације секвенци гена за miR-196a2 и miR-146a ...	37
11.2. Провера успешности реакције	37
11.3. Анализа полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (RFLP)	38
12. Статистичка обрада података	39

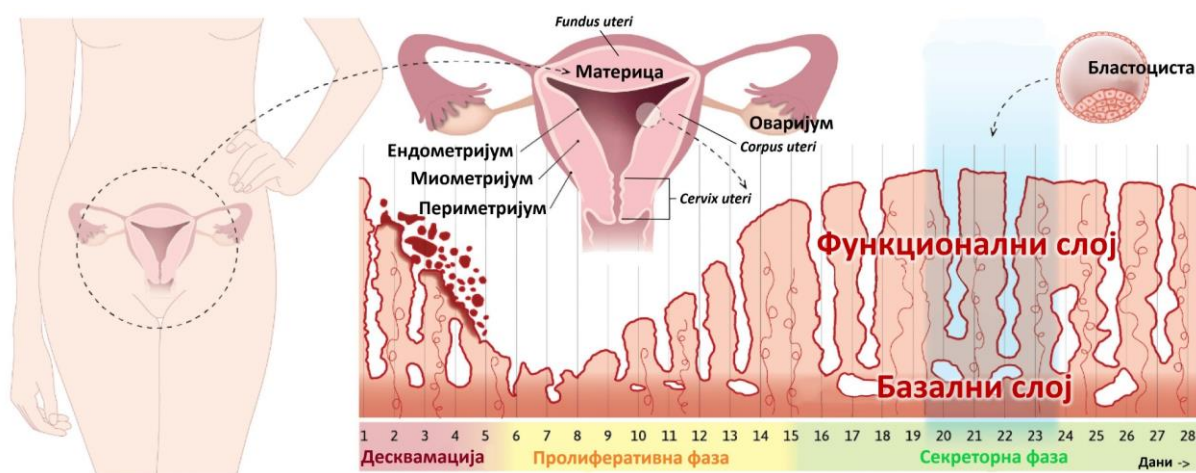
IV РЕЗУЛТАТИ	40
1. Основне клиничке карактеристике пацијенткиња укључених у студију	40
2. Патохистолошке карактеристике КЕ	41
3. Анализа експресије миРНК, иРНК и протеина између узорак КЕ и К	41
3.1. Експресија молекула миРНК	41
3.2. Експресија молекула иРНК	42
3.3. Концентрација протеина PTEN и MMP-9	43
4. Експресија миРНК, иРНК и протеина у односу на патохистолошке карактеристике пацијенткиња са КЕ	43
5. Експресија миРНК, иРНК и протеина у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ	48
5.1. Експресија миРНК у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ	48
5.2. Експресија молекула иРНК у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ	50
5.3. Концентрација протеина PTEN и MMP-9 у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ	51
6. Анализа корелације експресије анализираних молекула	51
6.1. Међусобна корелација нивоа експресије молекула миРНК и корелација са нивоима експресије иРНК и протеина	52
6.2. Корелација нивоа експресије молекула иРНК и протеина	53
6.3. Корелација између нивоа експресије анализираних молекула и вредности патохистолошких и основних клиничких карактеристика	54
7. Дијагностички потенцијал анализираних молекула	55
7.1. Дијагностички потенцијал молекула миРНК	55
7.2. Дијагностички потенцијал молекула иРНК	56
7.3. Дијагностички потенцијал протеина PTEN и MMP-9	56
7.4. Дијагностички потенцијал комбинације потенцијалних маркера	57
8. Генотипизација генетичких варијанти у генима за miR-196a2 и miR-146a	58
8.1. Асоцијација генетичких варијанти са ризиком за развој КЕ	59
8.2. Асоцијација генетичких варијанти са патолошким карактеристикама КЕ	60
8.3. Асоцијација генетичких варијанти са основним клиничким карактеристикама пацијенткиња са КЕ и К	62
V ДИСКУСИЈА	65
VI ЗАКЉУЧЦИ	76
VII ЛИТЕРАТУРА	78
VIII ПРИЛОГ	97
Листа скраћеница	98
Биографија	101

I УВОД

1. Ендометријум

1.1. Анатомија материце

Материца је мишићни, шупљи орган смештен у карлици жена који је у просеку широк 5 cm, дугачак 8 cm и дебљине 4 cm. Материца је одговорна за различите физиолошке процесе код жена као што су трудноћа, менструација и порођај. Анатомики, материца се налази у карлици жена непосредно иза бешике и испред ректума. Дели се на четири главна анатомска сегмента (од супериорног до инфериорног): *fundus uteri* - широко закривљено подручје у којем се јајоводи спајају са материцом, *corpus uteri* - тело материце који почиње директно испод нивоа јајовода и наставља се наниже, *isthmus uteri* – сужење доњег дела тела материце и *cervix uteri* – грлић материце који се пружа наниже и отвара се у вагини (Слика 1). Материца се састоји од три слоја: периметријум – спољашњи слој материце изграђен од епителних ћелија које окружују материцу, миометријум - глатки мишићни слој који се скупља током порођаја и ендометријум - унутрашњи слој материце (de Ziegler и сар., 2016; Ellis, 2011).



Слика 1. Грађа материце и промене у ендометријуму током менструалног циклуса (преузето и модификовано из Sternberg и сар., 2021).

1.2. Хистологија и физиологија ендометријума

Ендометријум је ткиво које има кључну улогу у репродуктивном систему жена и пролази кроз цикличне промене током менструалног циклуса, реагујући на хормонске промене и служећи као место за имплантацију ембриона током трудноће. Ендометријум (Слика 1) се састоји од танког базалног слоја (*stratum basalis*) и дебљег функционалног слоја (*stratum functionalis*). Базални слој служи као извор нових ћелија које регенеришу функционални слој ендометријума након менструације. Функционални слој је високо васкуларизован слој слузокоже, богат жлездама, који пролази кроз месечне цикличне промене као одговор на хормонске сигнале и одбацује се током менструације уколико не дође до трудноће.

Ткиво ендометријума садржи различите типове ћелија, као што су жлездане епителне ћелије (облажу жлезде матере и одговорне су за секретовање супстанци неопходних за припрему и одржавање трудноће), ћелије строге (пружају структурну подршку и доприносе ремоделовању ткива током менструалног циклуса) и имуне ћелије које учествују у регулисању имунолошких одговора и штите од инфекција (Sternberg и сар., 2021; Gasner и Р А, 2023; Fitzgerald, 2023).

Основна улога ендометријума је стварање погодног окружења за имплантацију ембриона и трудноћу. Ово укључује сложену интеракцију хормонских сигнала, фактора раста и ћелијских интеракција. Менструални циклус обично траје 28 дана и подељен је на различите фазе које се поклапају са специфичним променама у ендометријуму. У првим данима менструалног циклуса, функционални слој ендометријума се одбацује због пада концентрације хормона, посебно естрогена и прогестерона, што доводи до менструалног крварења. Након престанка менструалног крварења, ендометријум прелази у пролиферативну фазу. Повећан ниво естрогена подстиче регенерацију функционалног слоја, што доводи до задебљања ендометријума и раста жлезда. Након овулације, која се обично дешава око средине менструалног циклуса, долази до лучења прогестерона који омогућава прелазак ендометријума у секреторну фазу. Током секреторне фазе, жлезде сазревају и ослобађају нутријенте за потенцијални ембрион. У случају оплодње и накнадне имплантације, ендометријум наставља своју улогу у подршци ембриона током развоја, снабдевањем хранљивих материја и одржавањем стабилног окружења (Diedrich и сар., 2007; Fitzgerald, 2023).

1.3. Патологија ендометријума

Поремећај у равнотежи хормона, посебно повишен ниво естрогена, може изазвати неправилне менструалне циклусе и промене на нивоу ендометријума. Прекомерна пролиферација ендометријума може бити последица хормонског дисбаланса и повећати ризик од настанка различитих тумора ендометријума (Fitzgerald, 2023). Услед поремећаја у регулацији пролиферације, диференцијације и апоптозе настају клонови ћелија које се независно размножавају и стварају масу нежељеног ткива, односно тумор. Тумор може бити бенигни уколико се развија у маси, при чему су ћелије окружене базалном мембраном и још увек немају способност инвазије у околно ткиво. Раст ћелија код бенигну тумора је спор са нормалном расподелом ћелијских једара (Jurišić и Živančević-Simonović, 2002).

За разлику од бенигног, малигни тумори расту веома брзо, нису окружени капсулом и имају способност инвазије у околна ткива. Појам канцер, односно рак, се односи на малигне туморе које имају способност инвазије. Малигно трансформисане ћелије имају способност да уђу у крвни или лимфни систем и да формирају секундарне туморе на местима која су удаљена од примарног места настанка тумора (метастазе). Карциноми представљају малигне туморе епителног порекла (Jurišić и Živančević-Simonović, 2002; Alberts и сар., 2008). Неконтролисани раст абнормалних ћелија у ендометријуму може довести до развоја карцинома, наглашавајући значај редовних скрининга и раног откривања.

Патолошке промене ендометријума могу се поделити на бенигне и малигне (Makker и сар., 2021).

1.3.1. Бенигне промене ендометријума

Полипи ендометријума представљају абнормалну пролиферацију жлезда и строме ендометријума који проминирају у материчну дупљу. Полипи се најчешће формирају у репродуктивној али могу се јавити и у постменопаузалној фази живота. Иако се сматрају бенигним творевинама, постоји мала вероватноћа за малигну трансформацију. Због повећане концентрације естрогенских рецептора у ћелијама жлезда полипа, сматра се да естроген има утицај на раст полипа. Поред наведеног, поремећај у експресији Bcl-2 (енгл. *B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 Protein*), VEGF (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*) и TGF- β (енгл. *Transforming Growth Factor Beta*) је такође примећен код ендометријалних полипа у односу на нормалан ендометријум (Nijkang и сар., 2019; Mansour и Chowdhury, 2023).

Ендометриоза је хронично гинеколошко стање које карактерише присуство функционалног ендометријалног ткива на локацијама и органима ван материце. Клинички знаци ендометриозе укључују хроничан туп бол у карлици, поремећаје менструационог циклуса и најчешће инфертилитет. С обзиром да је ектопично ткиво ендометријума функционално и подложно реактивним хормонским променама током менструалног циклуса, болест је хронична и најчешће прогресивна. Фактори узрока ендометриозе су веома сложени јер патогенеза упућује на бројне генетске, хормонске, имунолошке факторе и различите факторе животне средине (Chauhan и сар., 2022).

Аденомиоза је стање где ткиво ендометријума прераста у миометријум. Ова инфилтрација може довести до низа симптома као што су хронични бол у карлици, јаки менструални грчеви, обилно менструално крварење и стерилитет у одређеним случајевима. Међутим, код једне трећине пацијенткиња појава аденомиозе може бити асимптоматска. Тачан узрок аденомиозе није у потпуности познат, али се верује да је повезан са хормонском дисбалансом (Pados и сар., 2023).

Хиперплазија ендометријума се карактерише прекомерним растом ендометријалних жлезда. Ова промена настаје услед прекомерне стимулације естрогенима без супротстављајућег ефекта прогестерона. Абнормална пролиферација ендометријума доводи до неправилног односа између жлезда и строме, која се манифестује низом промена у ткиву ендометријума. Ово стање обухвата спектар патохистолошких компликација и присуство атипичних ћелијских и нуклеарних карактеристика. Ако се не лечи, хиперплазија ендометријума има потенцијал да напредује до малигну тумора ендометријума. Хиперплазија ендометријума се може поделити на атипичну и без атипичне. Код хиперплазије ендометријума без атипичне, однос жлезде и строме, је повећан у корист жлезде на више од 50%. Жлезде могу показати благо гужвање, цистичну дилатацију са ретко видљивим изливањем и митозом. Код хиперплазије ендометријума са атипичном, однос жлезде и строме се даље повећава. Присутна је дезорганизација жлезданих ћелија са луминалним излазом, једарна атипична и митоза ћелија. Хиперплазија без атипичне не укључује значајне генетске промене, док је атипична хиперплазија ендометријума повезана са мутацијама у *PTEN* (енгл. *Phosphatase And Tensin Homolog*) и *KRAS* (енгл. *Kirsten Rat Sarcoma Viral oncogene homolog*) генима (Emons и сар., 2015; Sanderson и сар., 2017; Singh и сар., 2024).

2. Карцином ендометријума

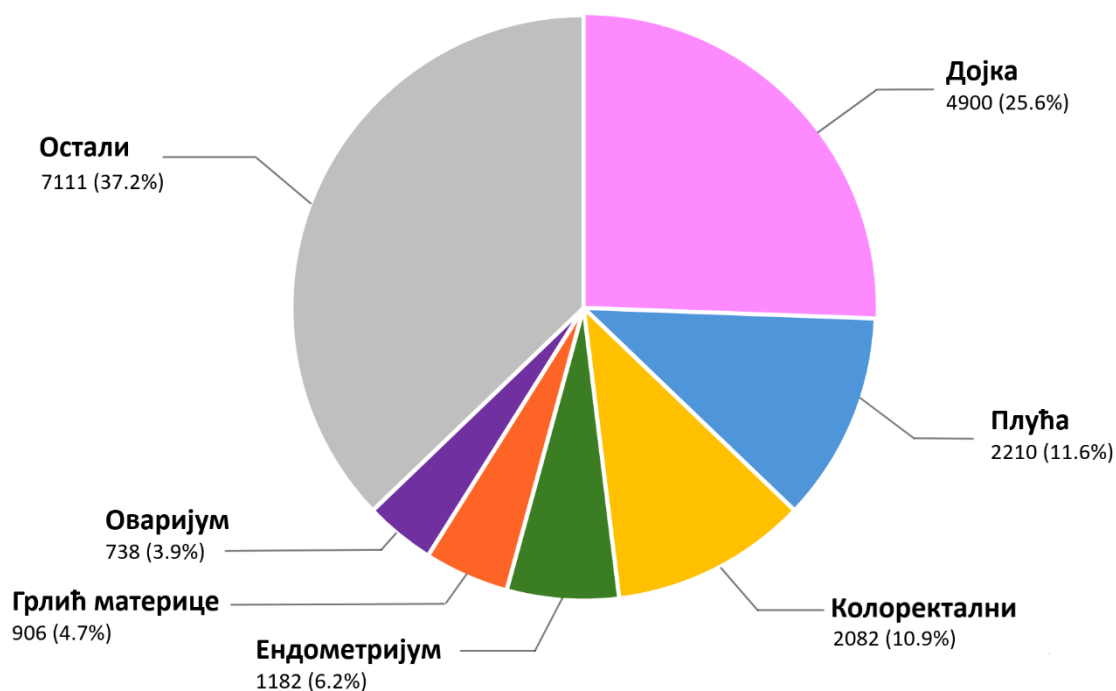
Карцином ендометријума (КЕ) представља малигнитет унутрашњег епителног слоја материце. Као и код осталих малигних тумора, КЕ такође показује нагомилавање генетских промена које резултирају деактивацијом тумор-супресорских гена, активацију протоонкогена, поремећај система за репарацију оштећења ДНК молекула (MMR, енгл. *DNA Mismatch Repair*) и неконтролисан раст ћелија (Weinberg, 2014). Често се сматра хормонски-зависном болешћу, која се јавља због прекомерне стимулације естрогена на унутрашњој слузници материце. Овај вишак естрогена покреће деобу ћелија и током времена трансформацију жлезданих ћелија ендометријума, што доводи до формирања преовлађујућих и мање агресивних ендометроидних карцинома ендометријума (ЕКЕ). Фактори који повећавају ризик од повишеног нивоа естрогена укључују гојазност, дуготрајна употреба хормонске терапије, рана менарха, касна менопауза, ановулаторни циклуси, као и развој тумора који производе хормоне. Други хистолошки подтипови КЕ (серозни, светлоћелијски, недиференцирани и карциносаркоми) нису тако често повезани са прекомерним излагањем естрогена и спадају у групу агресивних карцинома (Makker и сар., 2021).

2.1. Епидемиологија карцинома ендометријума

КЕ представља најчешћи карцином женског гениталног тракта. Према подацима глобалне опсерваторије за рак (GCO, енгл. *Global Cancer Observatory*) у оквиру међународне агенције за истраживање рака (IARC, енгл. *International Agency for Research on Cancer*), КЕ је четврти малигнитет по процентуалној заступљености (5.9%) код жена у Европи са процењеном годишњом преваленцом од око 125000 случајева, током 2022. године (<https://gco.iarc.fr/en>).

У Републици Србији КЕ такође заузима четврто место (6.2%) са 1182 забележених случајева током 2022. године (Графикон 1), одмах након малигних тумора дојке (25.6%), плућа (11.6%) и колоректалних (10.9%). Процењене старосне стандардизоване стопе инциденце за КЕ износе 14.4 на 100000 жена (<https://gco.iarc.fr/en>).

Малигни тумори ендометријума налазе се на деветом месту према процењеној старосној стандардизованој стопи морталитета која износи 3 на 100.000 жена, са укупно 312 забележених смртних исхода током 2022. године у Републици Србији. Највећи проценат морталитета су показали карциноми плућа (18.2%), дојке (17.9), колоректални карцином (11%), панкреаса (6.3%), грлића материце (4.9%) и оваријума (4.6%), док је КЕ био узрок смрти код 3% оболелих жена од малигних тумора (<https://gco.iarc.fr/en>). Иако се КЕ може јавити код жена у различитом старосном добу, најчешће се идентификује код особа између 55 и 64 године, са медијаном од 63 године.



Графикон 1. Број случајева малигних тумора жена и проценат заступљености у Републици Србији за 2022. годину.

Стопа инциденце и морталитета за КЕ је у константном порасту од 2007. године, при чему се агресивнији типови КЕ све чешће појављују. Због тога је и стопа морталитета у бржем порасту у односу на стопу инциденце (Chelmow и сар., 2022). Географски, социо-економски и етнички статус жена могу да утичу на стопу учесталости и морталитета КЕ. Студије су показале да је КЕ заступљенији у високо развијеним земљама у поређењу са ниско развијеним земљама. Фактори који доприносе географским разликама могу бити приступ високо квалитетној здравственој заштити пацијената. Дијагноза КЕ у узнапредовалом стадијуму и ниска стопа преживљавања је додатно примећена код жена са ниским социо-економским статусом (Makker и сар., 2021; Zhang и сар., 2022a).

2.2. Фактори ризика за настанак карцинома ендометријума

Главни фактор ризика за развој хиперплазије ендометријума без атипиче и неагресивног типа КЕ је дуготрајно излагање повишеним нивоима естрогена без адекватног супротстављања (физиолошки сразмерног одговора) прогестероном. Овај хормонски дисбаланс може настати услед различитих стања. Узрок прекомерне стимулације естрогеном може да буде егзоген и/или ендеген. Егзогени узроци укључују терапију естрогеном, хормонску супституциону терапију и тамоксифен који се користи у лечењу карцинома дојке. Хронични изостанак овулације, перименопауза, синдром полицистичних јајника, гојазност и тумори јајника који луче естроген могу бити ендегени узрок (Raglan и сар., 2019).

- **Естрогенска терапија:** бројне студије су пријавиле повећани ризик за развој КЕ код пацијенткиња које су користиле само естроген, при чему се ризик повећао за 1.5 до 10 пута у зависности од дозе и дужине трајања терапије (Beral и сар., 2005).
- **Тамоксифен** је селективни модулатор рецептора за естроген са агонистичким или антагонистичким особина, што зависи од типа органа и нивоа естрогена у серуму. У ткиву ендометријума, тамоксифен се понаша као агонист естрогена код жена у постменопаузи чиме повећава ризик за развој КЕ (Ghanavati и сар., 2023).
- Пацијенткиње са **хроничним изостанком овулације** континуирано производе полне стероидне hormone, уместо циклично, због чега не долази до цикличних промена у ендометријуму. Хронична производња естрогена без адекватне производње прогестерона омогућава неконтролисану пролиферацију ендометријума, што може довести до хиперплазије и КЕ (Ignatov и Ortmann, 2020).
- **Гојазност:** гојазне пацијенткиње могу имати снижене нивое глобулина који везују полне hormone у циркулацији (што доводи до повећане активности стероидних hormone), промене у концентрацији фактора раста сличног инсулину и инсулинску резистенцију. Овакве промене могу допринети повећаном ризику од настанка КЕ (Onstad и сар., 2016).
- **Тумори који секретују естроген**, као што је тумор гранулозних ћелија јајника, који је често повезан са хиперплазијом ендометријума и КЕ. Код пацијенткиња са овим тумором, хиперплазија ендометријума се открива у 25 до 50% случајева, а КЕ у 5 до 10% пацијенткиња (Schumer и Cannistra, 2003).
- **Рано доба менархе и касна менопауза** могу бити један од ризика за развој КЕ због продуженог времена излагања естрогеном (Gong и сар., 2015).
- **Наследни фактори: *Lynch*-ов синдром (наследни неполипозни колоректални карцином)** је поремећај у мутацији једног или неколико MMR гена. Пацијенткиње са овим синдромом имају до 71% већи ризик од развоја КЕ у поређењу са општом популацијом. Најчешће се појављује КЕ са ендометријалном хистологијом у раном стадијуму (Domènech и сар., 2021). ***Cowden*-ов синдром** се карактерише мутацијом у тумор-супресор гену *PTEN*, са карактеристичним лезијама слузокоже. Пацијенткиње са овим синдромом имају високу преваленцу миома материце и повећан ризик за развој КЕ (Gammon и сар., 2016).

2.3. Стандардна дијагностичка процедура за карцином ендометријума

С обзиром на то да адекватан скрининг тест за КЕ не постоји, тренутна дијагностика се ослања на испољавање симптома, као што је абнормално крварење из утеруса. Међутим, овај симптом је чест и код других болести, при чему само 10-15% жена са оваквим крварењем развијају КЕ. Стандардне процедуре у дијагнози КЕ укључују гинеколошки преглед, трансвагиналну ултрасонографију, биопсију ткива ендометријума и патохистолошку верификацију КЕ (Coll-de la Rubia и сар., 2020). Трансвагинална ултрасонографија се може користити како би се видело да ли материца садржи туморску масу или да се уочи задебљање ендометријума које је веће него иначе, што може бити знак за постојање КЕ. Такође може се уочити да ли ћелије карцинома инфилтришу миометријум.

Како би се утврдио тип промена ендометријума који је присутан код пацијенткиња, неопходно је одстранити део промењеног ткива ендометријума за испитивање. Ово се може постићи биопсијом ендометријума, хистероскопијом и експлоративном киретажом. Патолози детаљним прегледом ткива дају финалну дијагнозу КЕ, одређују хистолошки тип, градус и стадијум КЕ како би се одредиле детаљније прогностичке информације. Скенер X зрацима, СТ скенер (енгл. *Computed tomography*), магнетна резонанца и РЕТ скенер (енгл. *Positron emission tomography*) се могу користити за праћење напредовања карцинома и одређивање присуства или одсуства удаљених метастаза КЕ и захваћености лимфних нодуса (Chelmow и сар., 2022; Kalampokas и сар., 2022).

2.4. Хистолошки типови карцинома ендометријума

Према систему за одређивање стадијума КЕ установљеном од стране Међународне федерације гинекологије и акушерства (FIGO, енгл. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) за 2023. годину, КЕ се може поделити на неагресиван и агресиван тип. Карцином ендометријума неагресивног типа (КЕНТ) обухвата карциноме са ендометроидном хистологијом (ЕКЕ, ендометроидни карцином ендометријума) и ниским градусом (G1 и G2) који се углавном дијагностикују у раном стадијуму и имају добру прогнозу. Карцином ендометријума агресивног типа (КЕАТ) обухвата ЕКЕ са високим градусом (G3) и КЕ са другим типовима хистологије који имају лошу прогнозу (Berek и сар., 2023). КЕ обухвата различите хистолошке подтипове. Према тренутној хистолошкој класификацији КЕ се дели на следеће подтипове (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020):

- **Ендометроидни карцином ендометријума (ЕКЕ)** је најчешћи тип КЕ који обухвата око 80% случајева оболелих пацијенткиња. Често се развија од атипичне хиперплазије ендометријума или ендометроидне интраепителне неоплазије, које су препознате као преканцерозни стадијум. ЕКЕ се карактерише жлездастом структуром која је обложена цилиндричним или коцкастим епителним ћелијама, са округлим или овалним псеудостратификованим једром (Santoro и сар., 2021).
- **Серозни карцином ендометријума (СКЕ)** се обично јавља код жена у постменопаузи и није повезан са изложеношћу естрогеном, што доводи до лоше прогнозе. Предложени модел за развој СКЕ сугерише да он почиње мутацијом *TP53* (енгл. *Tumor Protein p53*) гена у неактивном ендометријуму, који даље напредује ка серозном интраепителијалном карциному кроз стадијум познат као „дисплазија жлезде ендометријума“. СКЕ може показати папиларне, жлездасте или чврсте обрасце раста. СКЕ се карактерише површинским епителом са коцкастим ћелијама са којих се одвајају карциномске ћелије, ћелије са једарном атипичношћу и висока стопа деобе ћелија (Santoro и сар., 2021).
- **Светло-ћелијски карцином ендометријума (СЋКЕ)** одликује се коцкастим или полигоналним ћелијама које показују бистру или еозинофилну цитоплазму, распоређеним у тубуларно-цистичне, папиларне или чврсте формације. Упркос описима различитих морфологија, тренутно не постоји коначна идентификација прекурсора за СЋКЕ. Типичан имунофенотип СЋКЕ је позитиван на Napsin-A (енгл. *Novel Aspartic Proteinase of the Pepsin family A*), HNF-1 β (енгл. *Hepatocyte Nuclear*

Factor-1 β) и AMACR (енгл. *Alpha-Methylacyl-CoA Racemase*), док је негативан на рецепторе естрогена и прогестерона (Santoro и сар., 2021).

- **Мешовити тип карцинома ендометријума (МКЕ)** указује на мешовито присуство два различита типа КЕ (од којих је један СКЕ или СТКЕ), при чему мање заступљен тип обухвата најмање 5% туморског подручја (Santoro и сар., 2021).
- **Недиференциран карцином ендометријума (НДКЕ)** је недавно описана варијанта КЕ. Карактерише се слојевитим монотоним дискохезивним ћелијама са одсуством било какве очигледне жлездане или трабекуларне структуре. Недавне студије дале су нове увиде у морфолошку хетерогеност НДКЕ. Овај подтип КЕ може показати епителоидне, вретенасте, рабдоидне или бизарне циновске ћелије, са миксоидном стромом (Santoro и сар., 2021).
- **Карциносарком ендометријума (КСЕ)** је редак и агресиван КЕ са секундарном саркоматозном транс-диференцијацијом. Карциносарком ендометријума није јединствен ентитет, већ обухвата различите хистолошке подтипове, у зависности од врсте карциноматозних и саркоматозних елемената (Bogani и сар., 2023).
- Други неуобичајени типови карцинома ендометријума: **карцином ендометријума налик мезонефричном и гастроинтестинални муцинозни тип.**

2.5. Одређивање градуса карцинома ендометријума

Критеријум за одређивање градуса (Г) ЕКЕ се заснива на одређивању архитектонских карактеристика и степена диференцираности жлезданих ћелија. Густим паковањем жлезданих туморских ћелија ендометријума долази до формирања солидног раста тумора, при чему ћелије више не поседују класичан изглед жлезда. Тумори са добро диференцираним ћелијама имају мање од 5% солидног раста тумора и означавају се градусом 1 (G1), са умерено диференцираним ћелијама G2 (6-50% солидног раста тумора) и тумори са слабо диференцираним ћелијама са G3 (са више од 50% солидног раста тумора).

Одређивање градуса КЕ је од суштинског значаја за иницијалну биопсију/киретажу као и за финалну хистеректомију, процену ризика и планирање лечења. ЕКЕ се према новој класификацији дели на туморе ниског градуса (G1 и G2) и високог градуса (G3). Присуство атипиче једра код G1 и G2 подиже оцену градуса за један. За разлику од ЕКЕ, остали агресивни типови КЕ се по дефиницији сматрају туморима са високим градусом (G3) (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2020; Berak и сар., 2023).

2.6. Одређивање стадијума карцинома ендометријума

Стадијум КЕ се одређује према новом 2023 FIGO систему које се заснива на одређивању хистолошког типа КЕ, градуса, степена инвазије КЕ, захваћености лимфних нодуса, присуству метастаза и молекуларној класификацији (Berak и сар., 2023). Нови 2023 FIGO критеријуми за одређивање стадијума су приказани у Табели 1.

Табела 1. Систем за одређивање 2023 FIGO стадијума КЕ.

Стадијум	Опис
Стадијум I	КЕ ограничен на тело материце и оваријум
IA	КЕ ограничен на ендометријум или неагресиван хистолошки тип са инвазијом мањом од половине миометријума, без или са фокалном LVSI или болест са добром прогнозом
	IA1 Неагресиван хистолошки тип КЕ ограничен на полип ендометријума или ендометријум.
	IA2 Неагресиван хистолошки тип КЕ са мање од половине инвазије у миометријум са или без LVSI
	IA3 ЕКЕ са ниским градусом ограничен на материцу и оваријум
IB	Неагресиван хистолошки тип КЕ са инвазијом половине или више миометријума, без или са фокалном LVSI
IC	Агресиван хистолошки тип КЕ ограничен на полип или ендометријум
Стадијум II	Инвазија строге грлића материце без екстраутериног проширења или са израженијим LVSI или агресивни хистолошки тип са инвазијом миометријума
IIA	Инвазија строге грлића материце не-агресивног хистолошког типа
IIB	Израженији LVSI неагресивног хистолошког типа
IIC	Агресивни хистолошки тип са инвазијом у миометријум
Стадијум III	Локално и/или регионално проширење тумора
IIIA	Инвазија серозе материце, аднекса или оба путем директне екстензије или метастазе
	IIIA1 Метастаза на оваријум или јајоводе
	IIIA2 Захваћеност субсерозе материце или проширење кроз серозе материце
IIIB	Метастаза или директно проширење тумора на вагину и/или перитонеум
	IIIB1 Метастаза или директно проширење на вагину и/или параметријум
	IIIB1 Метастаза на карлични перитонеум
IIIC	Метастаза на карлицу или пара-аортне лимфне нодусе или оба
	IIIC1 Метастазе до карличних лимфних нодуса
	IIIC1i Микрометастазе
	IIIC1ii Макрометастазе
	IIIC2 Метастаза до пара-аортних лимфних нодуса скроз до бубрежних крвних судова, са или без метастаза карличних лимфних нодуса
	IIIC2i Микрометастазе
	IIIC2ii Макрометастазе
Стадијум IV	Метастазе до мукозе мокраћне бешике и/или интестиналне мукозе и/или удаљене метастазе
IVA	Инвазија мукозе мокраћне бешике и/или интестиналне/цревне мукозе
IVB	Абдоминалне перитонеалне метастазе изван карлице
IVC	Удаљене метастазе, укључујући метастазе у било које екстра- или интра-абдоминалне лимфне нодусе изнад бубрежних судова, плућа, јетру, мозак или кости

КЕ – карцином ендометријума, ЕКЕ – Ендометроидни карцином ендометријума, LVSI - захваћеност лимфоваскуларног простора, Израженији LVSI (захваћено $\geq$ од 5 крвних судова).

2.7. Молекуларна класификација карцинома ендометријума

Развој система за молекуларну класификацију је значајно допринео унапређењу дијагностике и терапије КЕ. Испитивање различитих молекуларних карактеристика може пружити бољи увид у ризик од појаве рецидива и исхода преживљавања. Највећи утицај за развој система за молекуларну класификацију КЕ је имао Атлас генома канцера (TCGA, енгл. *The Cancer Genome Atlas*) који је класификовао КЕ на четири различите геномске категорије (Cancer Genome Atlas Research Network и сар., 2013):

- **Ултрамутирани** КЕ подразумева присуство соматске мутација промењеног смисла (енгл. *missens*) у оквиру егзонуклеазног домена ДНК полимеразе епсилон (POLE, енгл. *Polymerase-ε*) што доводи до инактивације и неспособности полимеразе да исправља грешке током ДНК репликације, због чега је присутна веома висока стопа мутација. Без обзира на градус КЕ ови типови тумора имају одличну прогнозу.
- **Хипермутирани** ЕКЕ или недиференцирани КЕ са високом микросателитском нестабилношћу (MSI-H, енгл. *Microsatellite Instability-High*) или поремећајем MMR система (MMRd, енгл. *Mismatch repair deficiency*). Ови карциноми имају умерену прогнозу.
- **Висока учесталост соматских промена у броју копија гена** (SCNA-h, енгл. *Somatic Copy-Number Alteration high*) са ниском стопом мутација, мутацијом у *TP53* гену (у 95% случајева) и веома неповољном прогнозом. Већина ових карцинома припада серозном типу, до 25% карцинома су ендометроидни (углавном са високим градусом) и карциносаркоми.
- **Ниска учесталост соматских промена у броју копија гена** (SCNA-l, енгл. *Somatic Copy-Number Alteration low*) код ЕКЕ и СЋКЕ са ниском стопом мутација и умереном прогнозом. У овој групи експресија естрогенских рецептора и хистолошки градус утиче на прогнозу болести.

С обзиром на то да методологија геномске класификације подразумева секвенцирање генома и може да буде финансијски захтевна и комплексна, предложен је нови поједностављен приступ молекуларне класификације, који омогућује идентификацију 4 молекуларна типа КЕ помоћу секвенцирања и имунохистохемијских метода који су аналогни претходно описаној подели (Talhouk и сар., 2015; Moreira и сар., 2022).

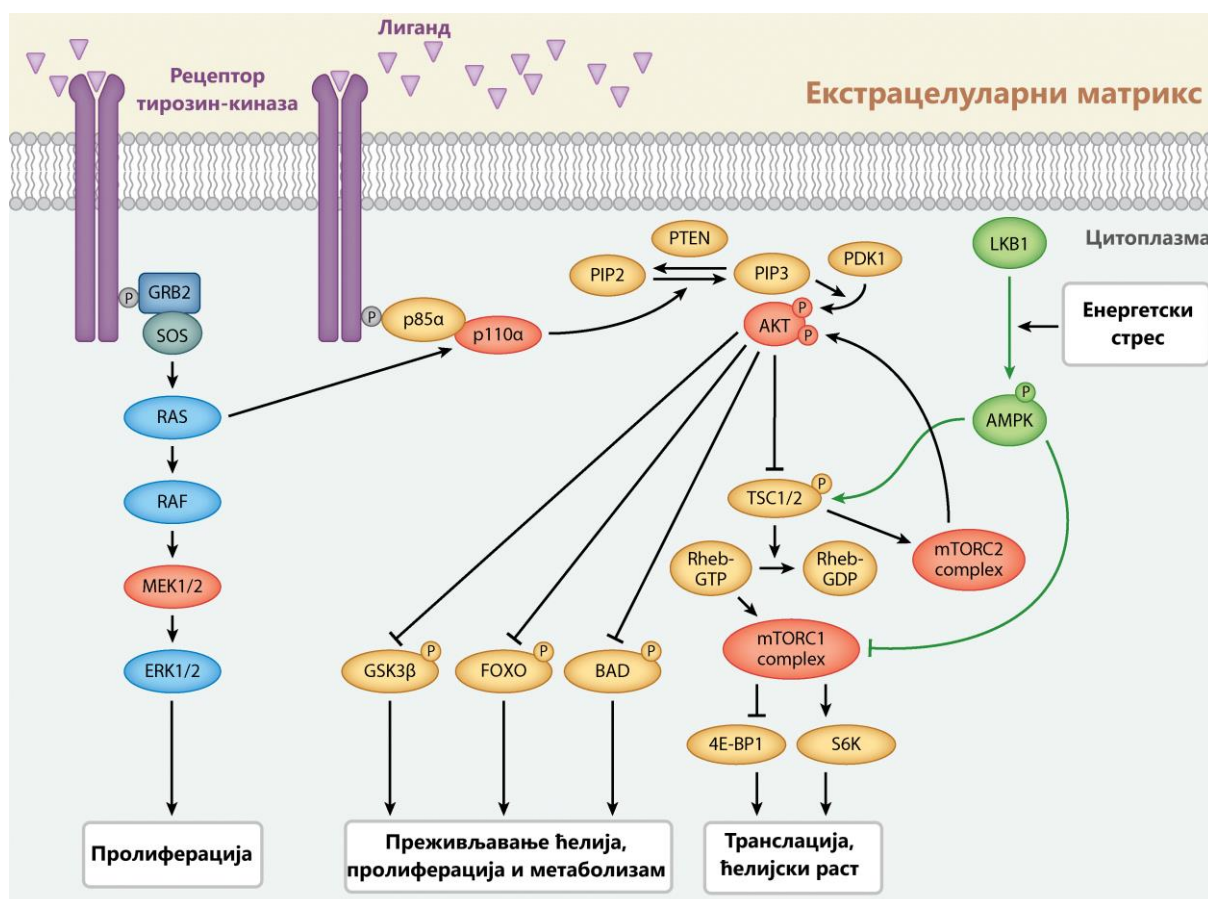
- КЕ са патогенским мутацијама у егзонуклеазном домену POLE (**POLEmut**, енгл. *POLE mutated*) одговара претходно описаном ултрамутираном фенотипу који се може одредити генским секвенцирањем.
- КЕ са поремећајем MMR система (**MMRd**) са промењеном имунохистохемијском експресијом MMR протеина MLH1 (енгл. *MutL protein homolog 1*), MSH2 (енгл. *MutS homolog 2*), MSH6 и PMS2 (енгл. *PMS1 homolog 2*) који одговара хипермутираном фенотипу.
- **p53abn** (енгл. *p53 abnormal*) са поремећеном имунохистохемијском експресијом (без експресије и/или прекомерна експресија p53) који одговара SCNA-h типу.
- КЕ без специфичног молекуларног профила (**NSMP**, енгл. *No Specific Molecular Profile*) са нормалном експресијом p53 и очуваном имунохистохемијском експресијом MMR протеина, који одговара претходно описаном типу SCNA-l (Talhouk и сар., 2015).

2.8. Молекуларне основе настанка и прогресије карцинома ендометријума

Бројна молекуларно генетичка истраживања су доказала да КЕ настаје вишестепеним процесом активације онкогена и негативном регулацијом или инактивацијом тумор-супресора (Indumati и сар., 2023). Развојем нових технологија, попут секвенцирања нове генерације, омогућено је дубље разумевање молекуларно-генетичких основа развоја различитих болести, укључујући и КЕ. Молекуларна основа КЕ се разликује у зависности од хистолошких одлика самих тумора. ЕКЕ се карактерише учесталим поремећајем у функционисању PTEN–PI3K–AKT–mTOR, RAS–MEK–ERK и WNT– β -катенин сигналних путева, MSI, поремећајем MMR система и високом учесталости POLE мутација. Механизмом сигналног пута PTEN–PI3K–AKT–mTOR регулише се ћелијски раст, преживљавање, синтеза и метаболизам протеина (Слика 2).

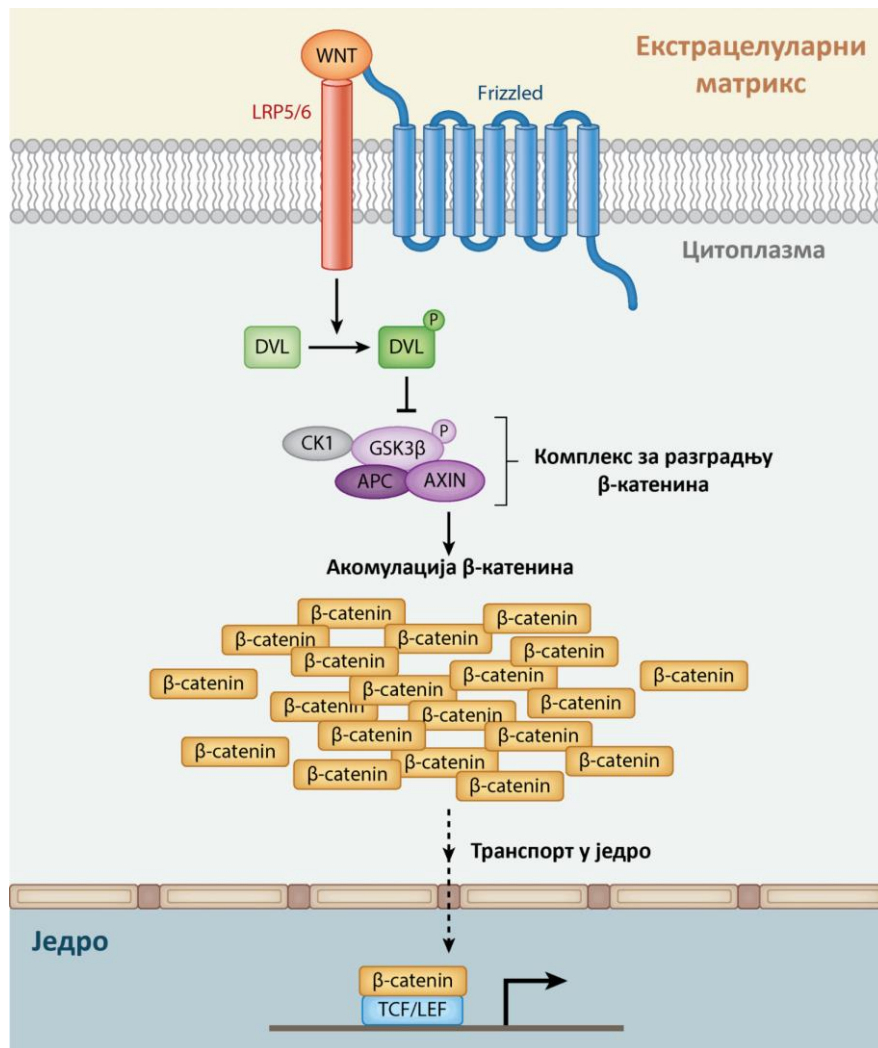
Ген тумор-супресора *PTEN* се налази на хромозому 10, позицији q23.3, и кодира липидну фосфатазу која у нормалним физиолошким условима инхибира активацију сигналног пута PI3K (енгл. *Phosphoinositide 3-Kinase*), тако што врши конверзију PIP3 (енгл. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) у PIP2 (енгл. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) путем дефосфорилације (Samarthai и сар., 2010; Bell и Ellenson, 2019; Glaviano и сар., 2023). Најчешћа генетска промена у ЕКЕ представља мутација тумор-супресора *PTEN* (Слика 4). Узимајући у обзир то да је ова мутација често присутна код хиперплазије ендометријума, она представља рани догађај у патогенези ЕКЕ. Губитак експресије PTEN-а, мутације и делеције које доводе до његове инактивације утичу на повишен ниво фосфорилисане протеин киназе Б (AKT, енгл. *Alpha serine/threonine-protein kinase*), и самим тим до губитка инхибиторног ефекта на сигнални пут PI3K. Такође долази до неконтролисане пролиферације и преживљавања ћелија тумора. Поред мутације тумор-супресора *PTEN*, одређене мутације у *PIK3CA* (енгл. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*) и *PIK3R1* (енгл. *Phosphoinositide-3-kinase Regulatory Subunit 1*), генима који кодирају субјединице PI3K p110 α и p85 α , су примећене код ЕКЕ. Додатно, поремећај у регулацији сигналног пута PTEN–PI3K–AKT–mTOR код ЕКЕ може се јавити услед инактивације тумор-супресора TSC2 (енгл. *Tuberous Sclerosis Complex 2*) и LKB1 (енгл. *Liver Kinase B1*) (Bell и Ellenson., 2019).

Сигнални механизам RAS–RAF–MEK–ERK има кључну улогу у пролиферацији ћелија, преживљавању и диференцијацији (Слика 2). Поремећај у регулацији овог сигналног пута је чест догађај, јер је *KRAS* најчешће мутирани онкоген код различитих карцинома. Мутације у *KRAS* прото-онкогену су најчешће локализоване у кодонима 12 и 6, при чему су присутне код 15-24% ЕКЕ. Мутацијом *KRAS* онкогена долази до повећане фосфорилације MEK1/2 (енгл. *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1/2*), ERK1/2 (енгл. *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*) и p38MAPK (енгл. *p38 mitogen-activated protein kinases*) чиме се промовише даље активирање сигналне каскаде. Поред тога, прекомерна експресија *KRAS* доводи до повећане активације даље сигналне каскаде, чиме се промовише развој тумора (Molina и сар., 2006; Bell и Ellenson, 2019).



Слика 2. Механизам сигналног пута PI3K–PTEN–AKT–mTOR и RAS–MEK–ERK (преузето и модификовано из Bell и Ellenson, 2019).

Сигнални пут WNT– β -катенин (Слика 3) је укључен у различите процесе женског репродуктивног система, попут пролиферације ћелија, преживљавања, одржавања ћелијске адхезије, као и у регулацији менструалног циклуса. Током репродуктивног периода жена сигнални пут WNT– β -катенин је регулисан хормонима попут естрогена и прогестерона. Естроген, током пролиферативне фазе ендометријума, стимулише сигнални пут WNT– β -катенин и акумулацију β -катенина у једро ћелија. Током секреторне фазе, прогестерон инхибира овај сигнални пут. Поремећај у регулацији сигналног пута WNT– β -катенин код ендометријума доводи до хиперплазије ендометријума из које се касније може развити ЕКЕ. Код ЕКЕ овај пут је често константно активиран услед мутације гена *CTNNB1* (енгл. *Catenin Beta 1*), чиме се спречава фосфорилација и протеозомална дегредација β -катенина, а која се јавља код 19-37% ЕКЕ. Мутације гена *CTNNB1* су повезане са лошом прогнозом пацијенткиња са ЕКЕ. Поред тога, соматске мутације гена *RNF43* (енгл. *Ring Finger Protein 43*) и *SOX12* (енгл. *SRY-box Transcription Factor 12*) такође могу имати утицај на поремећену регулацију сигналног пута WNT– β -катенин код ЕКЕ (Bell и Ellenson, 2019; Fatima и сар., 2021).

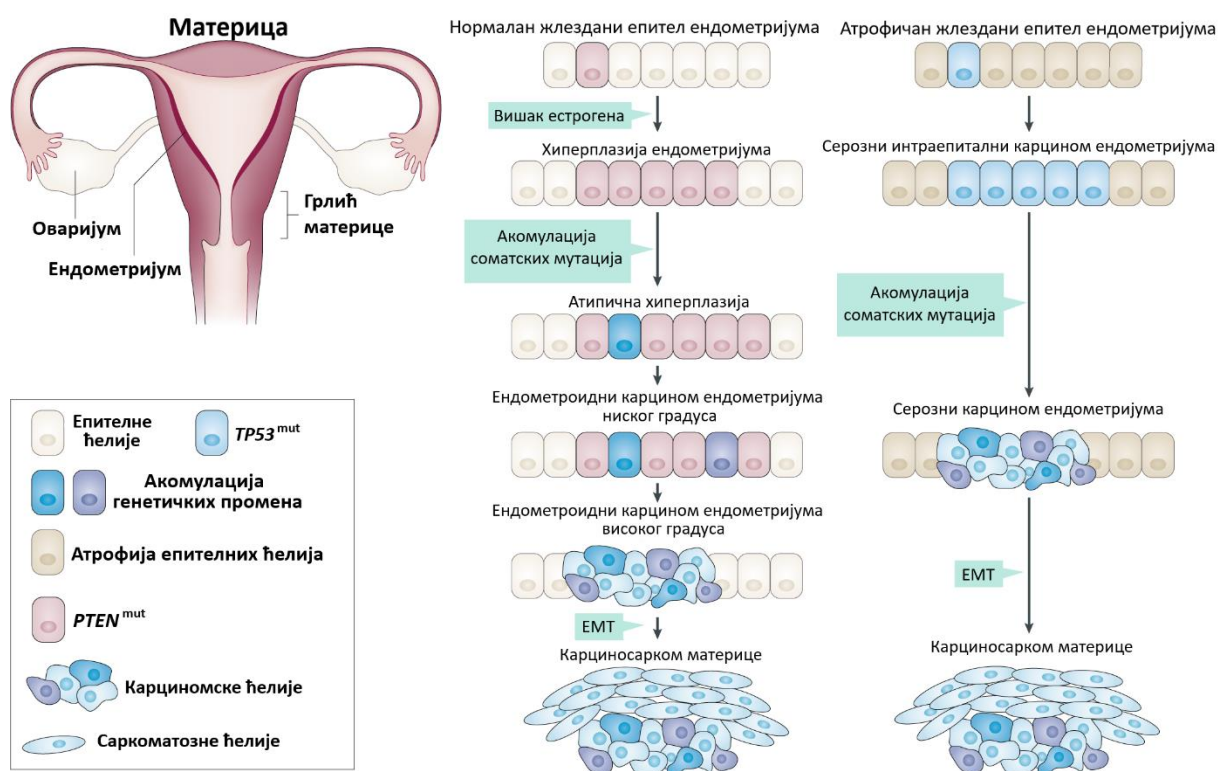


Слика 3. Механизам сигналног пута WNT–β-катенин (преузето и модификовано из Bell и Ellenson, 2019).

Механизми репарације молекула ДНК омогућавају ћелијама да препознају и поправе оштећења ДНК у оквиру генома. Систем MMR је један од кључних механизма који учествује у препознавању и репарацији погрешно спарених база, инсерција и делеција које могу да се јаве током репликације, рекомбинације и појединих оштећења молекула ДНК (Hsieh и Yamane, 2008). Овај механизам се састоји од неколико специфичних MMR ензима који зависе од четири кључна гена: *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* и *PMS2*. Поремећаји у функционисању система MMR могу настати услед мутације у наведеним генима (герминативних или соматских) или губитком протеинске експресије услед епигенетичког утишавања. MSI је присутна код 30% ЕКЕ и последица је епигенетског утишавања гена *MLH1* путем хиперметилације промотора. Овакви поремећаји доводе до MMRd, што резултује накупљањем великог броја соматских мутација у геному (Cott и сар., 2022). Поред тога, додатни узрочни механизам геномске нестабилности ЕКЕ представља соматска мутација у егзонуклеазном домену *POLE*, који кодира каталитичку субјединицу ДНК полимеразе епсилон, при чему се развија ултрамутирани фенотип ЕКЕ. Ова мутација се чешће јавља код ЕКЕ са високим градусом у односу на карциноме са ниским градусом. Додатно, ЕКЕ са овом мутацијом су повезани са повољном прогнозом, што рефлектује примену агресивног третмана код тумора са

високим градусом, осетљивост ових тумора на хемотерапију и појачана имуногеност (Bell и Ellenson, 2019; Corr и сар., 2022).

У физиолошким условима, тумор-супресор p53 има улогу у заустављању ћелијског циклуса како би се отклонила оштећења и грешке у ДНК молекулу и/или индуковању апоптозе (програмирана ћелијска смрт), уколико се оштећења не исправе. СКЕ садржи мањи број мутација у односу на ЕКЕ, али већи стопу промена у броју копија гена. Мутације у гену *TP53* и/или поремећај експресије протеина p53 су најчешће молекуларне промене у СКЕ (85%) и представљају рани догађај (Слика 4). Поред мутације у гену *TP53*, друге молекуларне промене које се доводе у везу са патогенезом СКЕ представљају мутацију у *PPP2R1A* (енгл. *Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit A, Alpha*) и *FBXW7* (енгл. *F-box/WD Repeat-Containing Protein 7*), велики број копија гена и/или прекомерну експресију *ERBB2* (енгл. *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*), *MYC* (енгл. *Myelocytomatosis oncogene*), *CCNE1* (енгл. *Cyclin E1*) и прекомерну експресију протеина p16. Мутација у *PIK3CA* је такође присутна код СКЕ, док су мутације у генима *PTEN* и *PIK3R1* ретке (Samaranthai и сар., 2010).



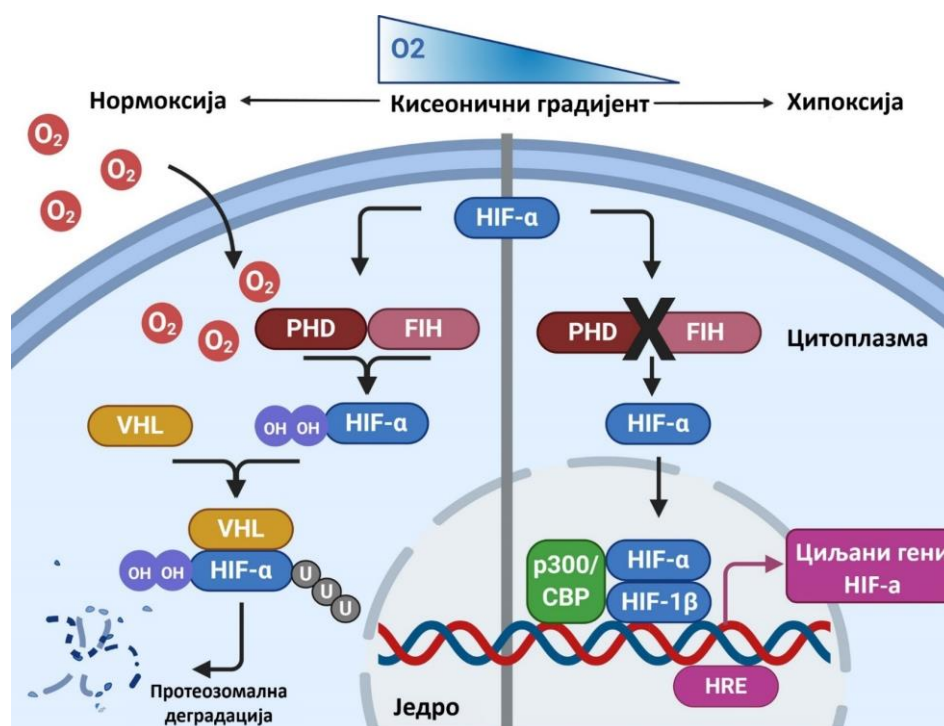
Слика 4. Генетичке промене које доводе до настанка и развоја КЕ. $PTEN^{mut}$ – мутације у гену *PTEN*. $TP53^{mut}$ – мутације у гену *TP53*. EMT – епително-мезенхимска транзиција. (преузето и модификовано из Urick и Bell, 2019).

С $\bar{H}$ КЕ се карактерише имунореактивношћу за Napsin A и HNF-1 β , која је значајно учесталија код овог типа карцинома у односу на ЕКЕ и СКЕ. Тумор-супресор *TP53* је најчешће мутирани ген у овом типу карцинома (31-50%) са поремећеном експресијом протеина p53. Поред тога, мутација у генима попут *PPP2R1A*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *PTEN* и *KRAS* такође може бити присутна, чиме показује одређена преклапања са молекуларном основом ЕКЕ и СКЕ. Ови подаци сугеришу да С $\bar{H}$ КЕ може настати кроз посебан вид

молекуларне патогенезе, због чега су неопходне детаљније студије на молекуларном нивоу за овај тип карцинома (Samarthai и сар., 2010; Bell и Ellenson, 2019).

3. Хипоксија и ангиогенеза

Хипоксија представља недостатак кисеоника у ћелијској средини услед одређених физиолошких или патолошких услова. Хипоксија у туморској микросредини индукује промене у регулаторном систему сигналних молекула и транскрипционих фактора које доприносе бољој адаптацији туморских ћелија (Hui и сар., 2019). Код тумора се може јавити услед повећане метаболичке активности и коришћења кисеоника од стране убрзано пролиферишућих туморских ћелија, што доводи до промене у рН локалне средине и оксидативног стреса у туморском микроокружењу (North и сар., 2005). Под хипоксичним условима (Слика 5), у којима туморске ћелије могу да се налазе, ћелијски метаболизам прелази са митохондријалне оксидативне фосфорилације на гликолизу. Главну улогу у овом процесу има HIF-1 тако што активира експресију већине гликолитичких ензима, као и експресију PDK (енгл. *Pyruvate dehydrogenase kinase*), док утишава експресију ензима укључених у митохондријалну оксидативну фосфорилацију (Ziello и сар., 2007).



Слика 5. Регулација HIF-a у нормоксичним и хипоксичним условима (преузето и модификовано из Page и сар., 2019).

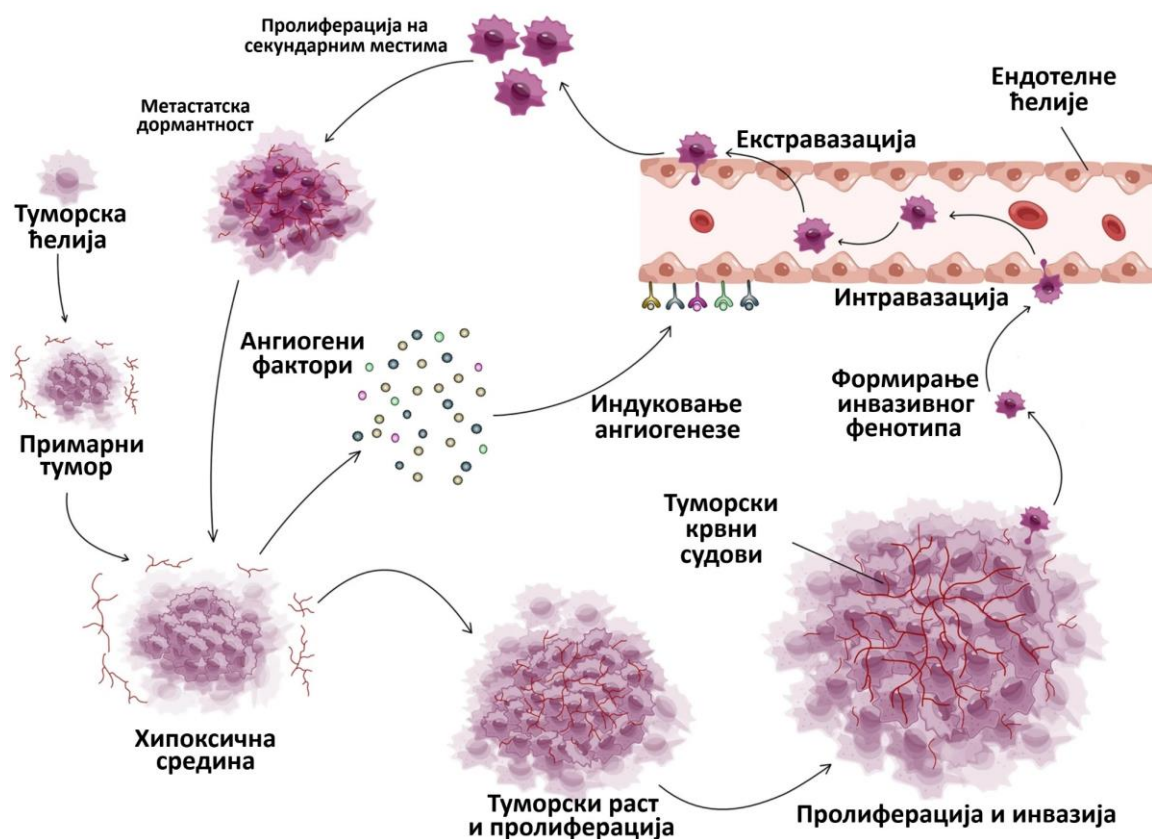
HIF-1 припада фамилији транскрипционих фактора bHLH-PAS (енгл. *helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*) који се састоје од HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α, и HIF-1β. За разлику од HIF-α субјединица које су регулисане присуством кисеоника, HIF-1β је стабилно експимиран и независан од кисеоника (Liao и Johnson, 2007). Од свих HIF-α субјединица, HIF-1α има главну улогу у одржавању кисеоничне хомеостазе код различитих типова ћелија, док је HIF-2α доминантно експимиран у ендотелним

ћелијама (Semenza, 2004). Регулација HIF-1 α укључује контролу експресије на транскрипцијском нивоу, регулацију стабилности протеина и његове активности (Слика 5). У нормоксичним условима кисеоник изазива посттранслациону хидроксилацију у домену ODD (енгл. *Oxygen dependent degradation*) протеина HIF-1 α . Ову хидроксилацију катализују PHD 1-3 (енгл. *Prolyl hydroxylase domain proteins*) чиме се омогућава везивање тумор-супресорског протеина VHL (енгл. *Von Hippel-Lindau*) за N-терминални домен HIF-1 α . На тај начин се HIF-1 α обележава за убрзану протеозамалну деградацију. Међутим, под хипоксичним условима HIF-1 α избегава деградацију и врши хетеродимеризацију са HIF-1 β субјединицом након чега се везује за елементе одговора на хипоксију (HRE, енгл. *Hypoxia Responsive Element*) у оквиру промоторског региона циљаних гена (Liao и Johnson, 2007; Page и сар., 2021). На овај начин се активира транскрипција бројних гена укључених у енергетски метаболизам, ангиогенезу, ремоделовање ткива и инфламаторни одговор. Додатно, показано је да активација сигналног пута PI3K/AKT путем различитих фактора раста доводи до повећане активности HIF-1 α . Такође, инаktivација тумор-супресора PTEN повећава активност HIF-1 α (Хие и сар., 2019; Tian и сар., 2023). Код жена у постменопаузи, *HIF-1A* је појачано експримиран код КЕ у односу на хиперплазију и нормалан ендометријум што доводи до активације регулаторних гена као што су CA9, SLC2A1 и VEGF (Seeber и сар., 2011). Хипоксија представља један од најбитнијих физиолошких активатора ангиогенезе. Свеобухватно, HIF-1 α има кључну улогу у покретању ангиогенезе везивањем за промотор гена VEGFA чиме директно активира његову транскрипцију (Liu и сар., 2023).

Ангиогенеза представља процес кроз који се формирају нови крвни судови из постојећих како би се развила нова васкуларна мрежа. Ангиогенеза обезбеђује снабдевање ћелија нутријентима, кисеоником, одстрањује метаболички отпад и угљендиоксид (Otrock и сар., 2007). Индукција ангиогенезе једна је од главних особина малигно трансформисаних ћелија која може да буде активирана под хипоксичним условима у којима се налази тумор. Туморско ткиво има убрзану пролиферацију и интензиван метаболизам због чега су неопходне много веће количине нутријената и кисеоника у односу на нормална ткива. У почетном стадијуму туморски раст је у аваскуларном стању током којег нутријенте апсорбује дифузијом из околног ткива. Ангиогенеза је током овог периода неактивна због ниског нивоа проангиогених фактора у екстраћелијском матриксу. Када туморска маса нарасте до волумена од 1–2 mm³ ресурси околног ткива постају недовољни да подрже даљи раст тумора (Al-Ostoot и сар., 2021; Liu и сар., 2023). У туморском ткиву се током овог периода постепено развија микроокружење са хипоксијом, исхемијом, ацидозом и високим интерстицијалним притиском што подстиче ослобађање различитих фактора раста и цитокина, чиме се стимулише ангиогенеза како би се омогућио даљи раст тумора и формирање инвазивног фенотипа (Слика 6).

Кључни медијатор ангиогенезе у туморским ћелијама је VEGF. Фамилија гена VEGF се састоји од *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFE*, *VEGFD* и *PIGF* (енгл. *Placental Growth Factor*). Протеин који је кодиран геном *VEGFA* је кључни секреторни фактор који одржава функцију ендотелних ћелија и промовише васкуларну пропустљивост. Додатно, регулише ћелијску хомеостазу, омогућава преживљавање туморских ћелија и инвазију (Liu и сар., 2023). Везивање VEGFA за рецептор VEGFR2 представља један од главних сигналних догађаја који иницира ангиогенезу. VEGFA секретован од стране туморских ћелија покреће ангиогенезу везивањем за рецепторе на ендотелним ћелијама. Иако су рецептори за овај фактор углавном смештени на ендотелним ћелијама, могу се наћи и на малигно трансформисаним ћелијама при чему се VEGFA у том случају понаша као

аутокрини фактор (Слика 6). На тај начин контролише пролиферацију, миграцију, инвазију и преживљавање малигних ћелија (Song и сар., 2019). Везивањем VEGFA за рецептор VEGFR-2 долази до његове аутофосфорилације и сигналне трансдукције, чиме се активирају различити сигнални путеви (PI3K/AKT/mTOR, p38 MAPK и Ras/Raf/MEK/ERK) који учествују у расту и преживљавању ендотелних ћелија и ангиогенези. Поред тога ови сигнални путеви могу да индукују пролиферацију, миграцију, инвазију и ангиогенезу различитих тумора (Liu и сар., 2023). Бројне студије показале су да је експресија VEGF-a и његовог рецептора појачана међу различитим типовима тумора, због чега представља један од главних терапеутских мета са приступом заснованом на коришћењу различитих инхибитора ангиогенезе (Ghalehbandi и сар., 2023).



Слика 6. Прогресија раста туморског ткива: ангиогенеза и формирање инвазивног фенотипа (преузето и модификовано из Liu и сар., 2023).

Током ангиогенезе долази до деградације базалне мембране, пролиферације и миграције ендотелних ћелија која је регулисана од стране различитих про- и анти-ангиогенских фактора (Liu и сар., 2023). Најпре крвни судови пролазе кроз вазодилатацију и повећања пропустљивости њиховог зида што омогућава миграцију ендотелних ћелија. Ендотелне ћелије се ослобађају од глатких мишићних ћелија након дестабилизације крвних судова и губитка међућелијских веза. Након тога, ендотелне ћелије пролиферишу и мигрирају до удаљених места привучене од стране различитих ангиогених фактора. Перицити мигрирају до места формирања новог крвног суда приликом чега образују базалну ламину. У нормалним физиолошким условима, перицити повезани са новоформираним крвним судовима одржавају ендотелне ћелије у стању мировања (Liao и Johnson, 2007).

Ангиогенеза индукује инвазију и миграцију туморских ћелија. Један од главних ефекторних молекула током епително-мезенхималне транзиције (ЕМТ, енгл. *Epithelial-mesenchymal transition*) и ангиогенезе је матриксна металопротеиназа 9 (ММП-9, енгл. *Matrix metalloproteinase-9*), која исеца Е-кадхерински (енгл. *E-cadherin*) ектодомен и разграђује компоненте екстрацелуларног матрикса, чиме туморске ћелије стичу инвазивни фенотип (Quintero-Fabián и сар., 2019). Е-кадхерин учествује у одржавању међућелијских веза и представља кључан молекул у одржавању структуре епитела и ткивне хомеостазе. Исецањем екстраћелијског домена Е-кадхерина од стране ММП-9 долази до губитка стабилности међућелијских веза и епителне структуре, што омогућава малигним ћелијама да мигрирају са својих примарних места (Augoff и сар., 2022). Ген за ММП-9 је лоциран на хромозому 20 позицији q13.12 и садржи 13 егзона и 12 интрона. Овај протеин припада фамилији цинк и калцијум-зависних ендопептидаза које обихватају колагеназе, желатиназе, стромализине, матрилизине и мембрански тип ММП (Huang, 2018). Сви чланови фамилије ММП захтевају протеолизу како би били активни. Главни чланови фамилије ММП укључени у сам процес ангиогенезе су ММП-2, ММП-9 и ММП-14. Централну позицију у разградњи екстраћелијског матрикса заузима ММП-9 која повећава доступност VEGF-а и одржава хомеостазу туморског микроокружења. ММП-9 разграђује колаген тип IV и друге протеине матрикса што за последицу има ремоделовање базалне мембране, морфогенезу и стимулисање туморске ангиогенезе (Quintero-Fabián и сар., 2019; Liu и сар., 2023). Овај протеин је показао добар потенцијал као биомаркер код различитих малигну оболелих пацијената због чега је предложен као потенцијални маркер за карцином дојке, оваријума и колоректалног карцинома (Augoff и сар., 2022).

4. МикроРНК

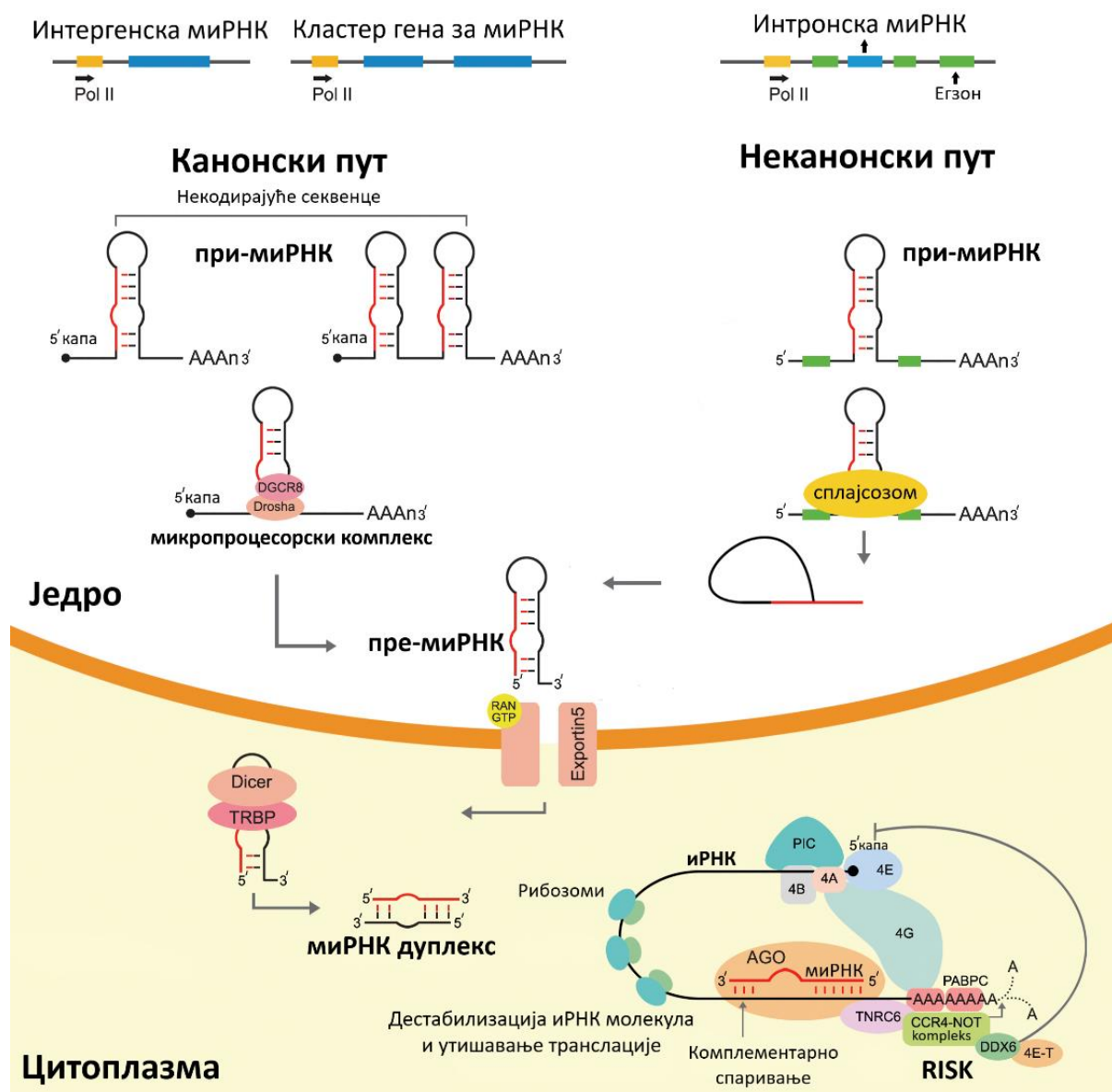
МикроРНК (миРНК) представљају класу малих некодирајући молекула РНК (дужине 19-24 нуклеотида) који имају улогу у регулацији експресије циљаних гена најчешће на пост-транскрипционом нивоу. Своју активност, миРНК обично остварују везивањем за 3'-UTR (енгл. *3' Untranslated Region*) циљане информационе РНК (иРНК) како би утишала њихову експресију. Додатно, показано је да у одређеним случајевима миРНК могу да се везују и за друге регионе, као што су 5' UTR, кодирајуће секвенце на ДНК молекулу и промотори гена. Поред тога, одређене миРНК могу и да активирају генску експресију под специфичним условима. Молекули миРНК представљају фундаментални регулатор у ћелијама, учествујући у различитим молекуларним процесима као што су раст, пролиферација и диференцијација ћелија, апоптоза, миграција, ангиогенеза и одговор на стрес. Ова класа малих регулаторних молекула РНК, не само што утиче на развој и функционисање ћелија, већ може имати кључну улогу у етиологији и прогресији различитих болести, укључујући и малигне туморе. Својом способношћу да утичу на различите аспекте ћелијског одговора, миРНК балансирају и одржавају хармонију у ћелијским процесима, играјући битну улогу у одржавању ткивне хомеостазе. Поремећаји у експресији миРНК су показани код многих карцинома, стога је за неке од ових миРНК установљено тумор-супресорско или онкогено својство и препишује им се велики дијагностички потенцијал. Додатно, поједине миРНК су показале значајан терапеутски потенцијал, с обзиром на то да могу циљано утишавати поједине онкогене (Ha и Kim, 2014; Broughton и сар., 2016; Tan и сар., 2018; O'Brien и сар., 2018; Kim и Croce, 2023).

4.1. Биогенеза и механизам функционисања миРНК молекула

Скоро половина идентификованих гена за миРНК се налази у оквиру интергенских секвенци, док се преостали налазе и у оквиру интронских и/или егзонских секвенци гена који кодирају протеине и друге регулаторне молекуле РНК. Гени за миРНК су распоређени у кластерима или појединачно под контролом сопственог промотора. Биогенеза миРНК молекула се одвија у виду канонског и неканонског пута (Olena и Patton, 2010; Lao и Le, 2020).

У канонском путу биосинтезе (Слика 7), примарна миРНК (при-миРНК) се транскрибује уз помоћ РНК полимеразе II са сопственог промотора или промотора гена у оквиру ког се налази. Овај процес је контролисан транскрипционим факторима који су асоцирани са РНК полимеразом II и епигенетским регулаторима. Након транскрипције, при-миРНК која има облик укоснице са петљом се обрађује у прекурсорску миРНК (пре-миРНК) у једру, помоћу микропроцесорског комплекса, који се састоји од РНК-везујућег протеина DGCR8 (енгл. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) и ензима Drosha (енгл. *Drosha ribonuclease III*). Drosha уводи прекиде фосфодиестарских веза у оквиру при-миРНК након чега се генерише пре-миРНК (дужине 60-70 нуклеотида) са структуром „дршке и петље“ (енгл. *Stem-loop*) која се транспортује из једра у цитоплазму уз помоћ комплекса експортина 5 (XPO5, енгл. *Exportin 5*) и Ran-GTP-азе (енгл. *Ras-related nuclear protein guanosine triphosphate*), а затим обрађује помоћу ендонуклеазе Dicer (енгл. *Dicer RNase III endonuclease*). Ова обрада укључује уклањање терминалне петље, након чега се ствара дуплекс миРНК (20-22 нуклеотида). Овакав дуплекс се даље обрађује помоћу ензима из фамилије Аргонаут (AGO1-4), приликом чега се добија једноланчана зрела миРНК дугачка око 21 нуклеотид која се означава као водећи ланац (O'Carroll и Schaefer, 2013; Lao и Le, 2020).

Неканонски пут је независан од обраде при-миРНК у пре-миРНК путем ензима Drosha и DGCR8. Неканонски пут биогенезе миРНК може да укључује активности одређене комбинације протеина који су укључени у канонски пут, као што су Dicer, XPO5 и AGO2 (енгл. *Argonaute RISC Catalytic Component 2*). Пример таквих пре-миРНК су митрони који се обрађују из интрона иРНК. Искрајање при-миРНК према неканонском путу функционише путем искрајања интрона при чему се формира пре-миРНК (Слика 7). Други пример је пре-миРНК са 7-метилгуанозином (m^7G) која покрива 5'-крај у виду капе. Након тога пре-миРНК се директно транспортује у цитоплазму уз помоћ експортина, без потребе за њиховом обрадом путем Drosha ензима. За сазревање миРНК неопходан је AGO2 како би финализовао њихову обраду у цитоплазми. Постоји само мали број идентификованих миРНК код сисара чија биогенеза функционише неканонским путем (O'Carroll и Schaefer, 2013; Stavast и Erkeland, 2019; Lao и Le, 2020).



Слика 7. Биогенеза миРНК молекула и механизам деловања (Преузето и модификовано са: <https://commons.wikimedia.org>). Pol II – РНК полимераза II. при-миРНК – примарна микроРНК. пре-миРНК – прекурсор микроРНК.

Зрела миРНК заједно са протеином из Аргонаут фамилије улази у RISC (енгл. *RNA-induced silencing complex*) комплекс. Овакав комплекс утишава циљане иРНК тако што регрутује факторе као што су GW182 (енгл. *Glycine-Tryptophan protein of 182 kDa*), TNRC6A–TNRC6C (енгл. *Trinucleotide Repeat-containing gene 6A–6C*) и CCR4–NOT (енгл. *Carbon Catabolite Repressor 4–negative on TATA complex*) који посредују у транслационој репресији, деаденилацији или уклањању 5' капе циљаних транскрипата (Слика 7). Додатно, AGO2 може да утишава циљане иРНК путем његове ендолитичке активности. Комплекс RISC се усмерава на циљне иРНК и регулише генску експресију путем интеракције 5' региона миРНК који је означен као „матични регион“ или „регион семена“ (2-8 нуклеотида) и 3'-UTR циљане иРНК. Комплементарно спаривање 3' краја миРНК са циљним секвенцама додатно стабилише интеракцију и специфичност везивања. У зависности од степена комплементарног спаривања миРНК са циљаном иРНК зависи сам ефекат овог комплекса. Потпуно комплементарно спаривање индукује ендонуклеазну

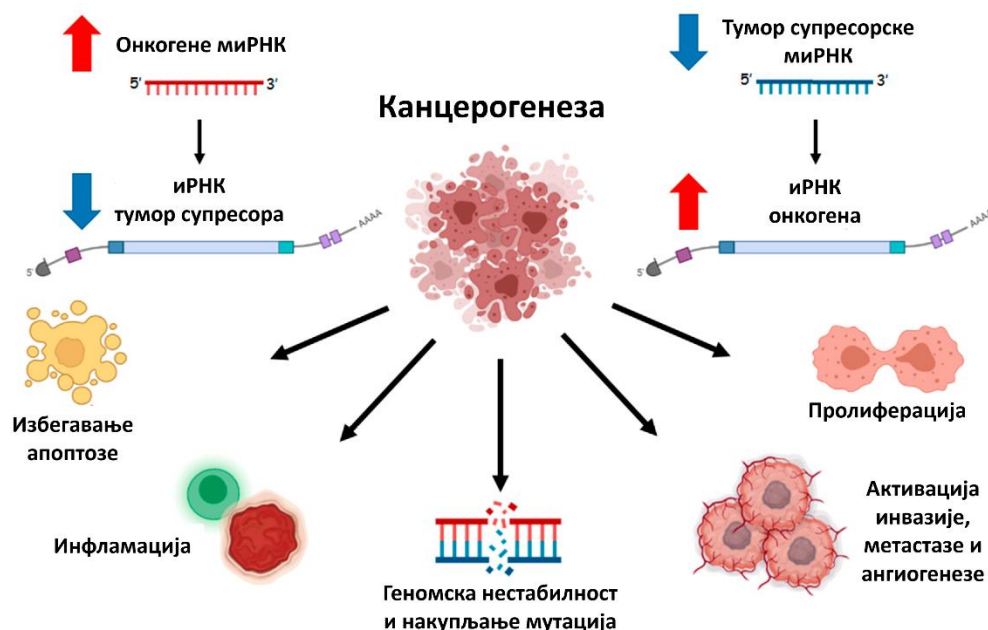
активност AGO2 ензима, при чему се исеца циљана иРНК, што је механизам карактеристичан за РНК интерференцију код биљака. Код сисара, преовлађујући механизам деградације циљних РНК базира се на дестабилизацији иРНК, уз одсуство ендонуклеолитичког исецања, јер миРНК не остварују потпуно комплементарно спаривање са циљаном секвенцом. Структурном анализом протеина AGO2 и испитивањем мутација гена за миРНК и њихових таргета откривено је да неспарени нуклеотиди у централном региону дуплекса миРНК-иРНК омогућавају модификацију 3' краја миРНК помоћу непознатих ензима. Ове модификације доводе до ремоделовања 3' краја и евентуалне деградације миРНК помоћу егзонуклеазе XRN1 (енгл. *5'-3' Exoribonuclease 1*), чиме се може објаснити нагло варирање у концентрацији одређених миРНК молекула током ћелијског развоја (Zangari и сар., 2017; O'Brien и сар., 2018; Stavast и Erkeland, 2019).

Поремећај у експресији и функционисању различитих компоненти машинерије за биогенезу миРНК молекула је често примећен код различитих карцинома (Huang и сар., 2014). Експресија ензима Drosha и Dicer је често повећана или смањена код различитих врста карцинома при чему може бити у обрнутој корелацији са узнатредовалим стадијумом тумора и лошим клиничким исходом. Овакви поремећаји компоненти машинерије за биогенезу миРНК молекула могу довести до промене у експресији великог броја различитих миРНК молекула (Hata и Kashima, 2016). Сnižена експресија DICER1 је показана код карцинома штитне жлезде, дојке, плућа, јајника и бубрега и често је повезана са лошом прогнозом (Penha и сар., 2017; Lee и сар., 2019). Tokumaru и сарадници (2008) су показали да миРНК *let-7* може циљано да утишава експресију молекула DICER1, при чему формира негативну повратну спрегу, која негативно регулише експресију других миРНК молекула. Измене у експресији протеина DICER1 и AGO2, услед промена као што су делеција, мутација или метилација промотора такође могу да доводе до огромних глобалних промена у експресији миРНК (Huang и сар., 2014; Deb и сар., 2017). Штавише, мутације у *DICER1* гену су узрок синдрома који карактерише склоност ка развоју различитих типова тумора (González и сар., 2022). Поред основне улоге протеина AGO2 у РНК интерференцији, овај молекул има улогу у стабилизацији зрелих миРНК молекула. Једном када се миРНК молекули вежу за протеине Ago, они су заштићени од дејства рибонуклеаза и могу бити стабилни од неколико недеља до неколико месеци у основним условима док су нестабилни у одсуству Ago протеина и брзо се разграђују, при чему се ниво укупних миРНК молекула драстично смањује. Патолошке промене у нивоу експресије и/или активности протеина Ago могу довести до поремећаја у стабилности молекула миРНК и самог процеса РНК интерференције. Повећана експресија протеина AGO1 и AGO2 је забележена код различитих типова карцинома. Још један од механизма који може довести до ових поремећаја су одређене пост-транслационе модификације протеина Ago (Hata и Kashima, 2016). Wu и сарадници (2011) су показали да хипоксија може да индукује експресију C-P4H-I (енгл. *Collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzymes I*) који врши хидроксилацију протеина AGO2, што подстиче појачану активност молекула миРНК током утишавања гена.

4.2. Улога микроРНК у малигној трансформацији карцинома ендометријума

Молекули миРНК могу имати различите улоге у малигној трансформацији карцинома, због чега се ови мали некодирајући РНК молекули сматрају за нов тип онкогена или тумор-супресора, јер имају важну улогу у иницијацији и прогресији тумора (Слика 8). Прекомерна експресија одређених онкогених миРНК молекула може инхибирати експресију тумор-супресорних гена или других сродних гена укључених у

диференцијацију туморских ћелија путем регулације пролиферације, ангиогенезе, инвазије и активности MMR система. Додатно, миРНК може да има тумор-супресорска својства путем утишавања различитих онкогена. Различити поремећаји могу инхибирати експресију тумор-супресорских миРНК и на тај начин утицати на повећану активацију онкогена (Otmani и Lewalle, 2021). Дефиниција појединачних миРНК као онкогених или тумор-супресорских је релативна, с обзиром на то да иста миРНК може имати више стотина циљних секвенци у оквиру иРНК, од којих су неке са онкогеним, а друге са тумор-супресорским функцијама, тако да је и њихова улога зависна од ћелијског и ткивног контекста.



Слика 8. Утицај молекула миРНК на процес канцерогенезе (преузето и модификовано из Spadaccino и сар., 2021).

Ген за miR-200a је лоциран на хромозому 1, позицији p36.33, и припада суперфамилији miR-200. Ова фамилија миРНК молекула укључује miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 и miR-429. С обзиром на то да су гени за ове миРНК организовани у кластерима и деле сличну секвенцу „матичног региона“ (AAUACUG), могу да регулишу експресију сличних иРНК молекула и да показују сличан образац експресије код различитих карцинома (Klicka и сар., 2022). Молекули миРНК из фамилије miR-200 регулишу различите сигналне путеве укључене у пролиферацију, ангиогенезу, инвазију и миграцију. Образац експресије miR-200a се разликује у зависности од типа карцинома. Код 15 малигнух тумора је пријављена повишена експресија, док је код 5 снижена (Klicka и сар., 2022). Wu и сарадници (2017), су показали да miR-200a молекули у *in vitro* условима негативно регулишу експресију тумор-супресора PTEN директним везивањем за 3'-UTR, чиме активирају PI3K–АКТ сигнални пут и подстичу пролиферацију ћелија KE. Поред тога, miR-200a таргетије RASSF2 (енгл. *Ras Association Domain Family Member 2*), који је инхибитор MEK/ERK сигналног пута, чиме се постиже појачана пролиферација ћелија колоректалног карцинома (Carter и сар., 2019). β -катенин је још један од циљаних молекула које miR-200a специфично инхибира, чиме промовише инвазију и миграцију малигнух ћелија једњака (Yang и сар., 2020a). За разлику од тога, неколико студија је показало да miR-200a одржава интегритет епителних ћелија

сузбијањем EMT директном инхибицијом мезенхималних транскрипционих фактора као што су: ZEB1 (енгл. *Zinc finger E-box binding homeobox 1*), ZEB2 и TGF- β . Због тога, смањена експресија miR-200a код одређених карцинома утиче на повећану експресију транскрипционих репресора E-кадхерина ZEB1/ZEB2, што је повезано са промоцијом епително мезенхималне транзиције и метастазом карциномских ћелија (Korpal и сар., 2008; Park и сар., 2008).

Један од најистраженијих молекула миРНК је miR-21, чији је ген лоциран на хромозому 17, позицији q23, и делимично се преклапа са геном за VMP1 (енгл. *Vacuole membrane protein 1*). Експресија miR-21 је конзистентно повишена код тумора због чега је класификована као миРНК са онкогеним карактеристикама и представља потенцијални биомаркер за дијагностику различитих карцинома (Jiang и сар., 2023). Прекомерна експресија miR-21 је показана код КЕ, карцинома дојке, колоне, панкреаса, неуробластома, глиобластома и лимфома. miR-21 има утицаја у регулацији пролиферације, апоптозе, миграције и инвазије (Selcuklu и сар., 2009). Поред miR-200a, студије су доказале да и miR-21 може директно да се везује за 3'-UTR тумор-супресора PTEN и на тај начин инхибира експресију овог протеина у ћелијским линијама КЕ, што утиче на појачану пролиферацију туморских ћелија (Qin и сар., 2012; Zhao и сар., 2017). Wang и сарадници (2020) су демонстрирали да miR-21 промовише EMT КЕ тако што циљано инхибира експресију SOX17 (енгл. *SRY-box transcription factor 17*).

Једна од миРНК са битном улогом у патофизиологији различитих обољења је miR-210 која је кодирана геном на хромозому 11, позицији p15.5. Значај ове миРНК у различитим болестима може се објаснити њеном улогом у биолошком одговору на хипоксију (Khalilian и сар., 2023). Повишена експресија miR-210 индукована хипоксијом је константна у различитим публикованим студијама, како у нормалним тако и у малигно трансформисаним ћелијама, што указује на кључну улогу miR-210 у ћелијској адаптацији на хипоксију (Qin и сар., 2014). У туморским ткивима као што су карцином дојке и колоне, доказано је да ниво експресије miR-210 корелише са експресијом гена укључених у одговор на хипоксију, што сугерише директну везу између miR-210 и хипоксије (Qin и сар., 2014; Sabry и сар., 2019). Прекомерна експресија miR-210 у нормоксичним ендотелним ћелијама стимулише формирање структура налик капиларима и миграцију ћелија, док се блокирањем експресије miR-210 постиже супротан ефекат (Fasanaro и сар., 2008). Откривено је неколико таргета miR-210 који су укључени у регулацији митохондријског метаболизма, као што су ISCU (енгл. *Iron-sulfur cluster assembly enzyme*), COX10 (енгл. *Cytochrome C Oxidase 10*), SDHD (енгл. *Succinate dehydrogenase complex subunit D*) и GPD1L (енгл. *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like*). miR-210 не само да има улогу као медијатор активности HIF-1 α , већ додатно промовише његову стабилност путем инхибиције GPD1L, чиме се формира позитивна повратна спрега између HIF-1 α и miR-210 (Kelly и сар., 2011). Под нормалним физиолошким условима, GPD1L врши хидролизу пролинског домена HIF-1 што доводи до његове деградације у протеозомима. Повећана експресија miR-210 путем директног везивања за 3'-UTR GPD1L утишава његову експресију и стимулише акумулацију HIF-1 под хипоксичним условима. Супротно томе, низак ниво експресије протеина HIF-1 асоциран је са ниским нивоом експресије miR-210 и појачано експримираним GPD1L (Hui и сар., 2019). Под хипоксичним условима HIF-1 α се везује за HRE на промотору који је најближи гену за miR-210, због чега функционише као регулатор експресије ове миРНК под хипоксичним

условима (Huang и сар., 2010). Yang и сарадници (2018) су показали да miR-210 може да промовише пролиферацију, миграцију и инвазију ћелија KE у *in vitro* условима, негативно регулишући NIFX (енгл. *Nuclear factor I/X*).

Велики број миРНК је укључено у туморску ангиогенезу, као што су miR-126, miR-210, miR-21, miR-106a, miR-182 и miR-155 (Qin и сар., 2014). miR-126 је кодирана интроном 7 у оквиру EGFL7 гена (енгл. *Epidermal growth factor-like domain-containing gene 7*), који је лоциран на хромозому 9, позиција q34.3 (Ye и сар., 2013). С обзиром на то да EGFL7 и miR-126 деле заједнички транскрипт, њихова експресија се дешава симултано. Међутим, ова миРНК може циљано да утишава EGFL7 уколико њихова експресија није активирана преко заједничког промотора. Ендотелне ћелије капиларних судова и артерија се карактеришу високом експресијом молекула miR-126, што указује на неизоставну улогу ове миРНК у регулацији процеса ангиогенезе. Ангиогена активност miR-126 зависи од статуса ендотелних ћелија. Иако индукује ангиогенезу и промовише диференцијацију ендотелних ћелија током ембрионалне фазе, код здравих адулта ова миРНК учествује у одржавању васкуларне хомеостазе и пролиферације ендотелних ћелија путем инхибиције сигналног пута ангиогенезе (Chistiakov и сар., 2016). Током ембрионалног развоја, miR-126 регулише ангиогенезу активирану од стране VEGF-а тако што циљано утишава његове супресоре, као што су SPRED1 (енгл. *Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1*) и PIK3R2 (енгл. *Phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2*). Поремећај у регулацији експресије miR-126 је повезан са повећаним ризиком за развој различитих карцинома и лошијом прогнозом. miR-126 има способност да смањи раст различитих тумора, негативно регулишући експресију IRS1 (енгл. *Insulin receptor substrate-1*), VEGF, MMP-9 и PI3K. Додатно, код карциномских ћелија miR-126 има битну улогу у регулацији апоптозе, пролиферације, инвазије, миграције и резистенције на лекове (Chistiakov и сар., 2016; Jalil и сар., 2023). Улога miR-126 у регулацији ангиогенезе је потврђена и на ћелијама ЕКЕ у *in vitro* условима (Yu и сар., 2021). Бројне студије покушавају да развију иновативне терапеутске приступе како би спречили туморску ангиогенезу, инвазију и метастазу фокусирајући се на miR-126 (Jalil и сар., 2023).

Ген за miR-130a се налази на хромозому 11, позиција q12.1. miR-130 може да има онкогену или тумор-супресорску улогу, што зависи од типа карцинома, при чему је показано да учествује у регулацији бројних сигналних путева. Студије су показале да ова миРНК има улогу у развоју и прогресији хепатоцелуларног карцинома, малигних тумора јајника, глиобластома, карцинома простате и колона (Zhang и сар., 2017a). Не и сарадници (2014) су демонстрирали да miR-130a директно таргетије DICER1 и негативно регулише његову експресију код карциномских ћелија грлића материце. Поједине студије су показале да miR-130a може да промовише раст карциномских ћелија преко NF-κB/PTEN/АКТ сигналног пута. Штавише, NF-κB (енгл. *Nuclear factor kappa B*) утиче на повећану експресију miR-130a која инхибира експресију PTEN-а, чиме се иницира активација АКТ сигналног пута и промовише пролиферација малигних ћелија грлића материце (Feng и сар., 2016). Додатно, прекомерна експресија miR-130a може довести до повећане пролиферације и преживљавања туморских ћелија карцинома дојке у *in vitro* условима услед утишавања тумор-супресора PTEN (Wei и сар., 2017). Међутим биолошка улога miR-130a у ЕКЕ остаје недовољно истражена.

4.3. *миРНК као биомаркери у дијагностици карцинома ендометријума*

Биомаркери представљају биолошке молекуле који су локализовани у ткивима, крви или другим телесним течностима и који могу бити знак абнормалног процеса, стања или болести. У медицини, биомаркери могу да се користе за скрининг, за постављање дијагнозе, прогнозе или за праћење ефекта терапије код различитих обољења (Hutt и сар., 2019). У области онкологије, биомаркери тумора специфично идентификују његове карактеристике, у идеалном случају са високим степеном прецизности и поузданости, које указују на њихову специфичност и сензитивност (Passaro и сар., 2024). Тестирање биомаркера код различитих карцинома подразумева одређивање профила туморског ткива и/или телесних течности за детекцију промена у ДНК, молекулима РНК, протеинима или другим биолошким молекулима који могу да обезбеде информације о дијагнози, прогнози карцинома, индивидуализацији терапије карцинома, предвиде одговор на терапију или за праћење тока болести (Sarhadi и Armengol, 2022). Прогностички маркери код различитих тумора могу имати битну улогу у утврђивању прогнозе болести која је независна од третмана. Додатно, предиктивни маркери предвиђају како ће тумор реаговати на одређени третман, што може помоћи у предвиђању исхода лечења (Passaro и сар., 2024). Генетичко тестирање се разликује од тестирања туморских биомаркера и користи се за одређивање наследних генетичких промена асоцираних са склоношћу ка развоју карцинома, или различитих синдрома који су асоцирани са карциномом (Sarhadi и Armengol, 2022).

Осим молекуларних и генетичких промена које се користе за молекуларну класификацију КЕ до данас не постоји биомаркер за дијагностику и прогнозу КЕ који је уведен у стандардну клиничку праксу. Са порастом инциденце и морталитета КЕ неопходно је истражити и развити нове скрининг методе (Hutt и сар., 2019). Један од често истражених маркера код КЕ и оваријума је СА125 (енгл. *Cancer antigen 125*). Међутим његова специфичност је релативно ниска, узимајући у обзир то да је повишен ниво овог маркера такође пријављен код ендометриозе, бенигну цисти оваријума, миома и других бенигну гинеколошких стања. Додатно, HE4 (енгл. *Human epididymis protein 4*) се показао као један од бољих дијагностичких маркера КЕ са умереном сензитивношћу (65%) али високом специфичношћу (91%), међутим са израженом хетерогеношћу резултата међу студијама (Li и сар., 2018; Baker-Rand и Kitson, 2024). Због дијагностичке неспецифичности поменутих маркера, истраживања су и даље усмерена на откривању сензитивнијих и специфичнијих биомаркера који би омогућили правовремену дијагнозу, праћење тока болести и предикцију исхода лечења.

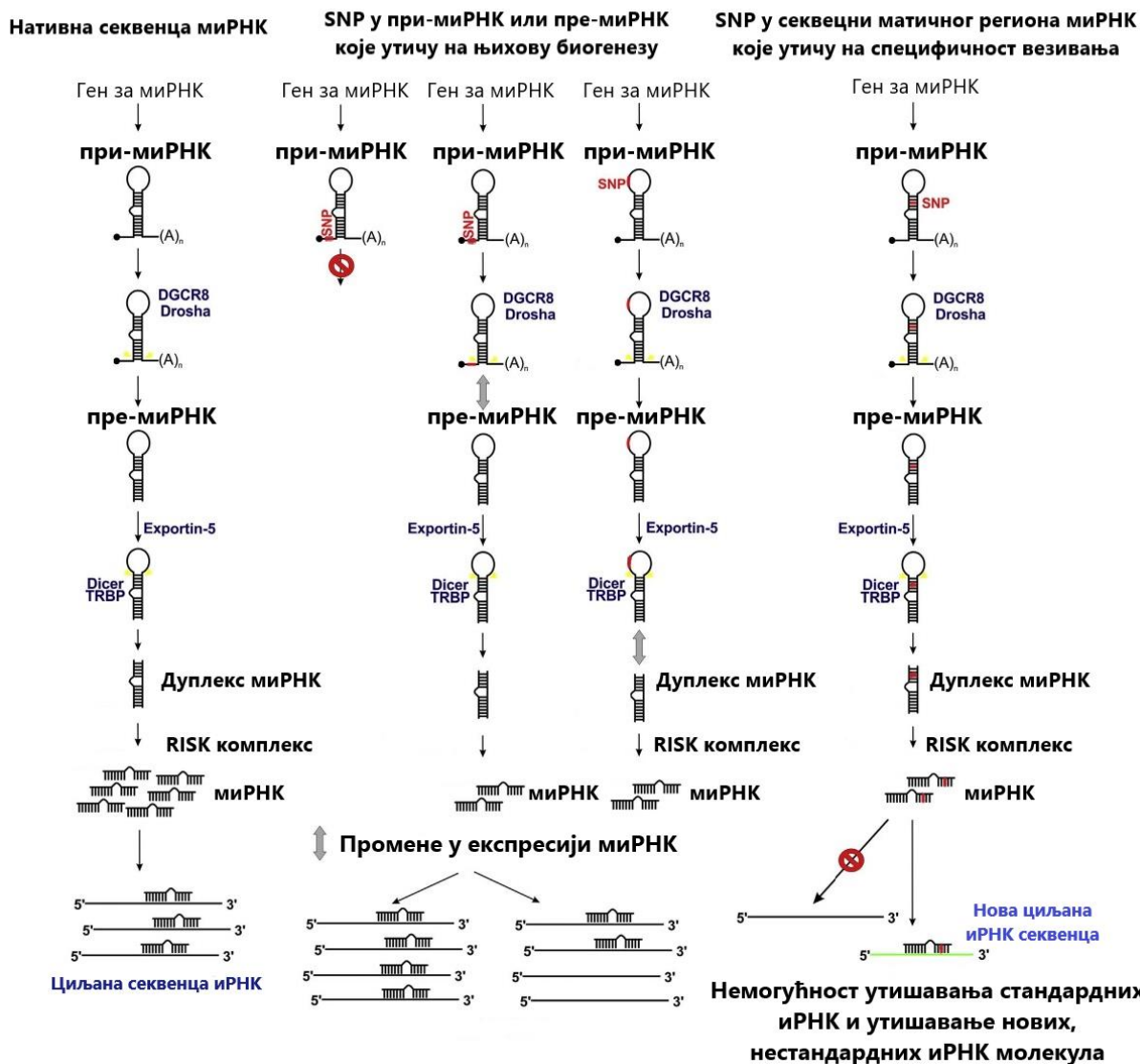
Применом метода за детекцију и квантификацију миРНК из ткива и/или крви, различити профили аберантне експресије миРНК су идентификовани у широком спектру хуманих карцинома, укључујући и КЕ, при чему показују значајан потенцијал као дијагностички и прогностички туморски маркери (Lan и сар., 2015). Испоставило се да миРНК могу бити потенцијални маркери који би допринели повећаној дијагностичкој ефикасности за детекцију различитих карцинома, како појединачно, тако и у комбинацији са стандардним маркерима (Miśkiewicz и сар., 2023). Zhu и сарадници (2022) су показали да ниво егзозомалне miR-205 из плазме у комбинацији са традиционалним серолошким маркерима (СА125 и HE4) побољшава њихову дијагностичку ефикасност код карцинома оваријума. Додатно, Zhou и сарадници (2017) су описали да miR-446 у комбинацији са серумским тумор маркерима повећава дијагностички потенцијал у случају малигнух тумора грлића материце.

За велики број молекула миРНК је установљено да показују различиту експресију између нормалног ткива ендометријума и карциномског. Код КЕ, међу молекулама миРНК, са до сада забележеном повишеном експресијом у односу на контролна ткива, издвојиле су се miR-205, miR-182, miR-183, miR-186, миРНК из фамилије miR-200, miR-222, miR-223, miR-135b и miR-210. Додатно, студије које су показале снижену експресију појединих молекула миРНК код КЕ у односу на неизмењено ткиво показале су мању конзистентност резултата, за разлику од оних који се односе на миРНК молекуле са повишеном експресијом. Молекули миРНК са сниженом експресијом код КЕ обухватају miR-410, miR-137, miR-503, miR-1247, miR-376c, miR-377, miR-214 и друге са мање израженим променама у нивоу експресије (Donkers и сар., 2020). Lee и сарадници (2012) су показали да комбинација од 6 миРНК (miR-21, miR-182, miR-183, miR-200a, miR-200c и miR-205) из ткива ендометријума представља панел који релативно поуздано дискриминише пацијенткиње са КЕ од оних са хиперплазијом или нормалним ендометријумом, са вредностима за сензитивност од 91% и специфичношћу од 94%. Додатно, тестирањем експресионог профила комбинације од 6 миРНК (miR-143-3p, miR-195-5p, miR-20b-5p, miR-204-5p, miR-423-3p и miR-484) у серуму пацијенткиња са КЕ и контролних узорака добијене су вредности за сензитивност од 83.3% и специфичност од 100% (Fan и сар., 2021). Одређене миРНК могу да дискриминишу пацијенткиње у раном стадијуму болести у односу на оне у касном стадијуму. Wilczynski и сарадници (2016) су показали да је висок ниво експресије miR-205 асоциран са раним стадијумом КЕ. Поједине миРНК су показале да имају прогностички значај код пацијенткиња са КЕ, попут miR-34a-5p, miR-26a-1-3p, miR-31-5p и miR-4772-3p (Huang и сар., 2022).

КЕ у узрапредовалом стадијуму представља облик болести са високим ризиком, често доводећи до фаталних исхода. Још увек нејасна патогенеза, хетерогеност болести и тешкоћа у дијагностици доводе до тога да се КЕ често открива у касној фази. Насупрот томе, пацијенткиње које су у раним фазама ове болести имају успешне могућности за излечење, а та излечења се најчешће постижу хистеректомијом. Због свега наведеног, неопходно је истраживати нове, осетљиве и специфичне биомаркере како би се омогућила брза, неинвазивна дијагностика у раним стадијумима болести. Испитивања која се фокусирају на анализу профила експресије гена, укључујући и миРНК, могу додатно унапредити тренутно разумевање основних молекуларних механизма КЕ, пружајући нове увиде у дијагнозу и прогнозу болести, и омогућити развој иновативних терапеутских приступа (Hutt и сар., 2019; Miśkiewicz и сар., 2023).

4.4. Генетичке варијанте у оквиру миРНК молекула

Истраживања генетичких варијанти лоцираних у оквиру гена за молекула миРНК показала су њихов утицај на експресију циљаних гена које регулишу и допринос подложности за развој/прогресију различитих обољења код људи (Moszyńska и сар., 2017). Полиморфизми у појединачним нуклеотидима (SNPs, енгл. *Single Nucleotide Polymorphisms*) у оквиру гена који кодирају миРНК могу се поделити на две групе. Прву групу чине SNPs које утичу на секвенцу при-миРНК или пре-миРНК и испољавају ефекат на биогенезу зрелих миРНК и самим тим доводе до промене у нивоу експресије зрелих молекула миРНК (Слика 9). Ови полиморфизми могу да утичу на процес сазревања миРНК молекула, локализацију или њихову деградацију, због чега долази до промене нивоа зрелих миРНК молекула. С обзиром на то да једна миРНК може циљано да регулише експресију више различитих иРНК молекула, било какве промене у физиолошкој експресији миРНК могу да утичу на експресију бројних гена, како директно тако и индиректно (Króliczewski и сар., 2018).



Слика 9. Утицај SNP на биогенезу и функционалност миРНК молекула (преузето и модификовано из Króliczewski и сар., 2018).

Другу групу полиморфизама чине SNPs који утичу на способности молекула миРНК да препозна циљану секвенцу иРНК молекула коју регулише (Слика 9). Селекција иРНК које миРНК молекули регулишу се најчешће заснива на комплементарном спаривању циљних места у оквиру 3'-UTR-а иРНК са „матичним регионом“ у оквиру секвенце миРНК молекула. Појава SNP у оквиру региона ДНК који кодира зrelu миРНК може утицати на препознавање циљаних иРНК молекула које регулишу, губитак способности или смањену ефикасност везивања миРНК за циљану иРНК. Такође, наведени тип варијанти може утицати на структуру дволанчаног региона прекурсора миРНК, а тиме и на биогенезу зрелих миРНК, или може довести до промена у селекцији ланца дуплекса миРНК који ће бити инкорпориран у RISC. Због свега наведеног, промене у само једној миРНК могу утицати на велики број иРНК молекула и ћелијску хомеостазу доводећи до појаве различитих обољења, укључујући и KE (Króliczewski и сар., 2018).

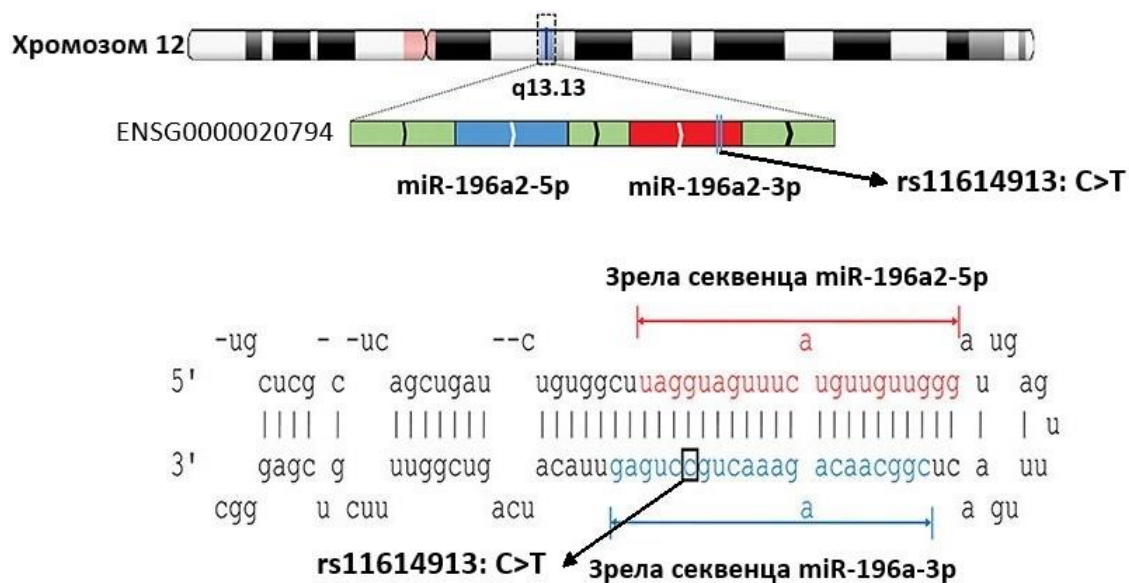
Досадашње студије које су анализирале SNPs у оквиру гена за миРНК утврдиле су повезаност одређених полиморфизама са ризиком за развој и/или прогресију различитих карцинома. Најчешће испитивани SNPs у оквиру гена који кодирају миРНК молекуле за

које је показана асоцијација са повећаним ризиком за развој карцинома дојке су rs2910164 (miR-146a), rs6505162 (miR-423), rs3746444 (miR-499) и rs11614913 (miR-196a2). SNPs који су доведени у везу са повећаним ризиком за развој малигних тумора грлића материце укључују rs4938723 (miR-34b/c), rs4636297 (miR-126), rs1292037 (miR-21), rs2292832 (miR-149) и rs2910164 (miR-146a) (Arancibia и сар., 2021; Li и сар., 2021). Jaafar и сарадници (2022) су приказали значајну асоцијацију SNPs у оквиру гена за miR-27a (rs895819) и miR-423 (rs6505162) са ризиком за развој ендометриозе. Међутим, релативно мали број досадашњих студија испитивао је утицај SNPs у оквиру гена за молекуле миРНК на ризик за развој КЕ. Liu и сарадници (2015) утврдили су значајну повезаност SNPs rs2910164 (miR-146a) и rs3746444 (miR-499) са ризиком за развој КЕ код жена из Кине. Асоцијација наведених генетичких варијанти са ризиком за развој КЕ до сада није испитивана у европским популацијама.

3.4.1. Функционални значај SNPs у генима за miR-196a2 и miR-146a

Бројне студије су показале да miR-196a може да функционише или као онкогена миРНК (инхибирајући експресију различитих тумор-супресорних гена) или као тумор-супресорска миРНК (инхибирајући експресију онкогена). Поједини SNPs у оквиру гена за miR-196a могу да утичу на промену у њеној експресији, сазревању и ефикасности везивања за циљане иРНК молекуле и на тај начин могу да допринесу ризику за развој различитих малигних обољења (Chourani и сар., 2019).

Ген за miR-196a-2 је лоциран у геному човека између генских секвенци за HOXC10 (енгл. *Homeobox C10*) и HOXC9 на хромозому 12, регион q13.13 (Chen и сар., 2011). Претходне студије су показале да miR-196a има кључну улогу у ћелијској пролиферацији и прогресији тумора. Yang и сарадници (2016), су описали онкогену улогу miR-196a-2 у промоцији миграције и инвазије ћелија карцинома оваријума негативном регулацијом HOXA10. Ова студија је додатно описала статистички значајно вишу експресију ове миРНК код карцинома оваријума у односу на бенигна стања оваријума. Поред тога, miR-196a промовише пролиферацију ћелија карцинома оваријума инхибирајући експресију DDX3 (енгл. *DEAD box RNA helicase*) кроз сигнални пут PTEN/PI3K/AKT (Ni и сар., 2020). Генетичка варијанта rs11614913 у оквиру гена за miR-196a2 утиче на секвенцу „заостајућег“ (-3p) ланца (Слика 10) и може двојако испољити свој ефекат на функцију зрелих миРНК: изменама секундарне структуре дволанчаног региона прекурсора и тиме негативним деловањем на биогенезу миРНК, као и утицајем на интеракцију miR-196a-2-3p са циљаним иРНК које регулише у ткивима и стањима у којима се експримира и овај ланац кодиран геном за miR-196a2 (Zhan и сар., 2011; Chourani и сар., 2019). Бројне студије су показале да генетичка варијанта rs11614913 у оквиру miR-196a2 може допринети развоју канцера плућа, хепатоцелуларног карцинома и карцинома главе и врата (Liu и сар., 2018; Gawish и сар., 2020). Супротно, одређене мета-анализе су утврдиле повезаност генетичке варијанте rs11614913 са смањеним ризиком за развој колоректалног и карцином желуца (Yan и сар., 2017). Међутим, нема довољно података о утицају ове генетичке варијанте на ризик за развој КЕ.



Слика 10. Локација генетичке варијанте rs11614913 у геному и измењеног алела у оквиру секвенце зреле miR-196a2-3p (преузето и модификовано из Choupani и сар., 2019).

Ген за miR-146a се налази на хромозому 5, региону q33.3. Бројне студије су показале да има улогу у регулацији ћелијског раста карциномских ћелија, преживљавању, инвазији, миграцији и метастазирању. Chen и сарадници (2017a) су показали да miR-146a промовише апоптозу ћелија карцинома желуца негативном регулацијом TAK1 (енгл. *transforming growth factor β -activated kinase 1*). Додатно, утиче на инхибицију ћелијске миграције и инвазије код карцинома дојке и хепатоцелуларног карцинома (Zu и сар., 2016; Liu и сар., 2016). За разлику од тога, поједине студије указују на онкогену улогу miR-146a тиме што промовише миграцију и инвазију ћелија колоректалног карцинома (Lu и сар., 2017). Ni и сарадници (2022) су показали да је ниска експресија miR-146a асоцирана са лошом прогнозом и ниском стопом преживљавања код пацијенткиња са КЕ. Полиморфизми и мутације у оквиру гена за miR-146a могу да утичу на повећани ризик за различите болести. Генетичка варијанта rs6864584 се налази у оквиру промотора гена за miR-146a и потенцијално може утицати на експресију и функцију ове миРНК (Luo и сар., 2011). Salimi и сарадници (2022) су у истраживању спроведеном у иранској популацији приказали повезаност генетичке варијанте rs6864584 са смањеним ризиком за идиопатски рекурентни спонтани побачај. Овај генетичка варијанта је такође доведена у везу са смањеним ризиком за развој хроничних болести бубрега код пацијената без дијабетеса (Sargazi и сар., 2022). Међутим, подаци о потенцијалној асоцијацији генетичке варијанте rs6864584 са ризиком за развој КЕ не постоје.

II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Правовремена детекција КЕ је један од најбитнијих фактора за успешно излечење оболелих пацијенткиња, с обзиром на то да је овај тип карцинома успешно излечив у његовом раном стадијуму. До данас адекватан скрининг тест за КЕ није уведен у стандарду клиничку праксу, због чега је неопходно истражити нове специфичне тумор маркере који би могли допринети откривању ове болести у раној фази. Испитивања која се фокусирају на анализу профила експресије циљаних гена и молекула миРНК могу додатно унапредити тренутно разумевање основних молекуларних механизма настанка и прогресије КЕ, пружајући нове увиде у дијагностику, прогнозу болести и развој иновативних терапеутских приступа. Досадашња истраживања о молекулима миРНК су показала значајан потенцијал за њихово коришћење у дијагностичке сврхе код различитих обољења. У складу са претходно изнетим чињеницама, изведени су **општи** циљеви докторске дисертације:

- Испитивање нивоа експресије и дијагностичког потенцијала миРНК, иРНК молекула и протеина који играју неизоставну улогу у малигној трансформацији ендометријума.
- Испитивање разлика у нивоима експресије анализираних молекула у односу на одговарајуће патохистолошке и основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ.
- Испитивање учесталости алела генетичких варијанти у генима за миРНК и одређивање асоцираног ризика за развој КЕ.

У односу на опште циљеве изведени су **специфични циљеви** докторске дисертације:

- Формирање генома, транскриптома и протеома као модел система за истраживање ткива КЕ и контролних ткива ендометријума (К) изолацијом геномске ДНК, укупне РНК и протеина.
- Испитивање нивоа експресије молекула миРНК (miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a), иРНК за DICER1, AGO2, HIF1, VEGFA и PTEN у оквиру узорак ткива КЕ и К.
- Квантификација протеина PTEN и MMP-9 из ткива КЕ и К.
- Испитивање разлика у нивоима експресије анализираних молекула између ткива КЕ и К са циљем дефинисања њиховог потенцијалног дијагностичког значаја.
- Одређивање разлика у нивоима експресије анализираних молекула између група пацијенткиња са КЕ формираних на основу патохистолошких и основних клиничких карактеристика пацијенткиња са КЕ.
- Одређивање корелације између нивоа експресије анализираних молекула и вредности одређених патохистолошких и основних клиничких карактеристика пацијенткиња са КЕ.
- Испитивање индивидуалног дијагностичког биомаркерског потенцијала анализираних молекула.
- Одређивање комбинације анализираних потенцијалних биомаркера са најзначајнијим дијагностички потенцијалом.
- Испитивање разлика у учесталости алела генетичке варијанте rs11614913 (C/T) у гену за miR-196a2 и rs6864584 (T/C) у гену за miR-146a између пацијенткиња са КЕ и К.

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментална истраживања у оквиру докторске дисертације су рађена у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Истраживања су до краја 2019. године финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у оквиру пројекта Преклиничка испитивања биоактивних супстанци (ПИБАС), евиденциони број ИИИ 41010. Од 2020. године истраживање је финансирано од стране поменутог Министарства по уговору о реализацији и финансирању научноистраживачког рада НИО бр. 451-03-68/2020-14/200122 за 2020. годину, 451-03-9/2021-14/200122 за 2021. годину и 451-03-68/2022-14/ 200122 за 2022. годину. Министарство науке, технолошког развоја и иновација је финансирало истраживање током 2023. (бр. уговора: 451-03-47/2023-01/ 200122 и 451-03-47/2023-01/200111) и 2024. године (бр. уговора: 451-03-66/2024-03/ 200122).

1. Хемикалије и реагенси

За потребе истраживања коришћене су хемикалије и реагенси различитих произвођача. Физиолошки раствор са фосфатним пуфером (PBS, енгл. *Phosphate Buffered Saline*) је набављен од *Capricorn Scientific*, Немачка. Хлороформ, изопропанол и апсолутни етанол чистоће погодне за PCR су добијени од *Fisher Scientific*, Сједињене Америчке Државе (САД). Етидијум бромид, бромфенол плава боја (енгл. *Bromophenol Blue*), диметил сулфоксид (DMSO, енгл. *Dimethyl Sulfoxide*), говеђи албумински серум (BSA, енгл. *Bovine Serum Albumin*) од *SERVA*, Немачка. Лимунска киселина, магнезијум хлорид ($MgCl_2$), натријум хлорид (NaCl), Na_2EDTA (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*), водоник пероксид (H_2O_2), агароза, глицерол, трис(хидроксиметил) аминометан (TRIS, енгл. *Tris(hydroxymethyl) aminomethane*), *Tween 20*, *Triton X-100* и *Coomassie Brilliant Blue G-250* су добијени од *Sigma-Aldrich*, САД. Натријум ацетат и сахароза су добијени од *Merck*, Немачка. Фосфорна киселина је набављена од *Carlo Erba*, Италија. Тетраметилбензедин (TMB, енгл. *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*) је добијен од *Karl Roth*, Немачка. Пуфер за електрофорезу (ТБЕ, енгл. *Tris/Borate/EDTA*) је добијен од *Ambion Inc.* САД. Етидијум бромид је набављен од *Acros Organics*, Белгија. Реагенс за РНК изолацију *RNA Extracol*, кит за реверзну транскрипцију *NG dART RT kit* и кит за квантитативни PCR *SG/ROX onTaq qPCR Master Mix* су добијени од *EURx*, Пољска. *AMPLIFYME SG Universal Mix* је добијен од *Blirt*, Пољска. Вода чистоће погодне за PCR, кит за реверзну транскрипцију *First Strand cDNA Synthesis Kit* и протеиназа К су добијени од *Thermo Fisher Scientific*, САД. За квантификацију протеина PTEN коришћен је *Human PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) ELISA Kit* који је добијен од *ELK Biotechnology*, Кина, док је за квантификацију протеина MMP-9 коришћен *Human MMP-9 ELISA kit DUOSET R&D Systems*, САД. Сумпорна киселина (H_2SO_4) је добијена од *Alkaloid*, Северна Македонија. *QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen)*, Немачка) је коришћен за амплификацију циљаних ДНК секвенци. Маркер ДНК (*100 bp DNA Ladder*,) је добијен од *Solis BioDyne*, Естонија.

2. Дизајн студије и критеријуми за укључивање пацијенткиња

Студија је спроведена након одобрења Етичког комитета Универзитетског клиничког центра Крагујевац (бр. 01-19-1592) и у складу са Хелсиншком декларацијом. Све пацијенткиње су писмено и усмено информисане и дале пристанак за укључивање у

ову студију. Стандардним хируршким захватима у Универзитетском клиничком центру Крагујевац од 2019. до 2022. године сакупљено је 40 узорака ткива КЕ и 16 К. Тотална хистеректомија са билатералном салпингоофоректомијом и лимфаденектомијом урађена је код пацијенткиња са КЕ, док је у К групи урађена експлоративна киретажа. По обављеној операцији, узорци ткива КЕ и К су чуване у течном азоту на -196 °C до обављања анализа. Свих 56 узорака је подвргнуто патохистолошком прегледу. Инвазија лимфоваскуларног простора није показана ни код једне пацијенткиње, што је потврђено патохистолошким подацима.

Критеријуми за укључивање у студију за групу пацијенткиња са КЕ су били: потписан информисани пристанак за укључивање у студију, патохистолошка верификација КЕ и одсуство претходне терапије. Пацијенткиње са другим гинеколошким малигнитетима или укљученом преоперативном терапијом су искључене из студије. За укључивање у К групу погодним су сматране искључиво пацијенткиње са хиперплазијом ендометријума или другим бенигним стањем ендометријума (мијом, лејомијом, ендометриоза и аденомиоза), потврђеним патохистолошким прегледом и потписаним информисаним пристанком. Из К групе искључене су пацијенткиње са атипичном хиперплазијом ендометријума и пацијенткиње са текућом терапијом.

3. Изолација молекула РНК

Узорци ткива (~50 mg) су хомогенизовани у течном азоту помоћу тучка и авана, након чега је додато 1 mL *RNA Extracol* реагенса по узорку и вршена је додатна хомогенизација пипетом. Даљи поступак изолације укупне РНК, вршен је према упутству произвођача. У зависности од величине талога РНК, узорци су растварани у 20-100 μ L воде чистоће погодне за PCR и третиране инхибитором РНаза – DEPC (енгл. *Diethylpyrocarbonate*). Провера концентрације и чистоће изоловане РНК је вршена је спектрофотометријски на апарату *Eppendorf BioPhotometer*. Чистоћа изоловане РНК је проверена пратећи однос апсорбанце на A260 и A280 nm. Узорци који су показали вредност ~2 за апсорбанцу A260/A280 nm су сматрани чистим узорцима. Након прерачунате концентрације изоловане РНК, узорци су аликвотирани и разблажени водом третираном са DEPC до концентрације од 1 μ g/ μ L, укупне запремине од 10 μ L.

4. Реверзна транскрипција

Реверзна транскрипција (RT) молекула миРНК (miR-200a-3p, miR-21-5p, miR-210-3p, miR-126-3p и miR-130a-3p) и ендогене контроле мале нуклеарне РНК U6 (U6 snRNA, енгл. *U6 Small Nuclear RNA*) је вршена помоћу *NG dART RT kit*-а и специфичних прајмера. Свака реакција у укупној запремини од 20 μ L садржала је 4 μ L пуфера (*5x NG cDNA Buffer*), 1 μ L мешавине реверзне транскриптазе и инхибитора рибонуклеазе (*NG dART RT Mix*), 1.4 μ L мешавине специфичних прајмера за реверзну транскрипцију миРНК молекула (Табела 2), при чему је финална концентрација сваког прајмера у PCR смеши износила 0.12 μ M, 12.6 μ L воде чистоће погодне за PCR (третиране са DEPC) и 1 μ g укупне РНК (1 μ L РНК концентрације 1 μ g/ μ L). Програм за реверзну транскрипцију се састојао из два корака, елонгације на температури од 50 °C током 60 минута и терминације у трајању од 5 минута на 85 °C. Реверзна транскрипција је вршена у уређају *Eppendorf mastercycler EpGradient S PCR*.

Реверзна транскрипција иРНК за *PTEN*, *HIF1A*, *VEGFA* и *GAPDH* вршена је помоћу *NG dART kit*-а у реакцији од 20 μL , користећи насумичне хексаолигонуклеотиде као прајмере (енгл. *Random Hexamer Primers*) из поменутог кита у финалној концентрацији од 10 ng/ μL . Реакција реверзне транскрипције је припремана и услови инкубације у машини за PCR су подешени према упутству произвођача, као у случају миРНК, при чему је коришћен 1 μL укупне РНК (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Табела 2. Специфични прајмери за реакцију реверзне транскрипције молекула миРНК и ендогене контроле U6 snRNA, преузети из студије Wang (2009).

Специфични прајмери за RT	Секвенца прајмера у 5'-3' смеру
U6 snRNA	AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG
miR-200a	ACGCCACAATTAACAAGCCACATCGTTAC
miR-210	CGGTGTAGGTTTCGTGATTGACTCAGCCGC
miR-126	GCTCGACCTCGGAAACTATGGCATTATTAC
miR-21	CACTGTCTAGCACGACACTAATCAACATCAG
miR-130a	GAGGCGACTGCCTAAACTATGCCCTTT

RT – реверзна транскрипција.

Реверзна транскрипција иРНК *DICER1* и *AGO2* укључених у биогенезу молекула миРНК вршена је помоћу *First Strand cDNA Synthesis Kit*-а. Укупна реакција реверзне транскрипције износила је 20 μL и садржала је 4 μL пуфера за реакцију реверзне транскрипције (5 X *Reaction Buffer*), 1 μL инхибитора рибонуклеазе (*RiboLock RNase Inhibitor*, 20 U/ μL), 2 μL укупне смеше дезоксирибонуклеотид трифосфата (*dNTP Mix*) у концентрацији од 10 μM , 2 μL реверзне транскриптазе (*M-MuLV Reverse Transcriptase*, 20 U/ μL), 1 μL прајмера са насумично распоређеним хексаолигонуклеотима (енгл. *Random hexamer primers*) из поменутог кита концентрације од 100 μM , 9 μL воде PCR чистоће и 1 μL аликвотиране укупне РНК. Након припремљених реакција, реверзна транскрипција је вршена у PCR апарату (*Eppendorf mastercycler EpGradient S PCR*) у следећим условима: инкубација 5 минута на 25 $^{\circ}\text{C}$, након чега је уследила инкубација 60 минута на 37 $^{\circ}\text{C}$ и терминација на 70 $^{\circ}\text{C}$ током 5 минута.

5. Квантитативни PCR у реалном времену

Испитивање нивоа експресије молекула миРНК и тестираних гена вршена је ланчаном реакцијом полимеризације у реалном времену (qPCR, *quantitative real-time PCR*) у апарату *Applied Biosystems 7500* и користећи одговарајући софтвер (*Real-Time PCR Software v2.0*). Детекција нивоа експресије у реалном времену је вршена помоћу *Sybr green* боје која интеркалира у дволанчани молекул ДНК. Током експоненцијалног умножавања ДНК молекула, апарат бележи пораст интензитета флуоресценце након сваког циклуса. Као пасивна референтна боја, коришћена је *ROX* у концентрацији компатибилној са захтевима апарата. Након значајног пораста интензитета флуоресцентне боје, апарат бележи број циклус у којем је интензитет флуоресценце достигао пражну вредност (*Ct* вредност, енгл. *Cycle threshold*), а који је коришћен као резултат за даљу обраду. Помоћу криве топљења ДНК молекула вршена је провера присуства артефаката димера прајмера, других облика неспецифичног умножавања или контаминације у узорку за сваки потенцијални маркер.

За одређивање релативне експресије молекула миРНК, као и релативне експресије гена *PTEN*, *HIF1A* и *VEGFA*, коришћен је *SG/ROX onTaq qPCR Master Mix*. Као ендогена контрола за експресију миРНК коришћена је snRNA U6, док је за испитивање експресије иРНК коришћен *GAPDH*. Реакције у укупној запремини од 20 μ L садржале су 10 μ L PCR мешавине са *Sybr green* и *Rox* бојом (*SG/ROX onTaq qPCR Master Mix* 2x), по 0.5 μ L *Forward* и *Reverse* прајмера (почетне концентрације 10 mM) приказаних у Табели 3, воду чистоће погодне за PCR (8 μ L) и 1 μ L комплементарне ДНК. Програм за qPCR је обухватао иницијалан корак активације полимеразе и денатурације ДНК молекула током 15 минута на 95 °C, након чега је уследило 40 циклуса амплификације. Сваки циклус се састојао од три корака: први корак денатурације током 15 секунди на 94 °C, други корак хибридизације прајмера током 30 секунди на 55 °C за миРНК и 60 °C за тестиране гене, и трећи корак елонгације прајмера током 30 секунди на 72 °C. Након амплификационих циклуса уследио је корак анализе криве топлеења при чему су подаци прикупљани током пораста температуре између 60 и 94 °C.

За испитивање релативне експресије гена *DICER1* и *AGO2* коришћен је *AMPLIFYME SG Universal Mix* пратећи упутства произвођача кита за припрему реакционе смеше од 20 μ L. Парови прајмера коришћени за амплификацију продуката PCR-а који одговарају фрагментима иРНК *DICER1*, *AGO2* и ендогене контроле *GAPDH* приказани су у Табели 3. За сваку реакцију је коришћено по 1 μ L комплементарне ДНК. Програм за реакцију qPCR је био идентичан као за остале испитиване гене. Једино се разликовала температура за денатурацију ДНК молекула, која је износила 95 °C. Релативна експресија молекула миРНК и иРНК је израчуната применом методе $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak и Schmittgen, 2001).

Табела 3. Секвенце узводних (*Forward*) и низводних (*Reverse*) прајмера коришћених за qPCR.

Прајмер	Секвенца <i>Forward</i> прајмера у 5'-3' смеру	Секвенца <i>Reverse</i> прајмера у 5'-3' смеру
snRNA U6	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC
miR-200a	CCTACGCCACAATTAACAAGCC	GCCGTCTAACACTGTCTGGTA
miR-210	CCGGTGTAGGTTTCGTGATTGAC	ACGTACTGTGCGTGTGACA
miR-126	CTGCTCGACCTCGGAAACTATG	AGCATGAATCGTACCGTGAGT
miR-21	CCACTGTCTAGCACGACACTAA	GCCAGGCATAGCTTATCAGACTG
miR-130a	TACTGAGGCGACTGCCTAAACT	GCCAGCCAGTGCAATGTTAAAA
<i>GAPDH</i>	TGACTTCAACAGCGACACCCA	CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA
<i>DICER1</i>	TTAACCTTTTGGTGTTCGTGAGTGT	GGACATGATGGACAATTTTCACA
<i>AGO2</i>	TCATGGTCAAAGATGAGATGACAGA	TTTATTCCTGCCCCCGTAGA
<i>PTEN</i>	ACGACGGGAAGACAAGTTCA	AGGTTTCCTCTGGTCTGGT
<i>HIF1A</i>	CCACCTCTGGACTTGCCTTT	TTTTCTTGTGCTTCGCGCC
<i>VEGFA</i>	ACGGTCCCTCTTGGAATTGG	CTAATCTTCCGGGCTCGGTG

6. Хомогенизација ткива за одређивање концентрација протеина

За одређивање концентрације протеина PTEN и MMP-9, коришћени су хомогенизати ткива. Након вађења из криотуба, једнократним (стерилним) хируршким

ножем је исечено и измерено 50 mg узорак ткива KE и K. Ткива су детаљно испрана хладним физиолошким раствором са PBS-ом, како би се у потпуности отклонио вишак крви. Након тога, ткива су хомогенизована уз помоћ тучка и авана, уз додавање течног азота. Уситњена ткива су ресуспендована у 500 μ L PBS-а након чега је вршена сонификација (*Ultrasonic homogenizers Sonopuls, Bandelin electronic GmbH & Co., Немачка*) узорак на леду, до момента када је раствор постао бистар. Овако добијен хомогенизат је центрифугиран 5 минута на 10.400 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*), након чега је прикупљен супернатант који се користио за мерење концентрације укупних протеина и одређивање концентрације протеина PTEN и MMP-9.

7. Bredford-ов тест

Одређивање концентрације укупних протеина *Bredford*-овим тестом је заснован на принципу везивања молекула боје, *Coomassie Brilliant Blue G-250*, за протеине, што доводи до промене спектра апсорпције боје. Када се боја веже за протеин, њен максимум апсорпције се помера са 465 nm на 595 nm, што резултира променом боје из браон у плаву. *Bredford*-ов реагенс у укупној запремини од 100 mL је направљен према следећем протоколу: 10 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* боје је растворено у 5 mL 95% етанола. Након тога, додато је 10 mL 85% (w/v) фосфорне киселине. Овако припремљен раствор је разблажен са 85 mL воде чистоће погодне за PCR (пажљивим додавањем раствора у воду) и филтриран кроз *Watman*-ов филтер папир (Kruger, 2009). У 980 μ L *Bredford*-овог реагенса додато је 20 μ L узорка или стандарда хомогенизата ткива, раствор је промешан и апсорбанца је мерена спектрофотометријски на апарату *Eppendorf BioPhotometer* (Немачка), на 595 nm након 5 минута. Концентрације укупних протеина су прерачунате уз помоћ софтвера *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism Software v.8.0.2*) према стандардној криви за BSA раствореног у PBS-у.

8. Мерење концентрације протеина PTEN методом Sandwich ELISA

Метода *Sandwich ELISA* (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) коришћена је за мерење концентрације протеина PTEN, уз помоћ *Human PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) ELISA Kit*-а. Сви кораци ове анализе рађени су према упутству произвођача. Концентрација укупних протеина коришћених у овој анализи је износила 20 μ g/mL, у запремини од 100 μ L. За добијање стандардне криве коришћене су следеће концентрације стандарда PTEN: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 и 0.32 ng/mL. У наставку је приказана кратка процедура и принцип методе. Микротитарска плоча у оквиру кита је обложена антителом специфичним за PTEN. Најпре се стандарди или узорци додају у одговарајуће бунариће, након чега се испирају и врши се инкубација са антителом специфичним за PTEN конјугован са биотином. Затим се додаје авидин конјугован са пероксидазом рена (HRP, енгл. *Horse Radish Peroxidase*) и врши инкубација. Након што се дода раствор супстрата ТМВ, бунарићи који садрже протеин PTEN, ће показати промену боје, при чему је концентрација протеина пропорционална интензитету боје. Реакција ензим-супстрат се завршава додавањем раствора сумпорне киселине и промена боје из плаве у жуту се мери спектрофотометријски на таласној дужини од 450 nm.

Апсорбанце на таласној дужини од 450 nm су очитане помоћу *ELISA* читача (*ELISA reader RT-2100C, Ivumen*). Од добијених апсорбанци за стандард и узорке одузете су апсорбанце слепе пробе, након чега су коришћене за прерачунавање концентрације. Концентрације протеина PTEN за сваки узорак су прерачунате у односу на стандардну криву за PTEN уз помоћ софтвера *GraphPad Prism*.

9. Мерење концентрације протеина MMP-9 методом Sandwich ELISA

Концентрације активне или проформе ензима MMP-9, који учествује у разградњи протеина екстраћелијског матрикса, мерене су помоћу *Human MMP-9 DuoSet ELISA Kit*-а. Примарно антитело за хватање (енгл. *Capture Antibody*) у концентрацији од 1 µg/mL наливено је у бунариће микротитарске плоче (100 µL). Након инкубације током 24 h на собној температури, плоча је испрана три пута са по 400 µL пуфера за испирање (енгл. *Wash Buffer*), водећи рачуна да се након последњег испирања у потпуности уклони остатак течности. Пуфер за испирање се састојао од 0.05% Tween 20 детерџента раствореног у PBS-у (pH 7.4). Плоча је блокирана са 300 µL 1% BSA у PBS-у (*Reagent Diluent*) и инкубирана 1 h на собној температури како би се спречило неспецифично везивање антитела и узорака. Плоча је поново испрана, додато је по 100 µL припремљеног стандарда или узорка (20 µg/mL) и вршена је инкубација током 2 h. Након испирања плоче, додато је по 100 µL примарног антитела за детекцију (енгл. *Detection Antibody*) у концентрацији од 1 µg/mL које је инкубирано 2 h на собној температури. Након поновљеног испирања, у бунариће плоче је додато по 100 µL *Streptavidin-HRP*-а након чега је плоча инкубирана 20 минута у мраку. По истеку инкубације додато је 100 µL раствора супстрата (енгл. *Substrate Solution*) који је направљен по следећој рецептури: 100 µL 41.6 mM TMB-а раствореног у DMSO-у је додато у 9.9 mL цитрат-ацетатног пуфера (припремљен додавањем 0.1 M лимунске киселине у 0.1 M натријум ацетата до pH 6) након чега је додато и 3 µL 30% водоник пероксида. Након инкубације плоче у одсуству светлости током 20 минута, развијање боје је заустављено са по 50 µL 2N H₂SO₄ (*Stop Solution*) након чега је одмах очитана апсорбанца на таласној дужини од 450 nm помоћу ELISA читача (*ELISA reader RT-2100C, Ivymen*). Концентрације ензима MMP-9 у узорцима су прерачунате на основу вредности апсорбанце за познате концентрације у стандарду (10, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 и 0.03125 ng/mL) користећи софтвер *GraphPad Prism*.

10. Изолација молекула ДНК

Изолација молекула ДНК вршена је модификованом методом исољавања (Maugra и сар., 2013). Хомогенизација узорака ткива КЕ и К вршена је помоћу авана и тучка уз додавање течног азота. Хомогенизована ткива су ресуспендована у 1 mL пуфера за лизирање еритроцита (10 mM TRIS-HCl, 0.3 M сахароза, 1% *Triton X-100* и 5 mM MgCl₂, pH 7.5). Након овог корака, вршено је центрифугирање узорака на 13.200 rpm и одстрањивање супернатанта. Корак испирања хомогенизата са пуфером за лизирање еритроцита и центрифугирање може бити понављан до момента када талог нелизираних ћелија више не садржи примесе еритроцита. Талог хомогенизата је ресуспендован у 300 µL пуфера за лизирање ћелија (10 mM TRIS-HCl, 400 mM NaCl и 2 mM Na₂EDTA, pH 8.0), након чега је додато 20 µL 10% SDS-а и 20 µL протеиназе К (20 mg/mL). Овако припремљен раствор је инкубиран 2 h на 56 °C, до момента када је постао бистар. По истеку инкубације, додато је 100 µL 6 M NaCl и раствор је мешан током 10 секунди на вортекс мешалици, након чега је центрифугиран 3 минута на 13.200 rpm. Супернатант је пребачен у нову епрувету од 1.5 mL и додато је 1 mL хладног апсолутног етанола, након чега је раствор центрифугиран 2 минута на 13.200 rpm. Додатно пречишћавање талоба ДНК молекула је вршено са 70% етанолом и центрифугирање је поновљено. Након избацивања супернатанта талог је осушен на собној температури и растворен у води чистоће погодне за PCR. Концентрација и чистоћа изолованог молекула ДНК је очитана на апарату *Eppendorf BioPhotometer*. Узорци са односом апсорбанци (A₂₆₀/A₂₈₀ nm) вредности између 1.8 и 2 су сматрани чистим узорцима без значајних примеса РНК молекула и протеина.

11. Генотипизација генетичких варијанти PCR-RFLP методом

За генотипизацију генетичке варијанте rs11614913a у оквиру ДНК секвенце гена за miR-196a2 и rs6864584 у оквиру гена за miR-146a коришћена је метода анализе полиморфизама у дужини рестрикционих фрагмената продукта PCR-а (PCR-RFLP, енгл. *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Ова метода омогућава умножавање циљаног региона молекула ДНК од интереса након чега се врши његова дигестија са рестрикционим ендонуклеазама, што омогућава генотипизацију одређених генетичких варијанти након визуализације продукта рестрикционе реакције електрофорезом на агарозном гелу.

11.1. Ланчана реакција полимеризације секвенци гена за miR-196a2 и miR-146a

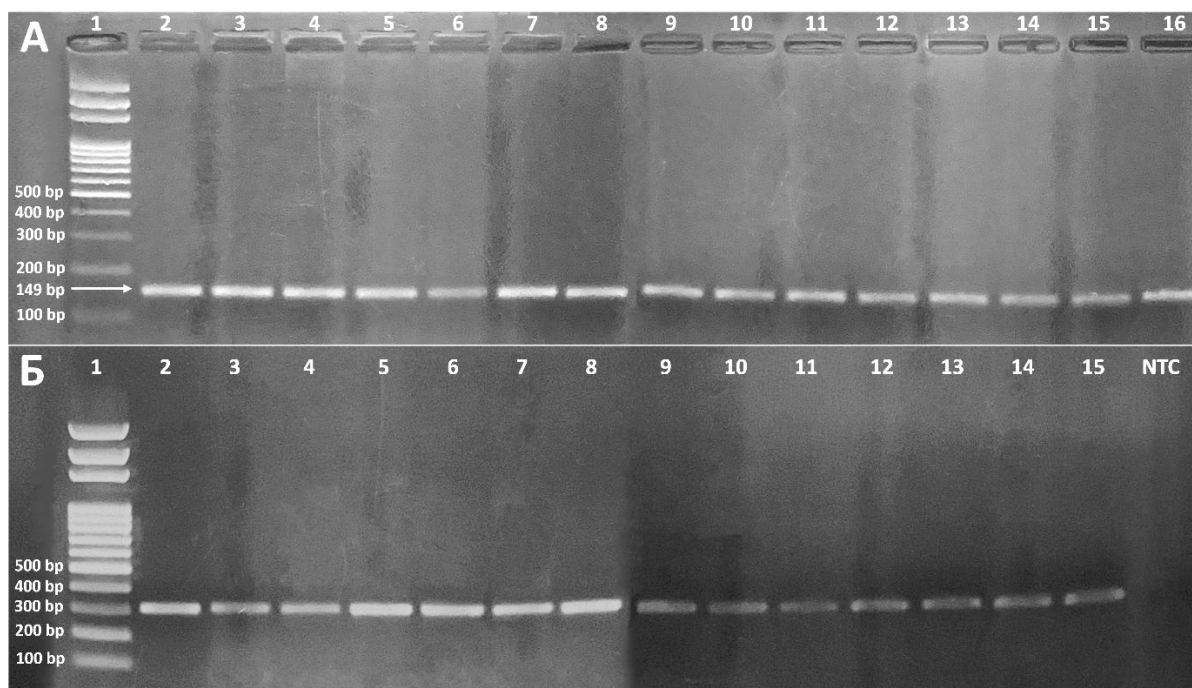
Амплификација секвенци гена за miR-196a2 и miR-146a који окружују испитиване генетичке варијанте вршена је помоћу *QIAGEN Multiplex PCR Kit*-а, у апарату *Eppendorf mastercycler EpGradient S PCR*. Укупна запремина реакције PCR-а износила је 20 μL и састојала се од 10 μL PCR мешавине (*2X Qiagen Mix*, почетна концентрација), по 0.5 μL *Forward* и *Reverse* прајмера (Табела 4) почетне концентрације 10 μM , 5 μL воде чистоће погодне за PCR и 4 μL узорка ДНК концентрације 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Услови амплификације у PCR апарату обухватали су корак денатурације молекула ДНК током 15 минута на 95 $^{\circ}\text{C}$, након чега је уследило 40 циклуса амплификације. Сваки циклус је обухватао денатурацију молекула ДНК током 30 секунди на 94 $^{\circ}\text{C}$, хибридизацију прајмера 90 секунди на 57 $^{\circ}\text{C}$ за варијанту у гену за miR-196a2 и 60 секунди на 59 $^{\circ}\text{C}$ за варијанту у гену за miR-146a, док је елонгација прајмера обухватала корак од 60 секунди на 72 $^{\circ}\text{C}$. Завршна елонгација је била подешана на трајању од 10 минута на температури од 72 $^{\circ}\text{C}$.

Табела 4. Секвенце узводних и низводних прајмера (*Forward* и *Reverse*) коришћених за амплификацију секвенци ДНК у оквиру гена за miR-196a2 и miR-146a које окружују испитиване генетичке варијанте.

Прајмер	Секвенца <i>Forward</i> прајмера у 5'-3' смеру	Секвенца <i>Reverse</i> прајмера у 5'-3' смеру
miR-196a2	CCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATA	CGAAAACCGACTGATGTAACCTCCG
miR-146a	CGGAGAGTACAGACAGGAAGC	TAGATCCCTCCTCGGCACAGC

11.2. Провера успешности реакције

Провера успешности реакције PCR-а је вршена електрофорезом на агарозном гелу. Агарозни гел (2.5% за продукте амплификације сегмента ДНК који окружује варијанту у гену за miR-196a2 и 1.5% за продукте амплификације фрагмента који окружује варијанту у гену за miR146a) је направљен у 50 mL TBE пуфера уз додавање 4 μL етидијум бромид концентрације 5 mg/mL . У први бунарић је наливан ДНК маркер, док је у остале бунариће додато 4 μL продукта PCR реакције (Слика 11), претходно измешаних са 1 μL пуфера за наливање (енгл. *Loading buffer*). Пуфер за наливање је припремљен додавањем 0.05 g бромфенол плаве боје у 1 mL dH_2O и 1 mL глицерола. Електрофореза је вршена применом напона од 75 V у трајању од 40 минута.



Слика 11. Провера успешности PCR реакције на агарозном гелу. 1 – ДНК маркер (100 bp), А) 2-16 – амплификоване секвенце гена за miR-196a2 (149 bp) и Б) 2-15 – амплификоване секвенце гена за miR-130a (300 bp), NTC – контрола без матрице ДНК.

11.3. Анализа полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (RFLP)

Метода RFLP се користи за генотипизацију генетичких варијанти и заснива се на препознавању рестрикционих места на ДНК молекулу од стране рестрикционих ензима (Tarach, 2021). Испитивање генетичке варијанте rs11614913 (ген за miR-196a2, C>T) вршено је помоћу рестрикционог ензима *MspI* (EURx, Гдањск, Пољска), док је за испитивање rs6864584 (ген за miR-146a, T>C) коришћен ензим *Apal* (EURx, Гдањск, Пољска). Рестрикциона дигестија продуката PCR амплификације рађена је у укупној запремини од 25 μ L, при чему се свака реакција састојала из 2.5 μ L пуфера за рестрикцију (10x ONE Buffer, почетна концентрација), 0.25 μ L концентрованог BSA (100x, почетна концентрација), 0.5 μ L одговарајућег рестрикционог ензима у почетној концентрацији од 10 U/ μ L, 13.75 μ L воде чистоће погодне за PCR и 8 μ L амплификованог PCR продукта. Инкубација рестрикционих реакција је вршена у апарату *Eppendorf mastercycler EpGradient S PCR* и обухватала је два корака. Корак рестрикционе реакције за узорке са ензимом *MspI* је обухватао инкубацију реакција током 1 h на 37 °C, док је корак терминације рестрикционе реакције трајао 20 минута на температури од 65 °C. Кораци рестрикционе дигестије и терминације реакције за ензим *Apal* су обухватили инкубацију током 1 h на 25 °C и 20 минута на 65 °C, редом.

Анализа рестрикционих фрагмената је вршена електрофорезом на агарозном гелу (3% гел за miR-196a2 и 1.5% за miR-146a) уз бојења гела са етидијум бромидом и визуелизацију фрагмената помоћу *UV transilluminator-a* (*VilberLourmat*, Немачка). Очекиване дужине фрагмената за генетичку варијанту rs11614913 су један фрагмент од 149 bp за генотип ТТ, два фрагмената од 122 и 25 bp за генотип СС и три фрагмената од 149, 122 и 25 bp за хетерозиготни генотип СТ. У случају генетичке варијанте rs6864584,

у оквиру гена за miR-146a, очекиване дужине фрагмената су један фрагмент дужине 300 bp за генотип TT, два фрагмената од 152 и 148 bp за генотип CC и три фрагмената од 300, 152 и 148 bp за хетерозиготни генотип TC.

12. Статистичка обрада података

Анализа експресије гена рађена је у три независна експеримента док је квантификација протеина одрађена у два независна експеримента. Добијени резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка (SE) и обрађени помоћу софтвера *SPSS (IBM SPSS statistics v.23.0, Њујорк, САД)*. Разлике између карактеристика пацијенткиња са KE и K утврђене су коришћењем унакрсне табеле (енгл. *Crosstabs*) и χ^2 (енгл. *Chi-square*) теста. Студентов Т-тест и *ANOVA* тест су коришћени за испитивање статистички значајних разлика ($p < 0.05$) код података који су имали нормалну расподелу. Вредности статистичке значајности у опсегу између 0.1 и 0.05 су представљене као статистички тренд. За податке који нису показали нормалну расподелу коришћени су *Mann–Whitney U* и *Kruskal–Wallis H* тестови. Непараметарски *Spearman*-ов тест је коришћен за анализу корелације између вредности континуираних варијабли (Mukaka, 2012). Криве радне карактеристике пријемника (ROC, енгл. *Receiver Operating Characteristics Curve*), конструисање стандардне криве, прерачунавање концентрација тестираних протеина и графици приказани у резултатима су добијени помоћу софтвера *GraphPad Prism (GraphPad Prism Software v.8.0.2)*. Вредности површине испод криве (AUC, енгл. *Area Under the Curve*), линеарна “*Stepwise*” регресија и бинарна логистичка регресија су рађене помоћу софтвера *SPSS*. *Youden J* индекс је коришћен за одређивање граничних вредности (енгл. *Cut-off*) за сваки тестирани молекул на основу којих су добијене вредности за сензитивност и специфичност потенцијалних маркера. Онлајн алат *SNPstats (Catalan Institute of Oncology, Барселона, Шпанија)* коришћен је за обраду добијених резултата генотипизације методом PCR-RFLP (Solé и сар., 2006).

IV РЕЗУЛТАТИ

1. Основне клиничке карактеристике пацијенткиња укључених у студију

Основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ и пацијенткиња укључених у К групу приказане су у Табели 5. Експериментална група (медијана 66 година) била је значајно старија у односу на К групу (медијана 51 година). Међутим, значајна разлика у експресији тестираних молекула није показана између пацијенткиња са КЕ које су старије или млађе од 60 година. Није показана значајна разлика ($p = 0.340$) у вредности индекса телесне масе (BMI, енгл. *Body mass index*) између пацијенткиња са КЕ (26.28 kg/m^2) и К (25.42 kg/m^2). Додатно, статистички значајна разлика није добијена за учесталост карактеристика као што су статус пушења, животна средина, број трудноћа, број порођаја, присуство дијабетеса, позитивна породична анамнеза и коришћење контрацепције. Међутим, коморбидитети су били учесталији код пацијенткиња са КЕ у односу на К групу ($p = 0.024$).

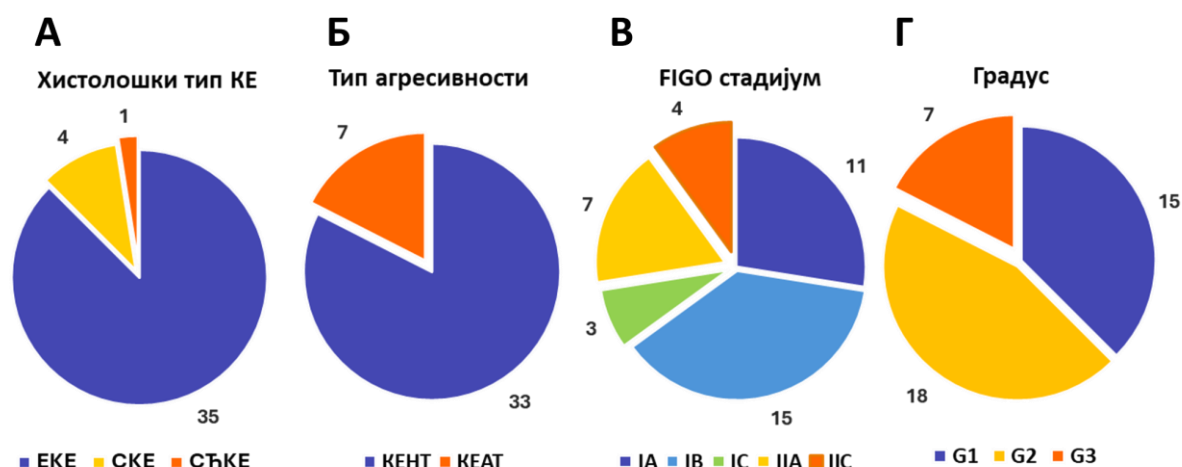
Табела 5. Разлике у клиничким карактеристикама између групе пацијенткиња са КЕ и К.

Карактеристике	КЕ (N = 40)	К (N = 16)	p вредност
Године, медијана (IQR)	66 (12.75)	51 (11.75)	< 0.001*
BMI kg/m^2 , медијана (IQR)	26.28 (7.43)	25.42 (6.42)	0.340
Статус пушења, %			
Пушач	37.5	31.25	0.659
Непушач	62.5	68.75	
Животна средина, %			
Градска	62.5	75	0.372
Сеоска	37.5	25	
Коморбидитети, %			
Без	10	50	0.024*
Само хипертензија	62.5	31.25	
Само дијабетес	7.5	/	
CVD	7.5	12.5	
Хипертензија и дијабетес	7.5	6.25	
CVD и дијабетес	5	/	
Број трудноћа, %			
≤ 1	20	25	0.175
2	35	56.25	
≥ 3	45	18.75	
Број порођаја, %			
≤ 1	30	25	0.673
2	50	62.5	
≥ 3	20	12.5	
Дијабетес, %			
Да	20	12.5	0.508
Не	80	87.5	
Породична анамнеза			
Позитивна	5	6.25	0.851
Негативна	95	93.75	
Коришћена контрацепција			
Да	15	31.25	0.167
Не	85	68.75	

BMI – индекс телесне масе, IQR – интерквартални опсег, CVD – кардиоваскуларне болести. * $p < 0.05$ – статистичка значајност.

2. Патохистолошке карактеристике КЕ

Експресија анализираних молекула тестирана је у односу на патохистолошке карактеристике КЕ (Графикон 5), као што су: агресивност, FIGO стадијум болести и степен диференцираности ћелија (градус). Од 40 узорака КЕ, 33 су имала патологију ниског ризика (не агресиван тип), док је седам било у групи високог ризика (агресиван тип), од чега три са ендометроидном, четири са серозном и један са светло-ћелијском хистологијом. С обзиром на то да ниједан од тестираних узорака КЕ није захватао оваријум, као и то да није имао LVSI, сви не-агресивни типови КЕ са мање од 50% инвазије у миометријум су сврстани у стадијум IA. Од 40 пацијенткиња са КЕ, 11 је дијагностикивано са FIGO стадијумом IA, 15 са стадијумом IB, три са стадијумом IC, седам са стадијумом IIA и четири са стадијумом IIC. Додатно, 15 узорака КЕ је било са градусом G1, 18 узорака са градусом G2 и седам узорака са градусом G3.

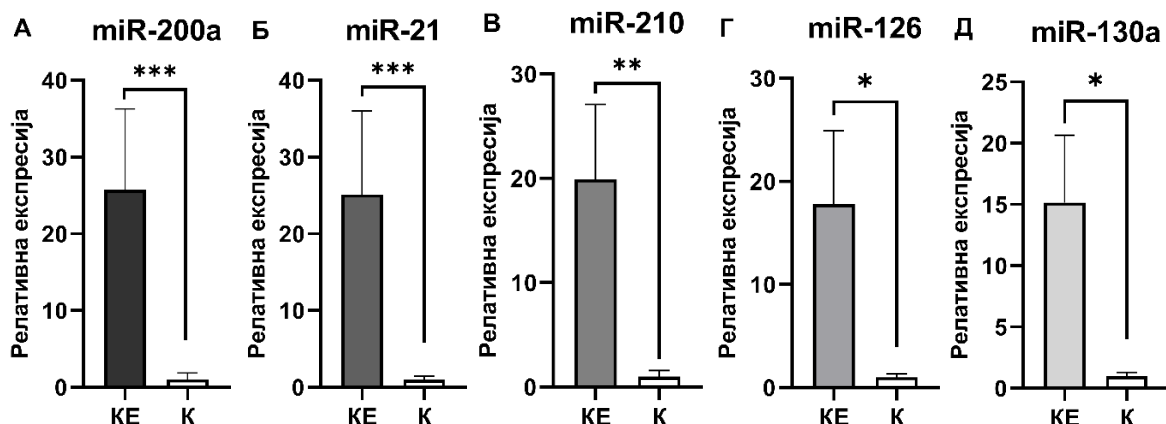


Графикон 5. Број узорака у односу на патохистолошке карактеристике КЕ: А) Хистолошки тип (ЕКЕ – Ендометроидни карцином ендометријума, СКЕ – Серозни карцином ендометријума и СЋКЕ – Светлоћелијски карцином ендометријума), Б) Тип агресивности (КЕНТ – Неагресиван тип карцинома ендометријума и КЕАТ – Агресиван тип карцинома ендометријума), В) FIGO стадијум и Г) Градус (G1 – Низак градус, G2 – умерен градус и G3 - висок градус).

3. Анализа експресије миРНК, иРНК и протеина између узорака КЕ и К

3.1. Експресија молекула миРНК

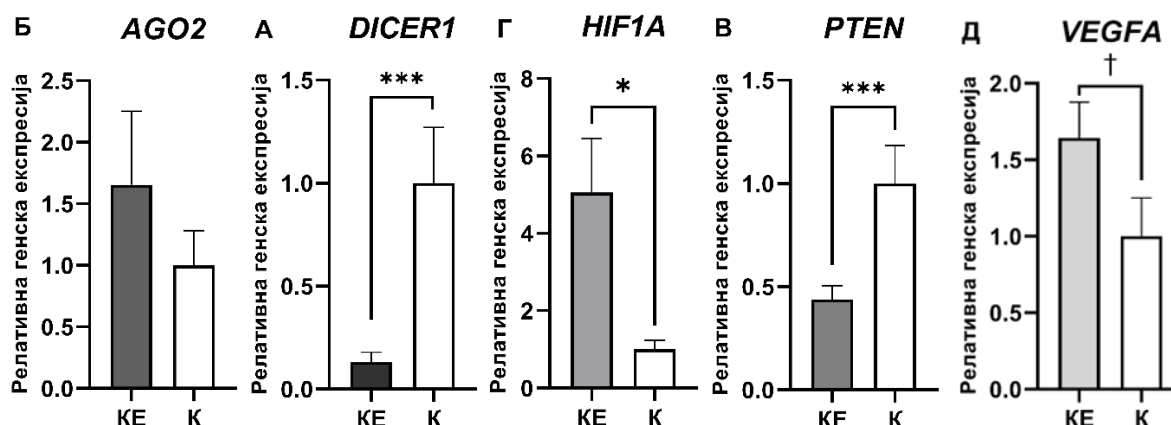
Анализом релативне експресије молекула миРНК (miR-200a-3p, miR-21-5p, miR-210-3p, miR-126-3p и miR-130a-3p) qPCR методом утврђено је да је експресија свих тестираних миРНК била значајно повишена у групи пацијенткиња са КЕ у односу на К (Графикон 2). Најзначајнију разлику у експресији ($p \leq 0,001$) показале су miR-200a и miR-21 (Графикон 2А и 2Б). Експресија молекула miR-200a у експерименталној групи у просеку је била 25.74 ± 10.54 пута већа у односу на К групу, док је miR-21 показала 25.10 ± 10.95 пута повишену експресију (Графикон 2В и 2Г). Такође, значајно вишу експресију у експерименталној групи су показале miR-210 (19.91 ± 7.16) и miR-126 (17.80 ± 7.15) са статистичком значајношћу од $p = 0.004$ и $p = 0.022$. Експресија miR-130a била је 15.16 ± 5.49 пута повишена код пацијенткиња са КЕ са статистичком значајношћу од $p = 0.030$ (Графикон 2Д).



Графикон 2. Разлика у експресији тестираних молекула миРНК: А) miR-200a, Б) miR-21, В) miR-210, Г) miR-126 и Д) miR-130a између узорака карцинома ендометријума (КЕ) и контрола (К). Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. *** статистичка значајност на нивоу $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ и * $p < 0.05$. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

3.2. Експресија молекула иРНК

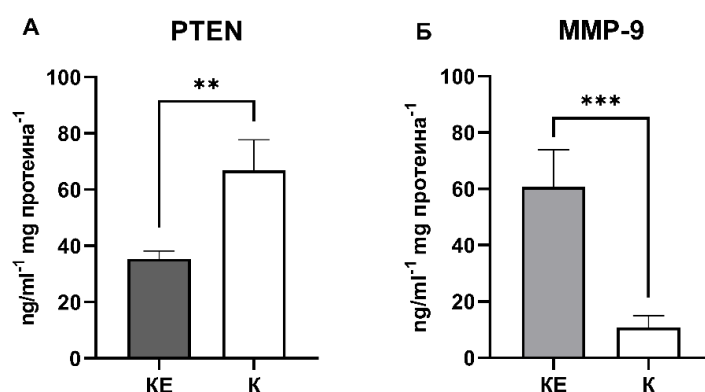
На Графикону 3 представљени су резултати експресије молекула иРНК за гене *DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A* и *VEGFA* у К и узорцима КЕ. Релативна експресија *DICER1* и *AGO2* на транскрипционом нивоу, молекула укључених у процес биогенезе миРНК, приказана је на Графикону 3А и 3Б. Резултати су показали да је експресија гена *DICER1* значајно снижена код КЕ ($p \leq 0.001$), док је експресија *AGO2* гена у просеку повишена, 1.65 ± 0.60 пута, али није достигнута статистичка значајност ($p = 0.730$). Узорци КЕ имају значајно нижу експресију гена *PTEN* ($p \leq 0.001$) у односу на К (Графикон 3В). На Графикону 3Г и 3Д се уочава повишена експресија тестираних гена који су укључени у процес ангиогенезе код КЕ у односу на К. Статистички значајни резултати су евидентни у случају гена *HIF1A* ($p = 0.037$) чија је експресија у просеку била повишена 5.05 ± 1.40 пута, док је експресија *VEGFA* гена била у просеку повишена 1.64 ± 0.18 пута ($p = 0.075$).



Графикон 3. Разлика у експресији иРНК за А) *DICER1*, Б) *AGO2*, В) *PTEN*, В) *HIF1A* и Д) *VEGFA* између узорака карцинома ендометријума (КЕ) и контрола (К). Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. *** $p \leq 0.001$, * $p < 0.05$. † статистички тренд значајности. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

3.3. Концентрација протеина PTEN и MMP-9

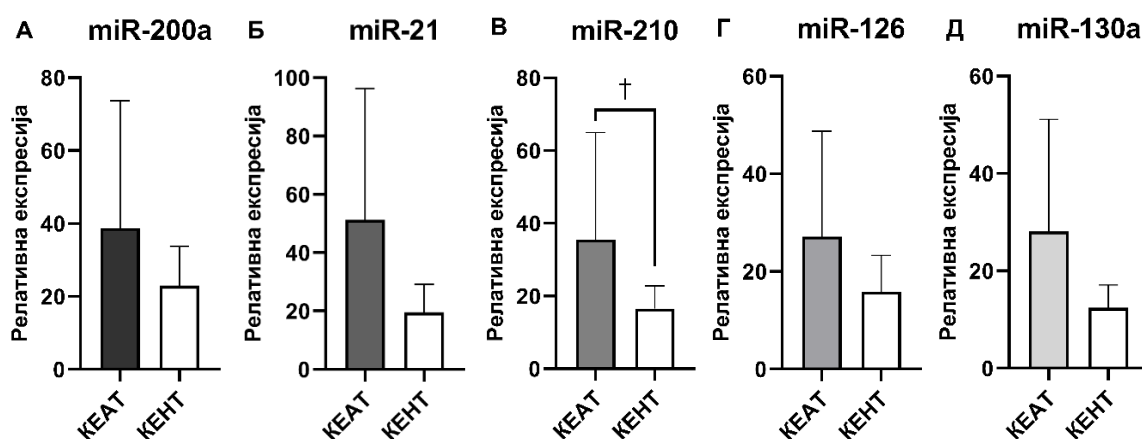
На Графикону 4 су приказане концентрације протеина PTEN и MMP-9 код узорак ткива KE и K, добијене методом сендвич ELISA. Концентрација протеина PTEN (Графикон 4А) код KE износила је 35.40 ± 2.79 ng/ml у 1 mg протеина, што је значајно ниже у односу на K (66.91 ± 10.83 ng/ml у 1 mg протеина) ($p = 0.002$). Узорци KE продуковали су значајно више протеина MMP-9 (60.77 ± 13.13 ng/ml у 1 mg протеина) у поређењу са K ткивима (10.81 ± 4.15 ng/ml у 1 mg протеина), при чему је статистичка значајност износила $p < 0.001$ (Графикон 4Б).



Графикон 4. Поређење концентрација протеина А) PTEN и Б) MMP-9 између узорак карцинома ендометријума (KE) и контрола (K). Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$.

4. Експресија миРНК, иРНК и протеина у односу на патохистолошке карактеристике пацијенткиња са KE

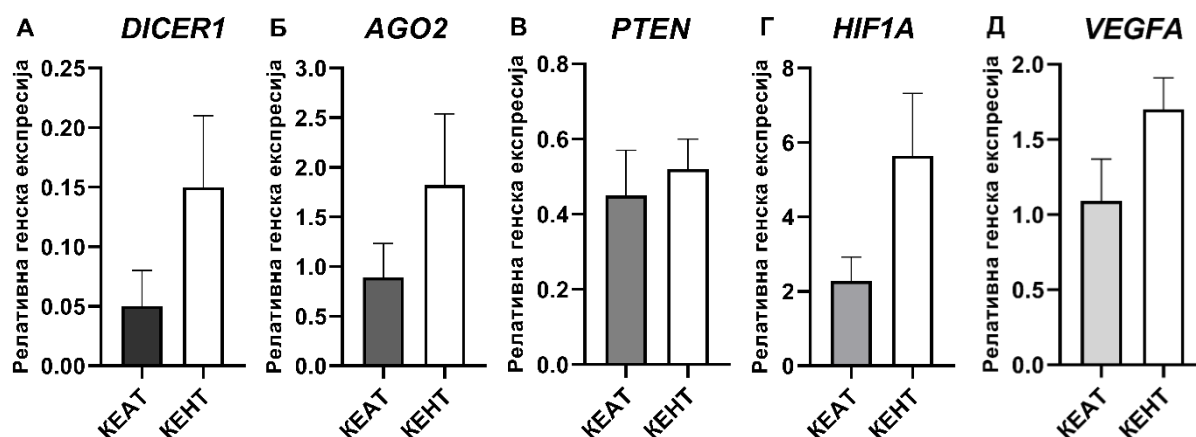
На Графикону 6 приказана је релативна експресија молекула миРНК (miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a) код агресивног типа KE (KEAT; N = 7) у односу на неагресивни тип KE (КЕНТ; N = 33). Сви испитани молекули миРНК имали су у просеку повишену експресију код KEAT у односу на КЕНТ ($p = 0.081$ - 0.728), уз одсуство статистичке значајности. Повишена експресија miR-210 ($p = 0.081$) код KEAT у односу на КЕНТ показала је статистички тренд значајности.



Графикон 6. Разлика у експресији тестираних миРНК молекула: А) miR-200a, Б) miR-21, В) miR-210, Г) miR-126 и Д) miR-130a између агресивног типа KE (KEAT) и неагресивног типа KE (КЕНТ). Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. † статистички тренд значајности. Релативна експресија изражена је

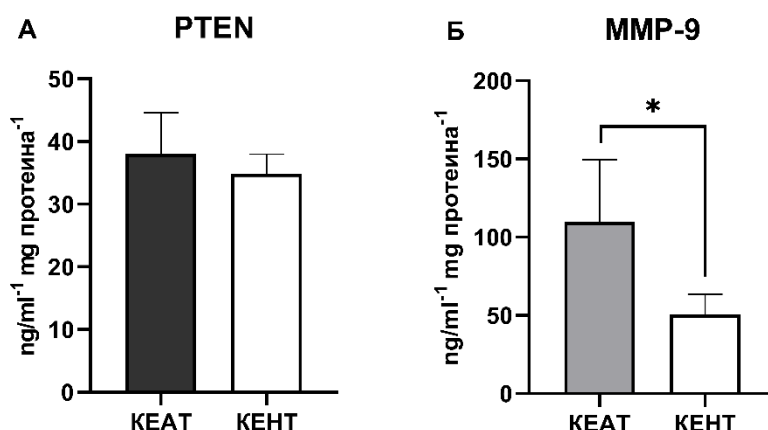
као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

Релативна експресија гена *DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A* и *VEGFA* на транскрипционом нивоу код KEAT у односу на KENT приказана је на Графикону 7. Узорци KEAT су показали нижу експресију тестираних гена у односу на неагресиван тип, при чему ова разлика није статистички значајна (p је у опсегу од 0.102 до 1.000).



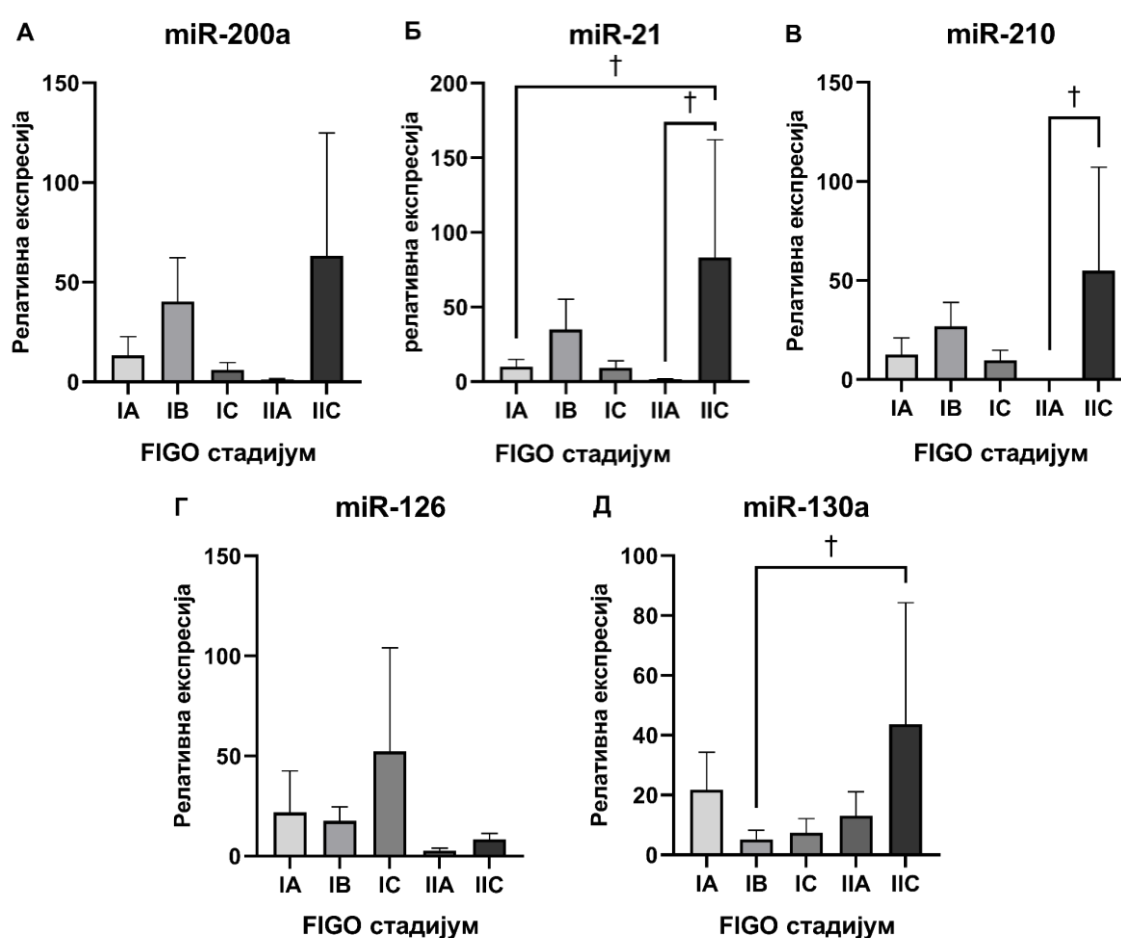
Графикон 7. Релативна експресија иРНК за А) *DICER1*, Б) *AGO2*, В) *PTEN*, Г) *HIF1A* и Д) *VEGFA* код агресивног типа KE (KEAT) у односу на неагресивни тип KE (KENT). Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

Концентрација протеина PTEN и MMP-9 у ткиву KEAT и KENT приказана је на Графикону 8. На основу анализе протеина PTEN, примећује се да је његова експресија приближно једнака код оба типа KE, како агресивног тако и неагресивног ($p = 0.577$). Значајно већу концентрацију протеина MMP-9 продукују узорци KEAT ($p = 0.028$) у односу на узорке KENT (Графикон 7Б).



Графикон 8. Концентрација протеина А) PTEN и Б) MMP-9 у агресивном типу KE (KEAT) и неагресивном типу KE (KENT). Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$.

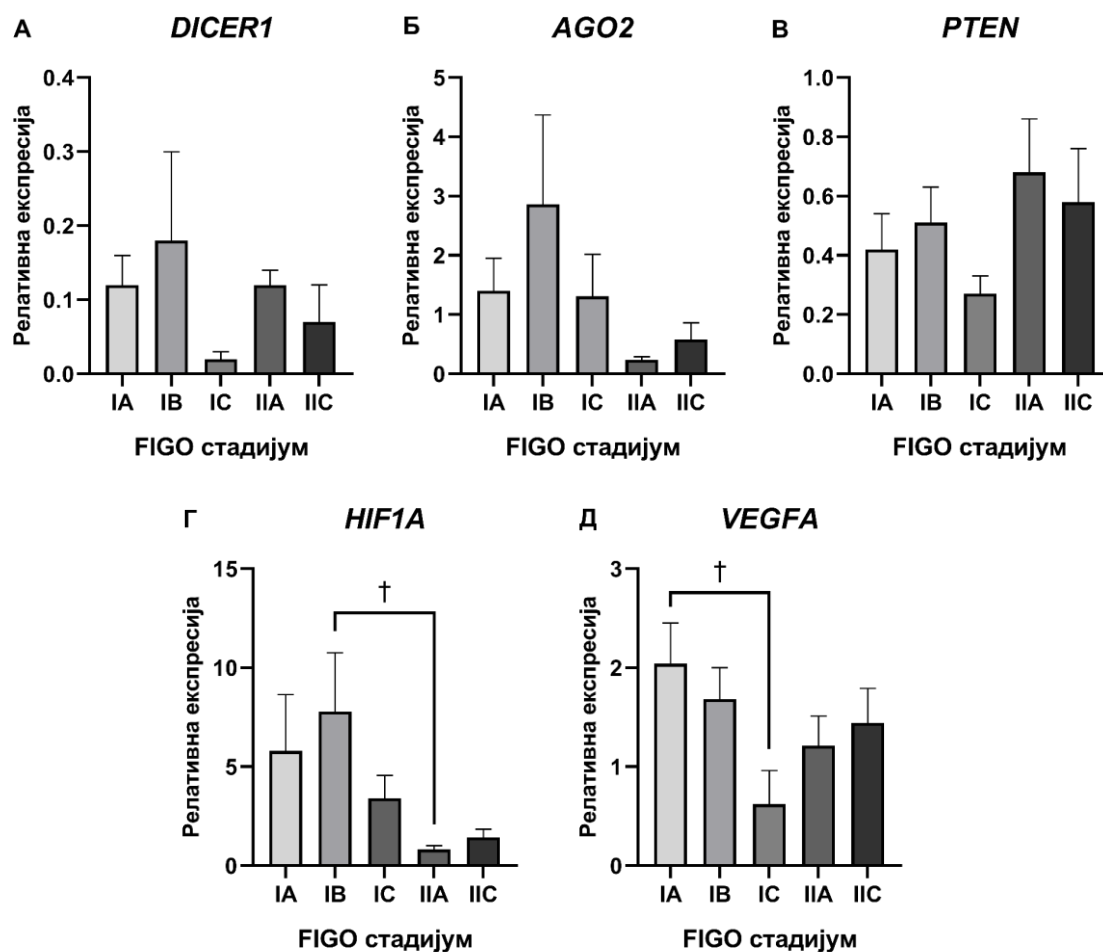
На графикону 9 приказана је експресија молекула миРНК (miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a) у односу на FIGO стадијум КЕ: IA (N=11), IB (N=15), IC (N=3), IIA (N=7) и IIC (N=4). Експресија miR-200a, miR-21, и miR-210 молекула је била највиша у ткиву КЕ са стадијумом IIC и IB, док су најнижу експресију имали узорци са стадијумом IIA (Графикон 9А, 9Б и 9В). Примећен је статистички тренд у повећању експресије miR-21 код узорака са стадијумом IIC у поређењу са стадијумима IA и IIA ($p = 0.077$ и $p = 0.067$, редом), док је статистички тренд значајности разлика у експресији miR-210 примећен само између стадијума IIC и IIA ($p = 0.062$). Експресија молекула miR-126 била је највиша у стадијуму IC, док је најнижа у стадијуму IIA (Графикон 9Г). На Графикону 9Д се примећује статистички тренд у повећању експресије молекула miR-130a између стадијума IIC и IB ($p = 0.055$). Резултати испитивања разлике у експресији тестираних молекула миРНК између FIGO стадијума болести нису показали статистичку значајност (опсег p вредности: 0.164-0.660).



Графикон 9. Релативна експресија молекула миРНК: А) miR-200a, Б) miR-21, В) miR-210, Г) miR-126 и Д) miR-130a у односу на FIGO стадијум КЕ. Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. † статистички тренд значајности. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

Релативна експресија гена *DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A* и *VEGFA* између различитих FIGO стадијума болести приказана је на Графикону 9. КЕ у стадијуму IC су показали најнижу експресију *DICER1* гена у односу на остале стадијуме (Графикон 10А). Карциноми у стадијуму IB су имали највишу експресију *AGO2* гена, док су најнижу

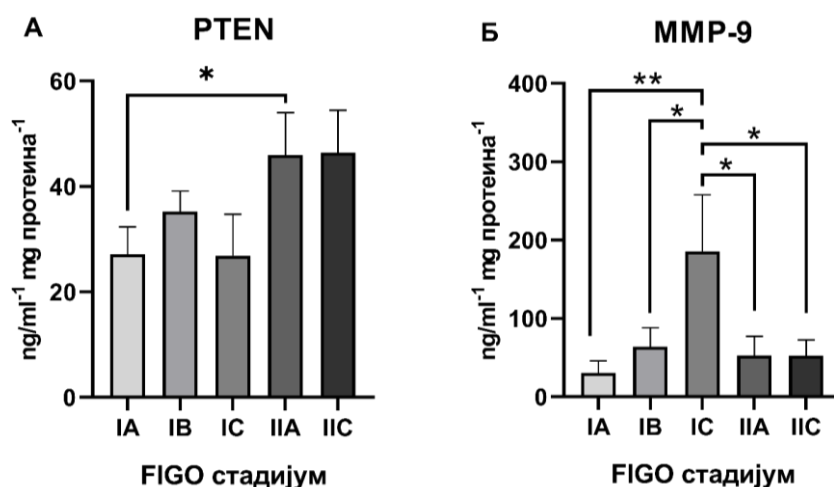
експресију имали они у ПА и ПС (Графикон 10Б). На Графикону 10В може се приметити пораст у експресији гена *PTEN* са напредовањем КЕ до ІВ стадијума, осим код стадијума ІС у ком је имао најнижу експресију. Рани стадијуми КЕ (ІА и ІВ) су показали више вредности експресије гена *HIF1A* у односу на касне стадијуме (Графикон 10Г), при чему је добијен статистички тренд значајности разлика у експресији овог гена између стадијума ІВ и ІА ($p = 0.096$). Додатно, на Графикону 10Д се примећује смањење у експресији гена *VEGFA* са прогресијом болести до стадијума ІС, након чега се примећује пораст у експресији гена *VEGFA* у стадијумима ІА и ІС. Статистички тренд значајности разлика у експресији гена *VEGFA* добијен је поређењем стадијума ІА и ІС ($p = 0.066$).



Графикон 10. Релативна експресија иРНК за А) *DICER1*, Б) *AGO2*, В) *PTEN*, Г) *HIF1A* и Д) *VEGFA* у односу на FIGO стадијум КЕ. Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. † статистички тренд значајности. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

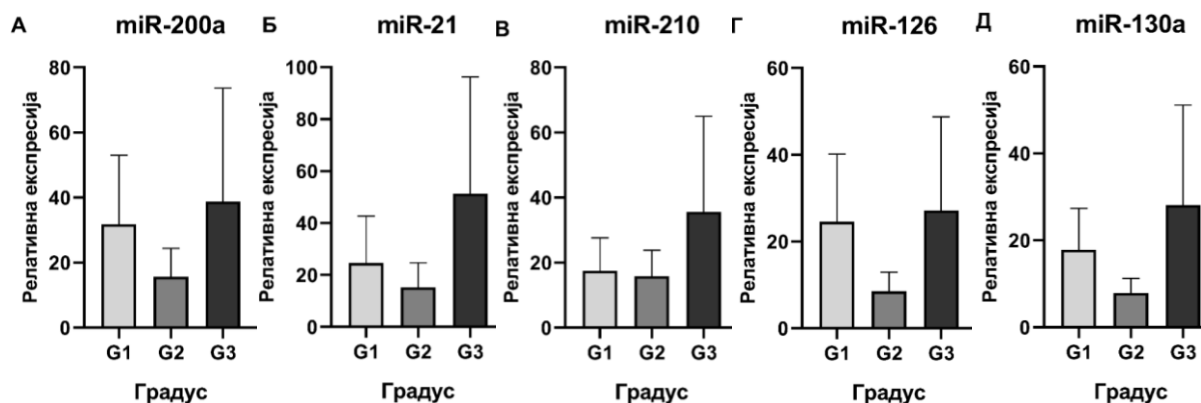
Концентрације протеина PTEN и MMP-9 између различитих стадијума КЕ приказана је на Графикону 11. Карциноми у стадијуму ІА (45.95 ± 8.07 ng/ml у 1 mg протеина) показали су значајно више концентрације протеина PTEN ($p = 0.027$) у односу на стадијум ІВ (27.15 ± 5.15 ng/ml у 1 mg протеина). Иако је тренд сличан за концентрације протеина PTEN између узорка у стадијуму ІС и ІА, није установљена значајна разлика ($p = 0.058$), могуће због малог броја узорка у стадијуму ІС ($N = 4$). На Графикону 11Б може се приметити значајно већа концентрација протеина MMP-9 код КЕ са стадијумом ІС (185.78 ± 71.95 ng/ml у 1 mg протеина) у односу на стадијуме ІА (30.52 ± 15.44 ng/ml у 1

mg протеина, $p = 0,004$), IB (63.87 ± 24.29 ng/ml у 1 mg протеина, $p = 0,018$), IIA ($52.80 \pm 24,50$ ng/ml у 1 mg протеина, $p = 0.018$) и IIC (52.52 ± 20.12 ng/ml у 1 mg протеина, $p = 0.031$).



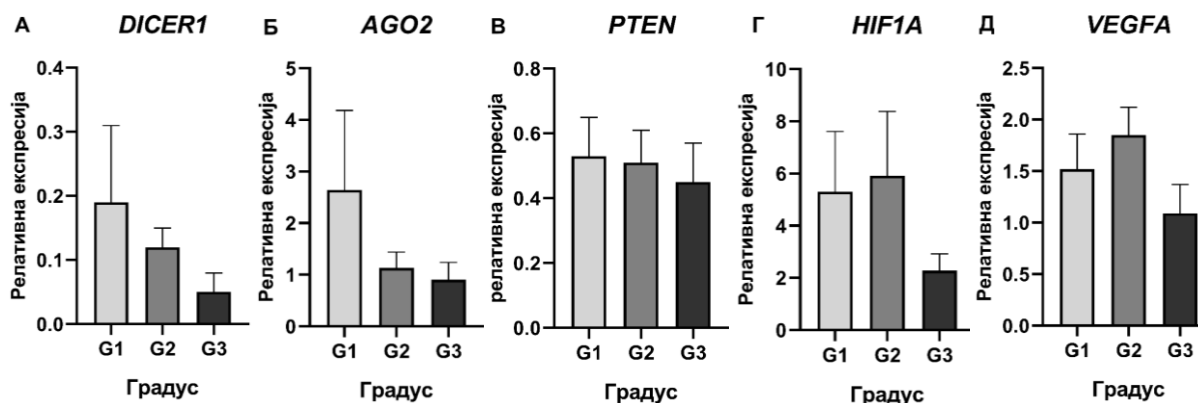
Графикон 11. Концентрација протеина А) PTEN и Б) MMP-9 у односу на FIGO стадијум КЕ. Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. ** $p \leq 0.01$, * $p < 0.05$.

На Графикону 12 приказана је експресија молекула miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a у односу на градус КЕ. Експресија тестираних молекула миРНК била је највиша код КЕ са високим градусом (G3) у поређењу са умереним (G2) и ниском градусом (G1). Међутим, статистичка значајна разлика у експресији молекула миРНК између градуса КЕ није утврђена (p вредност у опсегу од 0.157 до 0.741).



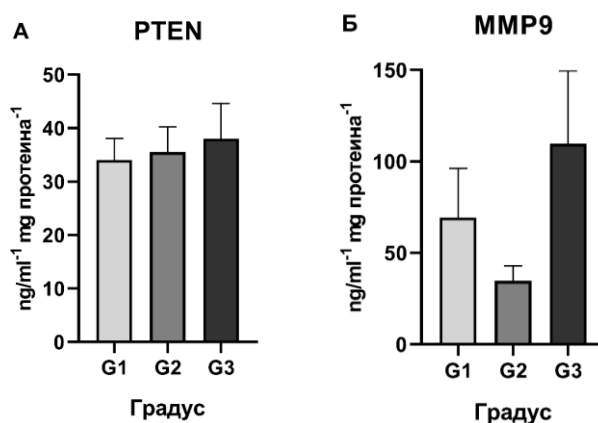
Графикон 12. Релативна експресија молекула миРНК: А) miR-200a, Б) miR-21, В) miR-210, Г) miR-126 и Д) miR-130a у односу на градус КЕ. Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

Експресија молекула иРНК за гене *DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A* и *VEGFA* између различитих градуса КЕ је приказана на Графикону 13. Експресија гена *DICER1*, *AGO2* и *PTEN* показала је тренд снижења са повећањем градуса ($p = 0.174$, $p = 0.785$ и $p = 0.992$, редом). Експресија гена *HIF1A* и *VEGFA* била је приближно једнака код КЕ у градусу 1 и 2, док су карциноми градуса 3 имали нешто нижу експресију, при чему ова разлика није била значајна ($p = 0.908$ и $p = 0.322$, редом).



Графикон 13. Релативна експресија иРНК А) *DICER1*, Б) *AGO2*, В) *PTEN*, Г) *HIF1A* и Д) *VEGFA* у односу на градус КЕ. Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta C_t}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

На Графикону 14 су приказане концентрације протеина PTEN и MMP-9 у односу на градус КЕ. Концентрације протеина PTEN су расле са порастом градуса, при чему није добијена статистички значајност ($p = 0.805$). Додатно, највеће концентрације протеина MMP-9 показала су ткива карцинома са градусом G3, док су најниже концентрације имали карциноми са умерено диференцираним ћелијама ($p = 0.166$).



Графикон 14. Концентрација протеина А) PTEN и Б) MMP-9 у односу на градус КЕ. Вредности на графикону су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна грешка.

5. Експресија миРНК, иРНК и протеина у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ

5.1. Експресија миРНК у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ

Експресија молекула миРНК у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ приказана је у Табели 6. Пацијенткиње са $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ показале су значајно вишу експресију молекула miR-200a у односу на оне са телесном масом мањом од 25 kg/m^2 ($p = 0.028$). Поред тога, статистички тренд повишене експресије miR-21 и miR-210 ($p = 0.083$ и $p = 0.053$, редом) примећен је такође код пацијенткиња са $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$. За разлику од тога, пацијенткиње са $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ имале су нижу експресију miR-126 и miR-130a, у односу на оне са нижим BMI ($p = 0.088$ и $p = 0.069$, редом). Пушачи

су имали значајно вишу експресију молекула miR-126 код КЕ у односу на непушаче ($p = 0.013$). Тестирани миРНК молекули нису показали статистички значајну промену у експресији у односу на остале клиничке карактеристике, као што су старост, тип животне средине, коришћење контрацепције, број трудноћа, број порођаја и присуство дијабетеса.

Табела 6. Релативна експресија тестираних миРНК молекула у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ.

Клиничке карактеристике	N	miR-200a	miR-21	miR-210	miR-126	miR-130a
Година старости						
≥ 60	29	22.64±11.74	19.84±10.78	15.27±6.56	10.47±3.88	10.65±5.01
< 60	11	33.91±23.42	38.98±28.55	32.13±19.74	37.12±23.70	27.05±14.93
p вредност		0.765	0.241	0.765	0.550	0.229
BMI kg/m²						
≥ 25	25	29.74±16.02	32.53±17.25	21.08±10.44	7.82±3.63	12.06±6.76
< 25	15	19.07±9.35	12.73±4.75	17.95±8.32	34.83±17.61	20.34±9.52
p вредност		0.028*	0.083 [†]	0.053 [†]	0.088 [†]	0.069 [†]
Статус пушења						
Пушач	15	38.19±21.86	28.85±18.08	25.65±11.39	41.17±17.68	8.70±3.87
Непушач	25	18.27±10.74	22.86±14.02	16.46±9.91	3.78±1.23	19.03±8.46
p вредност		0.740	0.740	0.543	0.013*	0.804
Животна средина						
Градска	25	28.41±17.62	37.22±22.92	26.94±15.09	15.43±10.21	19.87±11.05
Сеоска	15	24.14±13.41	17.83±11.04	15.69±7.19	19.22±9.80	12.34±5.90
p вредност		0.581	0.305	0.173	0.761	0.562
Контрацепција						
Да	6	19.14±17.92	10.57±9.06	16.84±16.37	14.43±11.55	15.15±9.18
Не	34	26.90±12.07	27.67±12.77	20.45±8.01	18.40±8.21	15.16±6.30
p вредност		0.754	0.926	0.517	0.926	0.985
Број трудноћа						
< 2	8	33.37±30.70	42.94±39.64	27.86±26.25	4.89±2.29	30.31±20.23
2	14	3.90±1.43	3.44±1.21	4.36±2.00	6.25±3.16	5.76±2.81
>2	18	39.33±18.94	34.03±16.98	28.46±10.77	32.52±15.17	15.74±8.01
p вредност		0.411	0.548	0.100	0.960	0.636
Број порођаја						
< 2	12	58.32±31.54	56.58±32.80	39.09±20.34	19.51±8.19	24.21±13.77
2	20	3.45±1.02	4.62±1.48	5.13±2.11	11.30±7.88	12.11±7.00
>2	8	32.58±18.21	29.11±20.58	28.09±16.04	31.49±28.29	9.21±5.96
p вредност		0.195	0.483	0.175	0.219	0.383
Дијабетес						
Позитиван	8	16.17±13.26	11.88±6.93	18.53±12.16	11.16±8.68	9.07±6.21
Негативан	32	28.13±12.80	28.41±13.57	20.25±8.50	19.46±8.70	16.68±6.70
p вредност		0.960	0.855	0.561	0.584	0.908

BMI – индекс телесне масе. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна грешка.

* $p < 0.05$. [†] статистички тренд значајности. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta Ct}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

5.2. Експресија молекула иРНК у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ

Разлика у експресији гена *DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A* и *VEGFA* између група пацијенткиња формираних на основу вредности различитих клиничких параметара приказана је у Табели 7. Пацијенткиње са КЕ које су имале два порођаја показале су значајано вишу експресију гена *PTEN* у односу на оне са мање и више од две трудноће ($p = 0.020$). Поред тога, примећен је статистички тренд у повећању експресије гена *DICER1* ($p = 0.067$) и *HIF1A* ($p = 0.074$) са порастом броја трудноћа. За остале карактеристике, попут година старости, ВМI-а, пушачког статуса, типа животне средине, коришћења контрацепције, броја порођаја и дијагнозе дијабетеса, нису показане значајне разлике у експресији тестираних гена између група пацијенткиња са КЕ.

Табела 7. Релативна експресија тестираних иРНК молекула у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ.

Клиничке карактеристике	N	<i>DICER1</i>	<i>AGO2</i>	<i>PTEN</i>	<i>HIF1A</i>	<i>VEGFA</i>
Година старости						
≥ 60	29	0.09±0.02	1.21±0.32	0.42±0.09	5.36±1.70	1.57±0.21
< 60	11	0.24±0.16	2.82±2.03	0.46±0.11	4.24±2.55	1.85±0.65
p вредност		0.720	0.308	0.402	0.570	0.835
ВМI kg/m²						
≥ 25	25	0.15±0.07	1.86±0.92	0.37±0.06	4.39±1.79	1.45±0.22
< 25	15	0.11±0.03	1.30±0.44	0.54±0.14	6.17±2.31	1.97±0.50
p вредност		0.455	0.934	0.439	0.581	0.562
Статус пушења						
Пушач	15	0.22±0.12	2.49±1.46	0.51±0.08	5.54±2.30	1.44±0.29
Непушач	25	0.08±0.01	1.15±0.39	0.50±0.95	4.77±1.81	1.68±0.24
p вредност		0.406	0.391	0.507	0.255	0.533
Животна средина						
Градска	25	0.16±0.07	1.87±0.93	0.49±0.07	4.03±1.44	1.54±0.25
Сеоска	15	0.09±0.02	1.30±0.41	0.53±0.13	6.76±2.89	1.69±0.25
p вредност		0.912	0.280	0.934	0.825	0.562
Контрацепција						
Да	6	0.14±0.05	0.72±0.53	0.53±0.15	3.97±3.14	1.08±0.26
Не	34	0.10±0.03	1.82±0.69	0.50±0.07	5.25±1.57	1.69±0.21
p вредност		0.671	0.197	0.618	0.470	0.306
Број трудноћа						
< 2	8	0.06±0.02	0.44±0.14	0.32±0.10	2.01±0.92	1.25±0.41
2	14	0.14±0.03	1.09±0.36	0.79±0.13	2.50±1.26	1.45±0.27
>2	18	0.16±0.10	2.63±1.27	0.37±0.06	8.39±2.78	1.85±0.30
p вредност		0.067 [†]	0.347	0.020*	0.074 [†]	0.429
Број порођаја						
< 2	12	0.07±0.02	0.81±0.26	0.43±0.14	5.95±2.90	1.51±0.31
2	20	0.19±0.09	2.19±1.13	0.59±0.10	4.06±1.60	1.59±0.26
>2	8	0.06±0.02	1.60±0.94	0.39±0.10	6.19±4.12	1.74±0.47
p вредност		0.453	0.952	0.341	0.965	0.916
Дијабетес						
Позитиван	8	0.07±0.02	2.16±1.03	0.39±0.10	7.76±3.85	1.63±0.22
Негативан	32	0.15±0.06	1.53±0.71	0.53±0.08	4.42±1.48	1.47±0.25
p вредност		0.475	0.855	0.607	0.584	0.908

ВМI – индекс телесне масе. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна грешка.
 * $p < 0.05$. [†] статистички тренд значајности. Релативна експресија изражена је као $2^{-\Delta\Delta Ct}$, при чему је просечна вредност за контролну групу имала јединичну вредност релативне експресије.

5.3. Концентрација протеина PTEN и MMP-9 у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ

У оквиру Табеле 8 приказане су вредности концентрације PTEN и MMP-9 у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ. Између група пацијенткиња формираних на основу клиничких карактеристика није показана значајна разлика у концентрацији протеина PTEN и MMP-9.

Табела 8. Концентрација протеина PTEN и MMP-9 у односу на основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ.

Клиничке карактеристике	N	PTEN	MMP-9
Година старости			
≥ 60	29	34.18±3.30	62.03±20.05
< 60	11	38.61±5.38	60.29±16.64
p вредност		0.385	0.511
BMI kg/m²			
≥ 25	25	34.04±3.58	64.30±15.83
< 25	15	37.65±4.54	58.65±18.98
p вредност		0.391	0.192
Статус пушења			
Пушач	15	32.67±4.35	71.76±19.93
Непушач	25	37.03±3.66	54.18±17.45
p вредност		0.457	0.305
Животна средина			
Градска	25	32.52±3.15	61.44±18.21
Сеоска	15	40.19±5.18	59.66±18.27
p вредност		0.187	0.319
Контрацепција			
Да	6	34.91±3.19	64.48±15.20
Не	34	38.13±4.83	39.73±15.05
p вредност		0.557	0.839
Број трудноћа			
< 2	8	33.07±5.61	49.53±19.94
2	14	40.63±5.68	75.94±28.83
>2	18	32.36±3.58	53.97±17.19
p вредност		0.396	0.853
Број порођаја			
< 2	12	34.45±4.22	46.68±13.77
2	20	36.61±4.53	79.13±23.33
>2	8	29.28±5.41	36.01±20.30
p вредност		0.556	0.452
Дијабетес			
Позитиван	8	40.59±5.71	68.18±15.98
Негативан	32	34.10±3.18	31.14±11.08
p вредност		0.279	0.454

BMI – индекс телесне масе. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна грешка.

6. Анализа корелације експресије анализираних молекула

У овом сегменту, тестирали смо корелацију експресије молекула миРНК међусобно, као и корелацију са нивоима експресије анализираних иРНК и протеина код пацијенткиња са КЕ. Поред тога испитана је и међусобна корелације нивоа експресије иРНК и протеина. Додатно је истражена и корелација нивоа експресије анализираних молекула са вредностима патолошких и клиничких карактеристика пацијенткиња са КЕ.

6.1. Међусобна корелација нивоа експресије молекула миРНК и корелација са нивоима експресије иРНК и протеина

Међу анализираним молекулима миРНК (miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a) показана је статистички значајна позитивна корелација нивоа експресије код пацијенткиња са КЕ (Табела 9). Нивои експресије miR-200a, miR-21 и miR-210 су међусобно показали јаку позитивну корелацију, са вредношћу коефицијента корелације у опсегу од 0.81 до 0.84, док је за miR-200a и miR-210 показана веома јака корелација експресије ($r = 0.92$). Умерена корелација је добијена између нивоа експресије miR-126 и осталих молекула миРНК ($r = 0.50$ - 0.59). Ниво експресије miR-130a је у јакој корелацији са експресијом miR-21 ($r = 0.71$), док је слаба корелација добијена у поређењу са осталим молекулима миРНК ($r = 0.42$ - 0.50). Ниво генске експресије *DICER1* и *PTEN* је у слабој негативна корелацији са експресијом miR-200a, miR-21 и miR-210 ($r = 0.35$ - 0.42), осим што је у случају гена *DICER1* и miR-210 показана умерена корелација ($r = 0.53$). Експресија гена *AGO2* је у слабој позитивној корелацији са експресијом молекула miR-200a и miR-210 ($r = 0.44$ и $r = 0.42$).

Табела 9. Коефицијенти корелације између нивоа експресије миРНК, молекула иРНК и протеина код пацијенткиња са КЕ.

		miR-200a	miR-21	miR-210	miR-126	miR-130a
miR-200a	r	1.00	0.81**	0.92**	0.54**	0.44**
	p	.	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	0.005
miR-21	r	0.81**	1.00	0.84**	0.59**	0.71**
	p	≤ 0.001	.	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
miR-210	r	0.92**	0.84**	1.00	0.57**	0.42**
	p	≤ 0.001	≤ 0.001	.	≤ 0.001	0.007
miR-126	r	0.54**	0.59**	0.57**	1.00	0.50**
	p	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	.	≤ 0.001
miR-130a	r	0.44**	0.71**	0.42**	0.50**	1.00
	p	0.005	≤ 0.001	0.007	≤ 0.001	.
<i>DICER1</i>	r	-0.42**	-0.41**	-0.53**	0.07	-0.20
	p	0.006	0.009	≤ 0.001	0.69	0.22
<i>AGO2</i>	r	0.32*	0.24	0.35*	0.30†	0.14
	p	0.044	0.12	0.025	0.06	0.40
<i>PTEN</i>	r	-0.42**	-0.35*	-0.42**	0.11	-0.21
	p	0.007	0.026	0.007	0.48	0.20
<i>HIF1A</i>	r	0.41**	0.36*	0.49**	0.24	0.20
	p	0.008	0.022	≤ 0.001	0.13	0.22
<i>VEGFA</i>	r	0.09	-0.01	-0.02	-0.03	0.05
	p	0.59	0.96	0.91	0.84	0.76
<i>PTEN</i>	r	-0.04	-0.02	-0.02	0.20	-0.05
	p	0.78	0.88	0.92	0.22	0.76
<i>MMP-9</i>	r	0.28†	0.31*	0.39*	0.31*	0.09
	p	0.083	0.047	0.012	0.048	0.58

r - коефицијент корелације. ** корелација значајна на нивоу $p \leq 0.01$. * корелација значајна на нивоу $p \leq 0.05$. † статистички тренд значајности.

Поред наведеног, експресија гена *HIF1A* је у слабој позитивној корелацији са експресијом miR-200a ($r = 0.41$), miR-21 ($r = 0.36$) и miR-210 ($r = 0.49$). Концентрације протеина MMP-9 су у слабој позитивној корелацији са нивоом експресије miR-21 ($r = 0.31$), miR-210 ($r = 0.39$) и miR-126 ($r = 0.31$). Статистички тренд значајности може се приметити у Табели 9 за позитивну корелацију између нивоа експресије miR-126 и гена *AGO2* ($p = 0.06$), као и између нивоа експресије молекула miR-200a и концентрације протеина MMP-9 ($p = 0.08$).

6.2. Корелација нивоа експресије молекула иРНК и протеина

Међусобна корелација нивоа експресије анализираних гена и протеина код пацијенткиња са КЕ приказана је у Табели 10. Ниво експресије гена *DICER1* је у јакој позитивној корелацији са експресијом гена *PTEN* ($r = 0.73$), док је у поређењу са експресијом *HIF1A* показала слабу негативну корелацију ($r = -0.42$). Експресија гена *AGO2* била је у јакој позитивној корелацији са експресијом гена *HIF1A* ($r = 0.72$) и слабој позитивној корелацији са експресијом гена *VEGFA* ($r = 0.33$). Додатно, експресија иРНК за *PTEN* је у слабој негативној корелацији са експресијом *HIF1A* ($r = 0.46$), при чему је примећен и статистички тренд корелације са експресијом гена *AGO2* и концентрацијом протеина PTEN. Експресија *HIF1A* је у слабој позитивној корелацији са експресијом гена *VEGFA* ($r = 0.36$). Концентрација протеина MMP-9 није показала статистички значајну корелацију са експресијом анализираних гена и протеина.

Табела 10. Међусобна корелација нивоа експресије анализираних иРНК и протеина код пацијенткиња са КЕ.

		<i>DICER1</i>	<i>AGO2</i>	<i>PTEN</i>	<i>HIF1A</i>	<i>VEGFA</i>	<i>PTEN</i>	MMP-9
<i>DICER1</i>	r	1.00	- 0.06	0.73**	- 0.42**	0.03	0.17	- 0.01
	p	.	0.72	≤ 0.001	0.007	0.85	0.29	0.98
<i>AGO2</i>	r	- 0.06	1.00	- 0.29†	0.72**	0.33*	- 0.14	- 0.16
	p	0.72	.	0.07	≤ 0.001	0.035	0.39	0.34
<i>PTEN</i>	r	0.73**	- 0.29†	1.00	- 0.46**	- 0.24	0.28†	0.22
	p	≤ 0.001	0.07	.	0.003	0.14	0.07	0.17
<i>HIF1A</i>	r	- 0.42**	0.72**	- 0.46**	1.00	0.36*	- 0.19	- 0.20
	p	0.007	≤ 0.001	0.003	.	0.022	0.25	0.21
<i>VEGFA</i>	r	0.03	0.33*	- 0.24	0.36*	1.00	- 0.07	- 0.25
	p	0.85	0.035	0.14	0.022	.	0.66	0.12
<i>PTEN</i>	r	0.17	- 0.14	0.28†	- 0.19	- 0.07	1.00	0.07
	p	0.29	0.39	0.07	0.25	0.66	.	0.68
<i>MMP-9</i>	r	- 0.08	-0.03	0.12	- 0.10	- 0.19	0.05	1.00
	p	0.632	0.84	0.48	0.54	0.23	0.74	.

r - коефицијент корелације. ** корелација значајна на нивоу $p \leq 0.01$. * корелација значајна на нивоу $p \leq 0.05$. † статистички тренд значајности.

6.3. Корелација између нивоа експресије анализираних молекула и вредности патохистолошких и основних клиничких карактеристика

Испитивање корелације нивоа експресије анализираних молекула у односу на вредности патохистолошких и основних клиничких карактеристика пацијенткиња са КЕ приказана је у оквиру Табеле 11. Ниво експресије miR-200a у слабој је негативној корелацији ($r = 0.37$) са BMI пацијенткиња са КЕ, док је коефицијент корелације за miR-210 био у домену статистичког тренда ($p = 0.06$). Експресија гена *AGO2* је у слабој позитивној корелацији са бројем трудноћа ($r = 0.31$) и порођаја пацијенткиња ($r = 0.34$). Концентрације протеина PTEN биле су у позитивној корелацији са FIGO стадијумом, међутим овај резултат је био у домену статистичког тренда ($p = 0.052$). Концентрације протеина MMP-9 су у слабој позитивној корелацији са типом агресивности КЕ ($p = 0.027$) и FIGO стадијумом ($r = 0.31$).

Табела 11. Коефицијент корелације експресије миРНК, иРНК и протеина у односу на патохистолошке и основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ.

		Тип	FIGO стадијум	Градус	BMI	Број трудноћа	Број порођаја
miR-200a	r	0.06	-0.03	- 0.06	- 0.37*	0.13	0.18
	p	0.73	0.86	0.72	0.020	0.44	0.27
miR-21	r	0.19	0.09	0.05	- 0.20	-0.01	0.02
	p	0.25	0.59	0.76	0.21	0.94	0.89
miR-210	r	0.28	0.11	0.11	- 0.30 [†]	0.04	0.12
	p	0.08	0.48	0.48	0.06	0.80	0.44
miR-126	r	0.17	0.18	0.10	- 0.13	0.19	0.25
	p	0.28	0.28	0.54	0.44	0.25	0.11
miR-130a	r	0.11	- 0.09	0.12	- 0.26	0.14	0.19
	p	0.52	0.57	0.46	0.10	0.40	0.25
DICER1	r	- 0.27	- 0.02	-0.09	0.04	0.25	0.22
	p	0.10	0.91	0.58	0.82	0.12	0.18
AGO2	r	<0.01	- 0.22	0.08	0.13	0.31*	0.34*
	p	0.99	0.17	0.62	0.42	0.049	0.034
PTEN	r	- 0.01	0.20	- 0.02	0.04	0.06	0.10
	p	0.96	0.20	0.91	0.81	0.69	0.55
HIF1A	r	0.07	- 0.15	0.06	0.02	- 0.05	0.10
	p	0.69	0.38	0.69	0.92	0.75	0.53
VEGFA	r	- 0.17	- 0.20	0.01	0.01	0.11	0.03
	p	0.28	0.21	0.97	0.97	0.51	0.84
PTEN	r	0.09	0.35*	0.04	- 0.05	- 0.01	- 0.12
	p	0.56	0.025	0.84	0.74	0.96	0.45
MMP-9	r	0.35*	0.31 [†]	0.25	- 0.25	- 0.14	- 0.05
	p	0.027	0.051	0.11	0.12	0.41	0.77

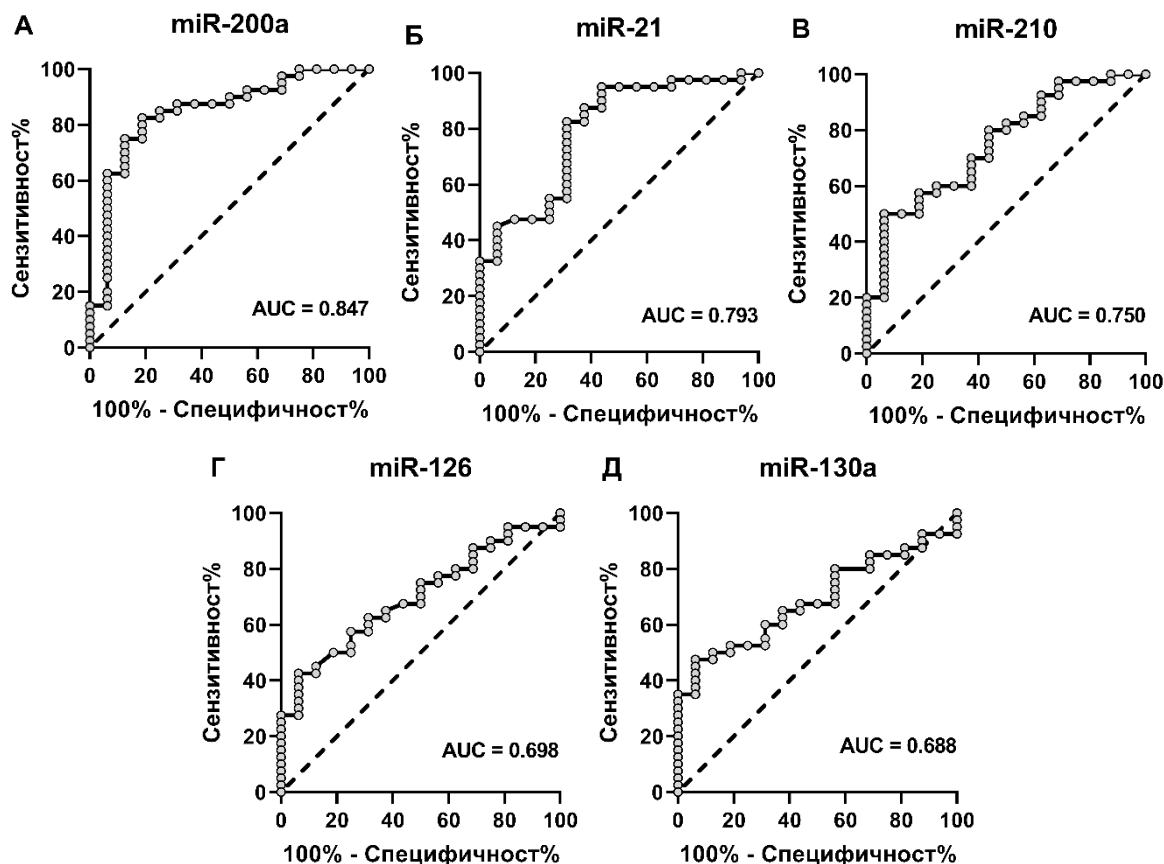
FIGO - Међународна федерација гинекологије и акушерства. BMI – индекс телесне масе. r – коефицијент корелације. * Корелација значајна на нивоу $p \leq 0.05$. [†] статистички тренд значајности.

7. Дијагностички потенцијал анализираних молекула

ROC криве су конструисане како би се одредио дијагностички потенцијал сваког тестираног потенцијалног маркера, односно потенцијал за разликовање узорака КЕ и К. Тестирани потенцијални маркери показали су вредности AUC у опсегу од 0.470 до 0.937 са сензитивношћу у распону од 42.5 до 90% и специфичношћу од 68.7 до 100%.

7.1. Дијагностички потенцијал молекула миРНК

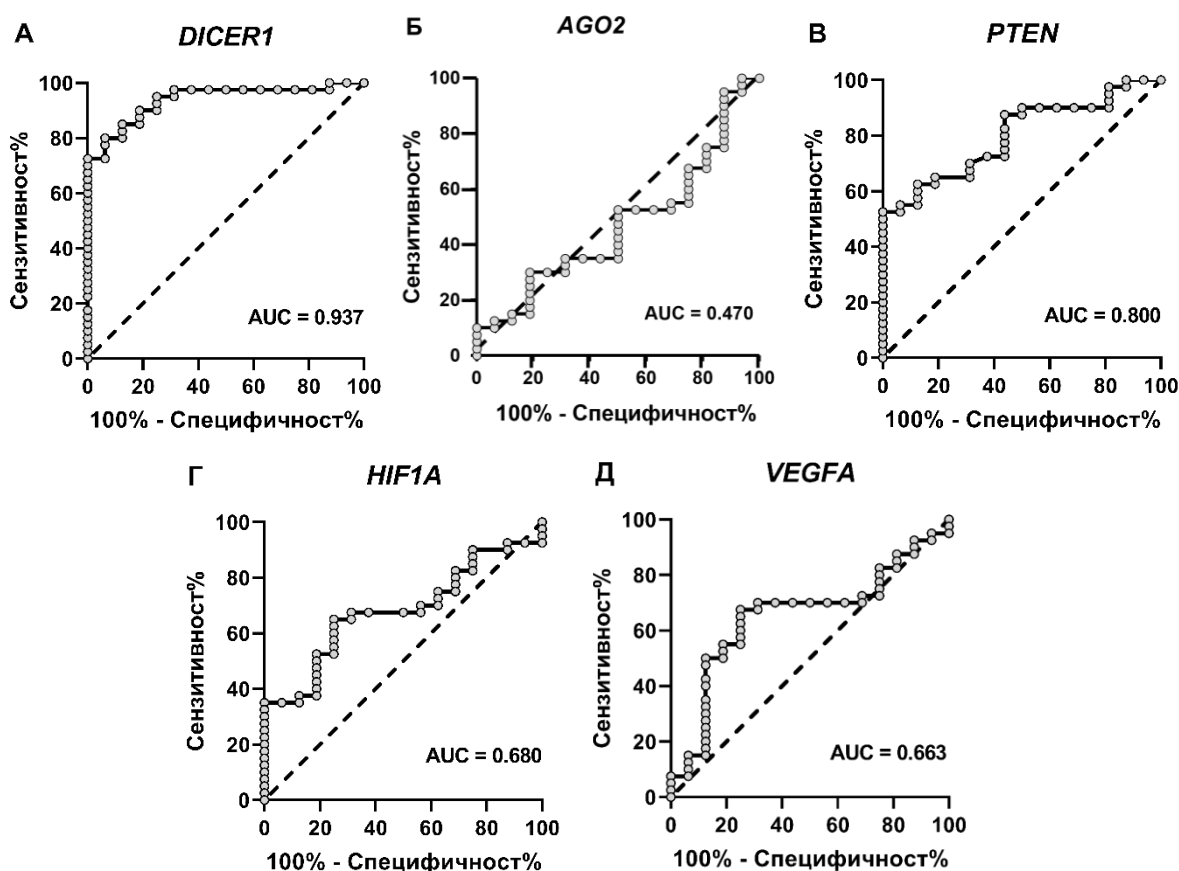
Међу свим анализираним молекулама миРНК, miR-200a је показала најбољи дијагностички потенцијал ($AUC = 0.847 \pm 0.061$, $p < 0.001$), са 95% интервалом поверења у распону од 0.728 до 0.966, сензитивношћу од 82.50% и специфичношћу од 81.20% (Графикон 15А). Дobar дијагностички потенцијал показале су и miR-21 и miR-210 (Графикон 15Б и 15В) са вредношћу површине испод криве од 0.793 ± 0.068 ($p < 0.001$, 95% CI у распону 0.660-0.926) и 0.750 ± 0.070 ($p = 0.004$, 95% CI у распону 0.613-0.887). Сензитивност и специфичност за miR-21 износила је 82.50% и 68.70%, док су за miR-210 ове вредности износиле 50.00% и 93.70%, редом. На Графикону 15Г и 15Д може се приметити слабији али и даље значајан дијагностички потенцијал miR-126 ($AUC = 0.698 \pm 0.071$, $p = 0.022$, 95% CI у распону 0.558-0.837) и miR-130a ($AUC = 0.688 \pm 0.070$, $p = 0.030$, 95% CI у распону 0.550-0.825), сензитивношћу од 42.50 и 57.50%, редом, док су одговарајуће вредности за специфичност износиле 93.70% за оба миРНК молекула.



Графикон 15. Дијагностичка ROC крива за анализиране молекуле миРНК: А) miR-200a, Б) miR-21, В) miR-210, Г) miR-126 и Д) miR-130a. AUC - површина испод криве.

7.2. Дијагностички потенцијал молекула иРНК

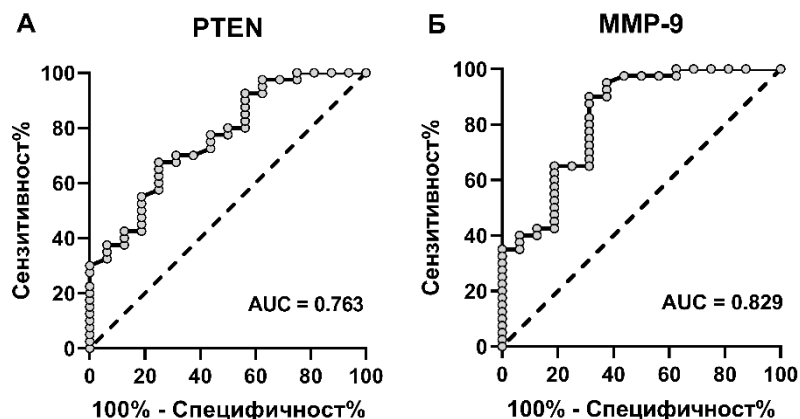
Међу анализираним иРНК, експресија гена *DICER1* имала је најјачи индивидуални дијагностички потенцијал са AUC вредношћу од 0.937 ± 0.032 ($p < 0.001$, 95% CI у распону 0.875-1.000), сензитивношћу од 80.00% и специфичношћу од 93.70% (Графикон 16А). За разлику од тога, експресија гена *AGO2* (Графикон 16Б) имала је најлошију дијагностичку прецизност ($AUC = 0.470 \pm 0.084$, $p = 0.730$, 95% CI у распону 0.306-0.634), ниску сензитивност (30.00%) и високу специфичност (81.20%). Експресија гена *PTEN* показала је добар дијагностички потенцијал ($AUC = 0.800 \pm 0.059$, $p = 0.001$, 95% CI у распону 0.684-0.915), сензитивност од 52.50% и специфичност од 100% (Графикон 16В). Слаб дијагностички потенцијал показала је експресија *HIF1A* ($AUC = 0.680 \pm 0.072$, $p = 0.037$, 95% CI у распону 0.539-0.821) и *VEGFA* гена ($AUC = 0.663 \pm 0.079$, $p = 0.075$, 95% CI у распону 0.498-0.808). Сензитивност за ова два молекула износила је 65.00 и 67.50%, редом, док је специфичност за оба гена износила 75% (Графикон 16Г и 16Д).



Графикон 16. Дијагностичка ROC крива за анализиране молекуле иРНК: А) *DICER1*, Б) *AGO2*, В) *PTEN*, Г) *HIF1A* и Д) *VEGFA*. AUC - површина испод криве.

7.3. Дијагностички потенцијал протеина *PTEN* и *MMP-9*

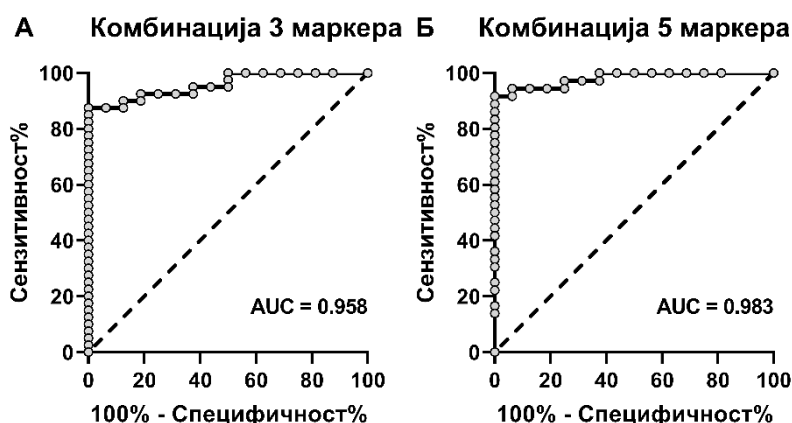
Концентрација протеина *PTEN* у узорцима ткива КЕ и К показала је добар дијагностички потенцијал (Графикон 17А) са AUC вредношћу од 0.763 ± 0.069 ($p = 0.002$, 95% CI у распону 0.627-0.899). Вредности за специфичност и сензитивност износиле су 67.50 и 70.00%, редом. Нешто израженији дијагностички потенцијал добијен је за концентрацију протеина *MMP-9* ($AUC = 0.829 \pm 0.065$, $p < 0.001$, 95% CI у распону 0.748-0.977), са специфичношћу од 90.00% и сензитивношћу од 68.70% (Графикон 17Б).



Графикон 17. Дијагностичка ROC крива за А) PTEN и Б) MMP-9. AUC - површина испод криве.

7.4. Дијагностички потенцијал комбинације потенцијалних маркера

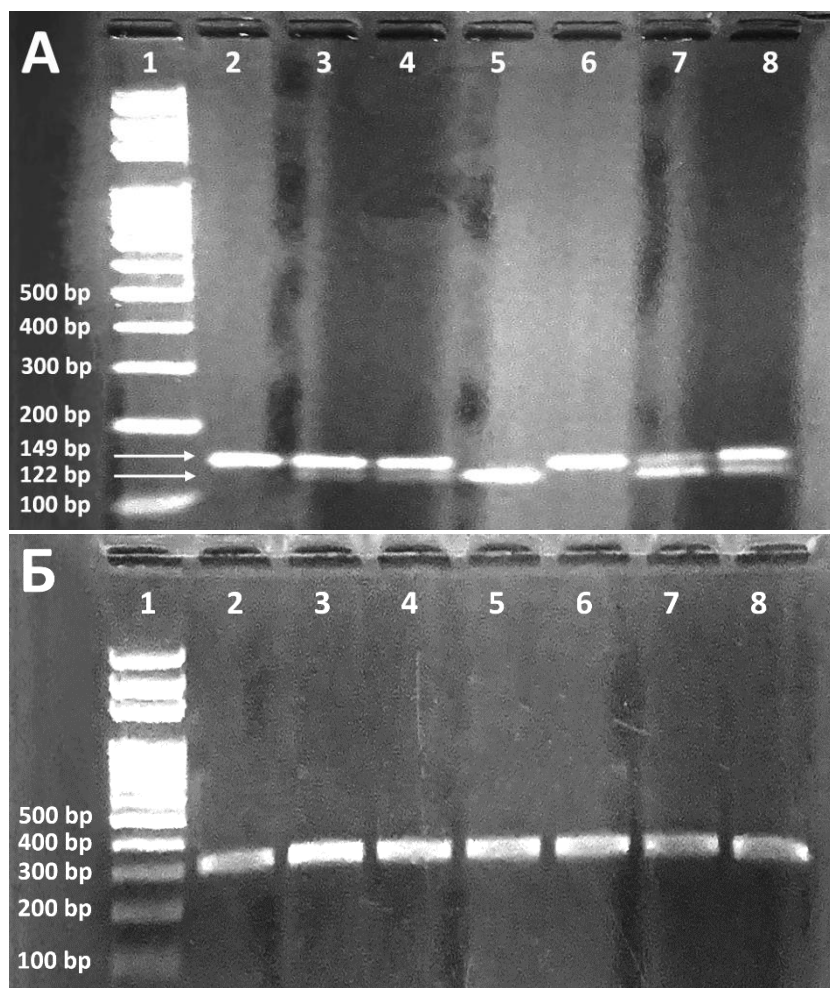
Линеарна регресија („Stepwise“) коришћена је за добијање најбољег модела комбинације од три и пет различитих потенцијалних маркера. Линеарном регресијом добијен је најбољи модел од три различита маркера састављен од miR-200a, иРНК *DICER1* и протеина PTEN, док је модел од пет различитих маркера састављен од miR-200a, miR-210, иРНК *PTEN*, протеина MMP-9 и PTEN. Коришћењем бинарне логистичке регресије добијене су нове варијабле са комбинацијом тестираних маркера које су се користиле за тестирање њиховог синергистичког дијагностичког потенцијала и за добијање ROC криве. Комбинација од три маркера показала је одличан дијагностички потенцијал ($AUC = 0.958 \pm 0.024$, $p < 0.001$), са интервалом поверења (95% CI) у рангу од 0.911 до 1.000, сензитивношћу од 87.50% и специфичношћу од 100% (Графикон 18А). Додатно, комбинација од пет тестираних маркера испољила је најбољу дијагностичку перформансу ($AUC = 0.983 \pm 0.013$, $p < 0.001$), са интервалом поверења од 0.957 до 1.000. Сензитивност за овај модел је износила 92.50%, док је специфичност износила 100% (Графикон 18Б).



Графикон 18. Дијагностичка ROC крива за А) комбинацију од три маркера (miR-200a, *DICER1* и PTEN) и Б) комбинацију од пет маркера (miR-200a, miR-210, *PTEN*, MMP-9 и PTEN). AUC - површина испод криве.

8. Генотипизација генетичких варијанти у генима за *miR-196a2* и *miR-146a*

Анализом дужине рестрикционих фрагмената сегмента ДНК који окружује варијанте у гену за *miR-196a2* C>T (rs11614913) и *miR-146a* T>C (rs6864584) добијене су учесталости алела и генетипова варијанти код пацијенткиња са КЕ и К. У случају rs11614913 лоцираним у гену за *miR-196a2* (C>T), PCR продукт од 149 bp је исечен на два фрагмента од 122 и 25 bp за хомозиготни дивљи генотип CC, присуство три траке од 149, 122 и 25 bp указује на хетерозигот CT, док мање заступљени хомозиготни генотип TT је идентификован на основу присуства једног фрагмента дужине 149 bp (Слика 12А и Слика 1 у Прилогу). За генетичку варијанту rs6864584 (ген за *miR-146a*, T>C) генотип TT је установљен на основу присуства очуваног фрагмента од 300 bp на гелу, три траке чија позиција одговара дужинама фрагмената од 300, 148 и 152 bp упућује на хетерозиготни генотип ТС, док комплетно исечен PCR продукт са два фрагмента дужине 148 и 152 bp указује на мање учестали хомозиготни генотип CC (Слика 12Б). За потврду добијених резултата, насумично је изабрано 14 узорака за које је поновљен експеримент генотипизације, приликом чега су добијени идентични резултати (Слика 2 у Прилогу).



Слика 12. Генотипови генетичких варијанти А) rs11614913 (*miR-196a2* C>T): 1 - ДНК маркер (100 bp), 2 и 6 – дивљи CC генотип, 3, 4, 7 и 8 – хетерозиготни CT генотип, 5 – мутирани TT генотип и Б) rs6864584 (*miR-146a* T>C): 1 - ДНК маркер (100 bp); 2-8 дивљи TT генотип.

Ови резултати су коришћени за испитивање повезаности одређених генотипова са ризиком за развој КЕ, повезаности са патолошким карактеристикама тумора (тип агресивности, FIGO стадијум и градус) и основним клиничким карактеристикама пацијенткиња.

8.1. Асоцијација генетичких варијанти са ризиком за развој КЕ

Табела 12 описује учесталост генотипова за генетичке варијанте у генима за miR-196a2 C>T (rs11614913) и miR-146a T>C (rs6864584). Дистрибуција генотипова за генетичку варијанту miR-196a2 C>T међу узорцима КЕ (p = 0.057) и К (p = 0.23) у складу је са Hardy-Weinberg-овом равнотежом. У оквиру узорака КЕ и К учесталији хомозиготни генотип CC пронађен је код 25% и 37.5%, хетерозиготни СТ код 65 и 62.5% и хомозиготни ређи генотип код 10% и 0% узорака, редом. Учесталост генотипова генетичке варијанте rs11614913 у гену за miR-196a2 није статистички значајно повезана са ризиком за развој КЕ (p = 0.190). Међутим, дистрибуција генотипова између тестираних узорака за ову генетичку варијанту у случају рецесивног модела генетичке асоцијације показала је нешто учесталије присуство ређег алела (алел Т) код пацијенткиња са КЕ, при чему је добијен статистички тренд повезаности са ризиком за развој КЕ (p = 0.094).

С обзиром на то да су сви тестирани узорци ткива КЕ и К за генетику варијанту rs6864584 у оквиру гена miR-146a имали исти генотип (ТТ), овај полиморфизам је изузет из каснијих анализа.

Табела 12. Учесталост алела и дистрибуција генотипова за генетичке варијанте rs11614913 (miR-196a2 C>T) и rs6864584 (miR-146a T>C) код КЕ и К.

Генетички модел miR-196a2 C>T	КЕ N = 40 (%)	К N = 16 (%)	OR (95% CI)	p	AIC
Кодоминантни					
CC	10 (25.0)	6 (37.5)	1.0	0.19	69.7
CT	26 (65.0)	10 (62.5)	0.64 (0.18-2.23)		
TT	4 (10.0)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)		
HWE	0.057	0.23			
Доминантни модел					
CC	10 (25.0)	6 (37.5)	1.00	0.36	70.2
CT+TT	30 (75.0)	10 (62.5)	0.56 (0.16-1.92)		
Рецесиван модел					
CC+CT	36 (90.0)	16 (100.0)	1.0	0.094 [†]	68.2
TT	4 (10.0)	0 (0.0)	0.0 (0.0-NA)		
Прекодминантни					
CC+TT	14 (35.0)	6 (37.5)	1.0	0.86	71
CT	26 (65.0)	10 (62.5)	0.90 (0.27-2.99)		
Лог-адитивни	-	-	0.48 (0.16-1.40)	0.17	69.1
Генетички модел miR-146a T>C	КЕ N = 39 (%)	К N = 16 (%)	OR (95% CI)	p	AIC
Кодоминантни					
TT	39 (100)	16 (100)	1.0	1.00	-
CT	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 (0.00-NA)		
CC	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 (0.00-NA)		

КЕ – карцином ендометријума. К – контрола. OR – Однос шанси. CI – интервал поверења. HWE - Hardy-Weinberg-ова равнотежа. NA – није примењиво. AIC – Акаике информациони критеријум. p – статистичка значајност. [†] статистички тренд значајности.

8.2. Асоцијација генетичких варијанти са патолошким карактеристикама КЕ

Дистрибуција генотипова miR-196a2 C>T у односу на тип агресивности КЕ за различите генетичке моделе приказана је у Табели 13. Дистрибуција генотипова СС и СТ била је нешто учесталија код КЕНТ (27.3% и 66.7%, редом) у односу на КЕАТ (14.3% и 57.1%, редом). Генотип ТТ је учесталији код агресивне форме КЕ (28.6%) у односу на неагресивну (6.1%). Ипак, статистички значајна разлика није показана у дистрибуцији генотипова између КЕНТ и КЕАТ ни за један од тестираних генетичких модела (p у опсегу од 0.11 до 0.64).

Табела 13. Дистрибуција генотипова генетичке варијанте rs11614913 (miR-196a2 C>T) у односу на тип агресивности КЕ.

Генетички модел	КЕНТ N = 33 (%)	КЕАТ N = 7 (%)	OR (95% CI)	p	AIC
Кодоминантни					
СС	9 (27.3%)	1 (14.3%)	1.00	0.26	40.4
СТ	22 (66.7%)	4 (57.1%)	1.64 (0.16-16.72)		
ТТ	2 (6.1%)	2 (28.6%)	9.00 (0.52-155.23)		
Доминантни модел					
СС	9 (27.3%)	1 (14.3%)	1.00	0.45	40.5
СТ+ТТ	24 (72.7%)	6 (85.7%)	2.25 (0.24-21.37)		
Рецесиван модел					
СС+СТ	31 (93.9%)	5 (71.4%)	1.00	0.11	38.6
ТТ	2 (6.1%)	2 (28.6%)	6.20 (0.70-54.61)		
Прекодоминантни					
СС+ТТ	11 (33.3%)	3 (42.9%)	1.0	0.64	40.9
СТ	22 (66.7%)	4 (57.1%)	0.67 (0.13-3.52)		
Лог-адитивни	-	-	3.18 (0.66-15.33)	0.13	38.8

КЕНТ – карцином ендометријума неагресиван тип. КЕАТ – карцином ендометријума агресиван тип. OR – однос шанси. CI – интервал поверења. NA – није примењиво. AIC – Акаике информациони критеријум. p – статистичка значајност.

Анализа асоцијације генетичке варијанте rs11614913 са FIGO стадијумом КЕ приказана је у Табели 14. Највећа учесталост генотипа СС показана је код узорака у стадијуму IA (45.5%), нешто нижу вредност су показали узорци у стадијумима IIA (28.6%) и IIC (25%), док су најнижу учесталост имали узорци у стадијуму IIB (13.3%). Генотип СС је изостао код узорака у стадијуму IC. Учесталост хетерозигота СТ код узорака у стадијуму IIB износила је 80%, код узорака у стадијумима IC и IIA 66.7% и 57.1% и код узорака у стадијумима IA и IIC 54.5% и 50%, редом. Узорци ткива КЕ у стадијуму IC имали су највећу учесталост генотипа ТТ (33.3%), након чега следе узорци у стадијумима IIC, IIA и IIB (25.0, 14.3 и 6.7%, редом). Код пацијенткиња са КЕ у стадијуму IA није утврђен генотип ТТ. Поређењем расподеле генотипова између стадијума IA и IIB, по лог-адитивном генетичком моделу показана је статистички значајна ($p = 0.047$, $OR = 5.51$, $95\% CI = 0.88-34.40$) повезаност ређег алела Т са вишим стадијумом КЕ. Додатно, доминантан генетички модел је показао статистички тренд повезаности ређег алела Т са стадијумом IIB ($p = 0.067$). Учесталост ређег алела Т је значајно виша код пацијенткиња са КЕ у каснијим стадијумима (IIB, IC, IA и IIC заједно) у поређењу са пацијенткињама у стадијуму IA. Тестирањем лог-адитивног генетичког модела установљена је значајна асоцијација ређег алела Т са вишим стадијумима болести ($p = 0.034$, $OR = 4.10$, $95\% CI = 1.03-16.41$). Поред тога, статистички тренд асоцијације добијен је за кодоминантан ($p = 0.078$), доминантан ($p = 0.075$) и рецесиван ($p = 0.098$)

генетички модел. Поређењем учесталости генотипова код пацијенткиња у стадијуму IA и IB са каснијим стадијумима (IC, IA и IIC заједно), статистички тренд асоцијације ређег алела T са вишим клиничким стадијумом болести показан је за рецесивни генетички модел ($p = 0.084$).

Табела 14. Дистрибуција генотипова генетичке варијанте rs11614913 (miR-196a2 C>T) у односу на FIGO стадијум KE.

Тип	IA N = 11 (%)	IB N = 15 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	5 (45.5%)	2 (13.3%)	КД: CT vs CC	5.00 (0.74-33.78)	0.13	37.3
CT	6 (54.5%)	12 (80%)	КД: TT vs CC	NA (0.00-NA)		
TT	0 (0.0%)	1 (6.7%)	Д: CC vs CT + TT	5.42 (0.81-36.36)	0.067†	36.1
			Р: CC + CT vs TT	NA (0.00-NA)	0.29	38.3
			ПД: CC+TT vs CT	3.33 (0.59-18.89)	0.17	37.5
HWE	p 0.50	p 0.045	LA	5.51 (0.88-34.40)	0.047*	35.5
Тип	IA N = 11 (%)	IC+IIA+IIC N = 14 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	5 (45.5%)	3 (21.4%)	КД: CT vs CC	2.22 (0.37-13.18)	0.10	35.7
CT	6 (54.5%)	8 (57.1%)	КД: TT vs CC	NA (0.00-NA)		
TT	0 (0.0%)	3 (21.4%)	Д: CC vs CT + TT	3.06 (0.53-17.46)	0.20	36.7
			Р: CC + CT vs TT	NA (0.00-NA)	0.051†	34.5
			ПД: CC+TT vs CT	1.11 (0.23-5.45)	0.9	38.3
HWE	p 0.50	p 1.00	LA	3.60 (0.82-15.82)	0.066†	34.9
Тип	IA N = 11 (%)	IB+IC+IIA+IIC N = 29 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	5 (45.5%)	5 (17.2%)	КД: CT vs CC	3.33 (0.72-15.54)	0.078†	48
CT	6 (54.5%)	20 (69.0%)	КД: TT vs CC	NA (0.00-NA)		
TT	0 (0.0%)	4 (13.8%)	Д: CC vs CT + TT	4.00 (0.87-18.45)	0.075†	47.9
			Р: CC + CT vs TT	NA (0.00-NA)	0.098†	48.3
			ПД: CC+TT vs CT	1.85 (0.45-7.69)	0.40	50.3
HWE	p 0.50	p 0.069	LA	4.10 (1.03-16.41)	0.034*	46.5
Тип	IA+IB N = 26 (%)	IC+IIA+IIC N = 14 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	7 (26.9%)	3 (21.4%)	КД: CT vs CC	1.04 (0.21-5.08)	0.22	54.8
CT	18 (69.2%)	8 (57.1%)	КД: TT vs CC	7.00 (0.50-97.76)		
TT	1 (3.8%)	3 (21.4%)	Д: CC vs CT + TT	1.35 (0.29-6.32)	0.70	55.6
			Р: CC + CT vs TT	6.82 (0.64-73.06)	0.084†	52.8
			ПД: CC+TT vs CT	0.59 (0.15-2.28)	0.45	55.2
HWE	p 0.038	p 1.00	LA	2.08 (0.62-6.94)	0.22	54.3

OR – однос шанси. CI – интервал поверења. NA – није примењиво. AIC – Акаике информациони критеријум. p – статистичка значајност. † статистички тренд значајности.

Учесталост генотипова miR-196a2 C>T у односу на градус KE приказана је у Табели 15. Хомозиготни генотип CC био је најучесталији код пацијенткиња са градусом G1 (33.3%), затим код пацијенткиња са градусом G2 (22.2%), док су пацијенткиње са градусом G3 имале најнижу учесталост овог генотипа (14.3%). Узорци са градусом G1 имали су учесталост хетерозигота CT од 60%, док су узорци са градусом G2 и G3 показали учесталост од 72.7 и 57.1%, редом. Највећу учесталост ређег хомозиготног генотипа TT имали су узорци са градусом G3 (28.6%), потом са градусом G1 (6.7%), док су најмању учесталост имали узорци са градусом G2 (5.6%). Статистички значајна разлика у дистрибуцији генотипова између градуса KE није показана ни за један генетички модел (p је у опсегу од 0.13 до 0.90).

Табела 15. Дистрибуција генотипова генетичке варијанте rs11614913 (miR-196a2 C>T) у односу на градус КЕ.

Тип	G1 N = 15 (%)	G2 N = 18 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	5 (33.3%)	4 (22.2%)	КД: CT vs CC	1.81 (0.38-8.64)	0.75	50.9
CT	9 (60%)	13 (72.7%)	КД: TT vs CC	1.25 (0.06-26.87)		
TT	1 (6.7%)	1 (5.6%)	Д: CC vs CT + TT	1.75 (0.37-8.20)	0.48	49
p		p	Р: CC + CT vs TT	0.85 (0.05-14.39)	0.89	49.5
HWE	0.58	0.074	ПД: CC+TT vs CT	1.73 (0.40-7.46)	0.46	48.9
			ЛА	1.42 (0.39-5.15)	0.59	49.2
Тип	G1 N = 15 (%)	G3 N = 7 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	5 (33.3%)	1 (14.3%)	КД: CT vs CC	2.22 (0.19-25.72)	0.33	31.3
CT	9 (60%)	4 (57.1%)	КД: TT vs CC	10.00 (0.40-250.40)		
TT	1 (6.7%)	2 (28.6%)	Д: CC vs CT + TT	3.00 (0.28-32.21)	0.33	30.6
p		p	Р: CC + CT vs TT	5.60 (0.41-76.05)	0.18	29.7
HWE	0.58	1.00	ПД: CC+TT vs CT	0.89 (0.14-5.48)	0.90	29.7
			ЛА	3.12 (0.61-16.08)	0.14	29.4
Тип	G2 N = 18 (%)	G3 N = 7 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	4 (22.2%)	1 (14.3%)	КД: CT vs CC	1.23 (0.11-14.42)	0.32	33.4
CT	13 (72.7%)	4 (57.1%)	КД: TT vs CC	8.00 (0.31-206.38)		
TT	1 (5.6%)	2 (28.6%)	Д: CC vs CT + TT	1.71 (0.16-18.73)	0.65	33.4
p		p	Р: CC + CT vs TT	6.80 (0.51-91.50)	0.13	31.4
HWE	0.074	1.00	ПД: CC+TT vs CT	0.51 (0.08-3.16)	0.47	33.1
			ЛА	2.90 (0.51-16.56)	0.21	32.1
Тип	G1 N = 15 (%)	G2+G3 N = 25 (%)	Генетички модел	OR (95% CI)	p	AIC
CC	5 (33.3%)	5 (20%)	КД: CT vs CC	1.89 (0.43-8.30)	0.60	57.9
CT	9 (60%)	17 (68%)	КД: TT vs CC	3.00 (0.23-39.61)		
TT	1 (6.7%)	3 (12%)	Д: CC vs CT + TT	2.00 (0.47-8.56)	0.35	56.1
p		p	Р: CC + CT vs TT	1.91 (0.18-20.23)	0.58	56.6
HWE	0.58	0.12	ПД: CC+TT vs CT	1.42 (0.37-5.37)	0.61	56.7
			ЛА	1.79 (0.56-5.71)	0.32	55.9

OR – однос шанси. CI – интервал поверења. КД – кодоминантан. Д – доминантан. Р - рецесиван
ПД – прекодоминантан. ЛА – лог-адитивни. AIC – Акаике информациони критеријум. p – статистичка значајност.

8.3. Асоцијација генетичких варијанти са основним клиничким карактеристикама пацијенткиња са КЕ и К

Дистрибуција генотипова код пацијенткиња са КЕ и К узорака подељеним у групе на основу клиничких података приказана је у Табелама 16 и 17. Није пронађена статистичка значајна разлика у дистрибуцији генотипова између узорака ткива КЕ и К за основне клиничке карактеристике попут година старости, BMI, пушачког статуса и типа животне средине.

Табела 16. Дистрибуција генотипова генетичке варијанте rs11614913 (miR-196a2 C>T) између КЕ и К у односу на године старости, ВМІ, пушачки статус и тип животне средине.

Генотип	КЕ	К	OR (95% CI)	p
Година $\geq$ 60	N = 29 (%)	N = 4 (%)		
CC	8 (27.6)	2 (50.0)	1.00	0.51
CT	18 (62.1)	2 (50.0)	2.2 (0.3-18.9)	
TT	3 (10.3)	0 (0.0)	NA (0.0-NA)	
Година < 60	N = 11 (%)	N = 12 (%)		
CC	2 (18.2)	4 (33.3)	1.0	0.36
CT	8 (72.7)	8 (66.7)	2.0 (0.3-14.2)	
TT	1 (9.1)	0 (0.0)	NA (0.0-NA)	
ВМІ $\geq$ 25	N = 25 (%)	N = 10 (%)		
CC	7 (28.0)	5 (50.0)	1.00	0.21
CT	15 (60.0)	5 (50.0)	0.5 (0.1-2.1)	
TT	3 (12.0)	0 (0.0)	0.0 (0.0-NA)	
ВМІ < 25	N = 15 (%)	N = 6 (%)		
CC	3 (20.0)	1 (16.7)	1.00	0.69
CT	11 (73.3)	5 (83.3)	1.4 (0.11-16.6)	
TT	1 (6.7)	0 (0.0)	0.0 (0.0-NA)	
Пушач	N = 15 (%)	N = 5 (%)		
CC	3 (20.0)	1 (20.0)	1.00	0.54
CT	10 (66.7)	4 (80.0)	1.20 (0.1-15.3)	
TT	2 (13.3)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)	
Непушач	N = 25 (%)	N = 11 (%)		
CC	7 (28.0)	5 (45.5)	1.00	0.33
CT	16 (64.0)	6 (54.5)	0.52 (0.1-2.3)	
TT	2 (8.0)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)	
Градска средина	N = 25 (%)	N = 12 (%)		
CC	7 (28.0)	3 (25.0)	1.00	0.27
CT	15 (60.0)	9 (75.0)	1.40 (0.3-6.8)	
TT	3 (12.0)	0 (0.0)	0.00 (0.0- NA)	
Сеоска средина	N = 15 (%)	N = 4 (%)		
CC	3 (20.0)	3 (75.0)	1.00	0.11
CT	11 (73.3)	1 (25.0)	0.1 (0.01-1.22)	
TT	1 (6.7)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)	

OR – однос шанси. CI – интервал поверења. N – број узорака. p - статистичка значајност. ВМІ – индекс телесне масе. NA – није примењиво. p – статистичка значајност.

У Табели 17 приказана је учесталост генотипова код пацијенткиња са КЕ и К подељених у групе на основу клиничких карактеристика, попут коришћења контрацепције, броја трудноћа, броја порођаја и дијагнозе дијабетеса. Статистички значајна разлика у дистрибуцији генотипова није показана између формираних група ни за једну од ових карактеристика. Међутим, статистички тренд асоцијације ређег алела Т са ризиком за развој КЕ добијен је за групу пацијенткиња са $\geq$ две трудноће ($p = 0.082$). Учесталост генотипа CC у овој групи пацијенткиња са КЕ износила је 21.9%, док је у К групи износила 50%. Хетерозиготни генотипови (CT) су били учесталији код пацијенткиња са КЕ (65.6%) у односу на К групу (50%). Учесталост ређег хомозиготног генотипа TT код КЕ износила је 12.5%, док је овај генотип изостао код К групе.

Табела 17. Учесталост алела и дистрибуција генотипова генетичке варијанте rs11614913 (miR-196a2 C>T) код КЕ и К у односу коришћење контрацепције, број трудноћа, број порођаја и дијагнозу дијабетеса.

Генотип	КЕ	К	OR (95% CI)	p
Контрацепција +	N = 6 (%)	N = 5 (%)		
CC	1 (16.7)	3 (60.0)	1.00	0.22
CT	4 (66.7)	2 (40.0)	0.17 (0.01-2.82)	
TT	1 (16.7)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)	
Контрацепција -	N = 34 (%)	N = 11 (%)		
CC	9 (26.5)	3 (27.3)	1.00	0.41
CT	22 (64.7)	8 (72.7)	1.09 (0.2-5.1)	
TT	3 (8.8)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)	
≥ 2 Трудноћа	N = 32 (%)	N = 12 (%)		
CC	7 (21.9)	6 (50.0)	1.00	0.082†
CT	21 (65.6)	6 (50.0)	0.33 (0.08-1.38)	
TT	4 (12.5)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)	
< 2 Трудноћа	N = 8 (%)	N = 4 (%)		
CC	3 (37.5)	0 (0.0)	1.00	0.088†
CT	5 (62.5)	4 (100)	0.00 (0.0-NA)	
TT	0 (0.0)	0	0.00 (0.0-NA)	
≥ 2 Порођаја	N = 28 (%)	N = 12 (%)		
CC	7 (25.0)	6 (50.0)	1.00	0.10
CT	17 (60.7)	6 (50.0)	0.41 (0.1-1.7)	
TT	4 (14.3)	0 (0.0)	0.00 (0.0-NA)	
< 2 Порођаја	N = 12 (%)	N = 4 (%)		
CC	3 (25.0)	0 (0.0)	1.00	0.16
CT	9 (75.0)	4 (100)	0.00 (0.00-NA)	
TT	0 (0.0)	0 (0.0)		
Дијабетес +	N = 8 (%)	N = 2 (%)		
CC	2 (25.0)	2 (100)	1.00	0.11
CT	5 (62.5)	0 (0.0)	0.00 (0.00-NA)	
TT	1 (12.5)	0 (0.0)	0.00 (0.00-NA)	
Дијабетес -	N = 32 (%)	N = 14 (%)		
CC	8	4	1.00	0.32
CT	21	10	0.95 (0.2-3.9)	
TT	3	0	0.00 (0.00-NA)	

OR – однос шанси. CI – интервал поверења. N – број узорака. NA – није примењиво. p – статистичка значајност. † статистички тренд значајности.

V ДИСКУСИЈА

Карцином ендометријума је малигнитет унутрашњег епителног слоја материце и представља најчешћи гинеколошки карцином са све већом инциденцом и морталитетом на глобалном нивоу. Комбинација различитих генетских фактора, фактора ризика из окружења и стила живота могу допринети развоју ове болести (Crosbie и сар., 2022). Стандардна дијагностичка процедура КЕ обухвата гинеколошки преглед, ултразвук, биопсију ендометријума и патохистолошку верификацију. Успостављање дијагнозе КЕ у раном стадијуму, док је још увек ограничен само на материцу, осигурава да се већина пацијенткиња излечи путем хистеректомије. Међутим, КЕ дијагностикован у узнапредовалом стадијуму има лошу прогнозу и често може бити смртоносан (Chelmon и сар., 2022). С обзиром на чињеницу да тренутно не постоји адекватан скрининг тест за дијагнозу КЕ, неопходно је истражити нове молекуларне маркере који би могли да детектују овај тип карцинома у његовом раном стадијуму.

Студије са фокусом на испитивању профила експресије гена и молекула миРНК код КЕ могу додатно побољшати постојеће знање о основним молекуларним механизмима КЕ, његовој дијагностици, прогностици и усмерити идентификацију нових терапеутских приступа (Vanno и сар., 2012). Досадашња истраживања указују на повезаност између поремећаја у експресији миРНК молекула и појаве различитих карцинома. Идентификацијом специфично експримираних молекула миРНК у туморским ткивима или миРНК чији се ниво експресије разликује у односу на нормална ткива могуће је вршити типизацију различитих карцинома. Испитивање профила експресије молекула миРНК такође може омогућити детерминацију степена развоја тумора, што може бити од велике користи за одређивање најприкладније терапије. Откриће да миРНК молекули могу бити индикатори туморских процеса и да многе савремене процедуре за њихова истраживања не захтевају инвазивни приступ узорковања биолошког материјала, што је веома обећавајуће за дијагностику (Smolarz и сар., 2022). Бројне студије утврдиле су да поремећај у експресији молекула миРНК код карцинома може да настане путем различитих молекуларних механизма. Ови механизми укључују амплификацију или делецију гена за миРНК, присуство различитих малих мутација и полиморфизама, поремећаје у регулацији њихове транскрипције, епигенетичке промене и различите дефекте у машинерији за биогенезу миРНК молекула. Промене у експресији молекула миРНК могу допринети развоју карцинома путем регулације различитих процеса, као што су пролиферација, ангиогенеза, инвазија и метастазирање. Стога, испитивање нивоа експресије миРНК и њихових регулаторних гена може имати снажан клинички потенцијал у дијагностици и прогностици КЕ (Peng и Croce, 2016; Sharma и Gupta, 2020; Chakraborty и сар., 2023).

Иако се све већи број студија бави испитивањем профила експресије молекула миРНК и тестирањем њиховог дијагностичког потенцијала за различита обољења код људи, мали број студија се фокусирао на испитивање дијагностичког потенцијала молекула миРНК и њихових регулаторних и циљних гена код КЕ (Lee и сар., 2012; Donkers и сар., 2020; Kumari и сар., 2021; Piergentili и сар., 2023). Прегледом литературних података, за испитивање експресије и дијагностичког потенцијала одабрани су миРНК, иРНК и протеини са неизоставном улогом у малигној трансформацији КЕ. У оквиру докторске дисертације испитиван је ниво експресије и дијагностички потенцијал молекула миРНК (miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a), иРНК (*DICER1*, *AGO2*, *PTEN*, *HIF1A* и *VEGFA*), као и протеина PTEN и MMP-9 који имају кључну улогу у молекуларној основи патогенезе КЕ. Додатно је испитана

потенцијална асоцијација генетичке варијанте rs11614913 у гену за miR-196a2 и rs6864584 у гену за miR-146a са ризиком за развој КЕ.

Бројна истраживања су доказала да **miR-200a** има неизоставну улогу у регулацији различитих молекуларних процеса током малигне трансформације, као што су пролиферација, инвазија и миграција туморских ћелија (Wu и сар., 2017; Carter и сар., 2019; Shi и сар., 2019). У зависности од типа карцинома, пријављени су различити обрасци експресије ове миРНК (Favier и сар., 2021; Klicka и сар., 2022). У оквиру докторске дисертације испитивана је релативна експресија молекула миРНК методом qPCR, при чему је детектован значајно виши ниво експресије молекула miR-200a код узорака КЕ у односу на К узорке, што је у складу са претходно пријављеним резултатима. Donkers и сарадници (2021) такође су показали да је експресија miR-200a значајно виша код КЕ у односу на бенигне туморе ендометријума. Поред тога, Dong и сарадници (2021) су показали значајно виши ниво експресије miR-200a код агресивнијих хистолошких типова КЕ у односу на ЕКЕ, док је значајна разлика у експресији ове миРНК између градуса КЕ изостала. Иако се примећује нешто виша експресија молекула miR-200a код КЕАТ, статистички значајна разлика у експресији ове миРНК између различитих типова агресивности КЕ није добијена у оквиру овог докторског рада, што се може објаснити малим бројем узорака који су припадали агресивном типу КЕ. Такође, статистичка значајност је изостала и за друге патохистолошке карактеристике, попут FIGO стадијума и градуса КЕ. Овакви резултати се могу објаснити тиме што су сви узорци КЕ били у раном стадијуму (I и II) и тиме што је мали број узорака обухватао КЕ са градусом G3 (N = 7).

Испитивањем експресије miR-200a у односу на различите основне клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ добијена је значајно виша експресија овог молекула код групе пацијенткиња са BMI ≥ 25 kg/m². миРНК из фамилије miR-200 утишавају експресију инхибитора сигналног пута инсулин-PI3K, чиме регулишу пролиферацију и раст масних телашца и ћелија јетре. Штавише, прекомерна експресија чланова породице miR-200 може подстакнути адипогенезу и акумулацију липида (Iacomino и Siani, 2017).

Нивои експресије анализираних молекула миРНК код узорака КЕ показали су значајну међусобну позитивну корелацију, што указује на њихову потенцијалну синергистичку улогу у регулацији патолошких механизма код КЕ. Експресија miR-200a била је у јакој позитивној корелацији са експресијом miR-21 и miR-210, што може бити последица заједничких механизма њихове регулације у КЕ, као и способности ових миРНК да циљано регулишу исте молекуле иРНК код КЕ. Резултати су показали да је ниво експресије miR-200a у негативној корелацији са експресијом гена *PTEN*. Иако је експресија *PTEN*-а на транскрипционом и протеинском нивоу значајно снижена код узорака КЕ, значајна корелација експресије ове миРНК са концентрацијом протеина *PTEN* није пронађена. Међутим, резултати су показали статистички тренд за корелацију између нивоа експресије иРНК *PTEN* и концентрације протеина *PTEN*. Додатно, примећује се и повишена експресија протеина *PTEN* код узорака у стадијумима IIA и IIC у односу на узорке који су били у стадијуму I, као и позитивна корелација концентрације овог протеина са порастом FIGO стадијума КЕ. Слично томе, Allithy и сарадници (2022) су имунохистохемијском методом демонстрирали позитивну корелацију експресије протеина *PTEN* са стадијумом КЕ. Један од разлога за овакве податке може бити чињеница да је *PTEN* најчешће мутирани ген код ЕКЕ, чиме може доћи до поремећаја ефикасности РНК интерференције. Додатно, ове мутације могу бити мутације погрешног смисла (енгл. *missense*) или бесмислене мутације (енгл. *nonsense*). Код мутација погрешног

смисла долази до супституције аминокиселине у аминокиселинској секвенци, услед промене нуклеотида, што резултује формирањем другачије аминокиселинске секвенце. Оваква мутација не спречава формирање протеинског продукта и представља најчешћи тип мутација тумор-супресора PTEN код KE (Nero и сар., 2019). Услед прогресије KE, може доћи до селекције туморских ћелија са специфичним мутацијама, што може изазвати разлике у протеинској експресији PTEN-а у различитом стадијуму KE (Allithy и сар., 2022). Yoneyama и сарадници (2015) су потврдили да miR-200a може да се везује за 3'-UTR иРНК молекула за *PTEN* и на тај начин смањи његову експресију на Ishikawa ћелијској линији EKE, чиме се активира сигнални пут PI3K и подстиче пролиферација карциномских ћелија. Један од разлога за изостанак корелације између нивоа експресије miR-200a и протеина PTEN је и постојање других механизма регулације транслације иРНК, као и стабилности наведеног протеина у KE, укључујући и пост-транслационе модификације. Yang и сарадници (2020b) показали су да повишена експресија miR-200a код карцинома мокраћне бешике утишава експресију протеина Dicer, због чега има важну улогу у инвазији карциномских ћелија путем регулације сигналне каскаде Dicer/miR-16/JNK2/MMP-2. У оквиру докторске дисертације приказана је значајно нижи ниво генске експресија *DICER1* код KE у односу на K, као и негативна корелација између експресије miR-200a и *DICER1* гена. Ови резултати сугеришу то да miR-200a може циљано да утишава експресију *DICER1* гена и код KE. Додатно, показана је и позитивна корелација између експресије miR-200a и гена *HIF1A* у оквиру резултата. Ово запажање је у сагласности и са резултатима других аутора који су установили да miR-200a циљано инхибира EGLN1 (енгл. *egl-9 family hypoxia inducible factor 1*), чиме се промовише пролиферација HeLa ћелија малигног тумора грлића материце и активира сигнални пут HIF-1 α /VEGF (Su и сар., 2020).

Анализом ROC криве добијени су резултати испитивања дијагностичког потенцијала тестираних маркера. У односу на све тестиране миРНК молекуле, miR-200a је индивидуално имала највиши потенцијал да дискриминише пацијенткиње са KE од пацијенткиња из K групе са AUC вредношћу од 0.847 ± 0.061 . Занимљива је чињеница да су Lee и сарадници (2012) приказали идентичне AUC вредности за miR-200a са нешто мањом стандардном грешком од 0.050 и нижим вредностима за сензитивност и специфичност (76% и 72%). Слично овим резултатима, Donkers и сарадници (2021) су представили нешто нижу AUC вредност за miR-200a од 0.815 ± 0.058 , са вредностима за сензитивност од 69% и специфичност од 88%, на 40 узорака KE и 40 узорака бенигну тумора ендометријума. Експресија гена *DICER1* имала је убедљиво најбоље индивидуалне дијагностичке перформансе у односу на анализиране молекуле са AUC вредношћу од 0.937 ± 0.032 , сензитивношћу од 80% и специфичношћу од 93.7%. Иако претходне студије нису испитивале дијагностички потенцијал експресије гена *DICER1*, одређене студије приказале су да је његова ниска експресија асоцирана са лошијим преживљавањем пацијенткиња са EKE (Zighelboim и сар., 2011). Добар дијагностички потенцијал показала је и експресија гена *PTEN* (AUC = 0.800 ± 0.059 , сензитивност 52.5% и специфичност 100%). Zhang и сарадници (2017b) добили су AUC вредност од 0.842 приликом конструисања ROC криве у циљу испитивања потенцијала експресије гена *PTEN* за дискриминацију 41 узорака KE од 51 узорака пролиферативног и нормалног ендометријума (сензитивност 85.3% и специфичност 83.6%). Нешто слабије, али и даље значајне дијагностичке перформансе *PTEN*-а приказане у овој докторској дисертацији могу бити резултат сврставања пацијенткиња са бенигним стањима ендометријума у контролну групу пацијенткиња, а код којих може доћи до промена у експресији овог гена, за разлику од претходно поменуте студије. Концентрације протеина PTEN такође су добро дискриминисале узорке KE од K узорака (AUC = 0.763, сензитивност 67.5 и

специфичност 75%). Xi и сарадници (2019) су имунохистохемијском методом такође показали да испитивање експресије протеина PTEN има добар дијагностички потенцијал код KE (AUC = 0.839, сензитивност 88% и специфичност 65.5%).

Међу молекулима миРНК који су асоцирани са развојем различитих карцинома, **miR-21** је међу првима које су идентификоване као онкогене миРНК. Промене у експресији ове миРНК могу бити повезане са активношћу различитих епигенетичких фактора, као и са поремећајима у регулацији експресије на транскрипционом и посттранскрипционом нивоу, чиме се остварује онкогено својство ове миРНК (Rhim и сар., 2022). Поремећај у експресији miR-21 је повезан са различитим патофизиолошким процесима. Бројне студије показале су да утиче на пролиферацију, инвазију и миграцију ћелија карцинома дојке, колоне, простате, желуца, оваријума и KE (Bautista-Sánchez и сар., 2020; Hashemi и сар., 2023). У оквиру резултата ове докторске тезе, показана је значајно виши ниво експресије молекула miR-21 код пацијенткиња са KE у односу на K групу, што је у складу са литературним подацима (Lee и сар., 2012; Zhao и сар., 2017; Sato и сар., 2021). Bouziyane и сарадници (2021) су такође показали значајно виши ниво експресије miR-21 код KE у односу на бенигна стања KE, а повећање нивоа експресије такође је било асоцирано са вишим стадијумом болести и градусом KE. У оквиру докторске дисертације, ниво експресије miR-21 показао је статистички тренд повећања у стадијуму IC у односу на стадијуме IA и IIA. Повишен ниво експресије молекула miR-21 установљен је и код KEAT у односу на КЕНТ, при чему се наведени резултат треба тумачити са опрезом услед релативно малог броја узорак у поређеним групама, као и очекивано високе вредности стандардне грешке. Такође, KE са градусом G3 показали су виши ниво експресије ове миРНК у односу на карциноме са градусом G1 и G2. Значајна разлика у експресији miR-21 у односу на различите основне клиничке параметре је изостала.

Ниво експресије молекула miR-21 показао је негативну корелацију са експресијом гена *DICER1* и *PTEN* на транскрипционом нивоу. Наведени резултати су у складу са очекиваним, с обзиром на то да су претходне студије показале да miR-21 може имати више места везивања у оквиру 3'-UTR-а иРНК за *DICER1* и *PTEN*, чиме може остваривати њихову негативну регулацију (Qin и сар., 2012; Zhao и сар., 2017; Ramírez-Moya и сар., 2019). Прекомерна експресија miR-21 може утицати на пролиферацију и инвазију ћелија KE, путем утишавања тумор-супресора *PTEN* (Zhao и сар., 2017). Такође, Meng и сарадници (2007) су код хепатоцелуларног карцинома утврдили да прекомерна експресија miR-21 промовише инвазију и миграцију ћелија услед утишавања PTEN-а, који у нормалним физиолошким условима супримира експресију ензима MMP-9 путем дефосфорилације FAK (енгл. *Focal Adhesion Kinase*). С обзиром на значајно већу концентрацију протеина MMP-9 код KE и позитивну корелацију између miR-21 и MMP-9 која је описана у поглављу резултата, може се поставити хипотеза да miR-21 такође утиче на повећану експресију MMP-9 и самим тим на инвазивност ћелија KE. Концентрација ензима MMP-9 била је значајно виша код пацијенткиња са KEAT у односу на пацијенткиње са КЕНТ, што квалификује наведени ензим за потенцијални маркер са значајем за процену агресивности KE код пацијенткиња. KE који су дијагностиковани са стадијумом IC имали су значајно већу концентрацију ензима MMP-9 у односу на остале стадијуме. У оквиру докторске дисертације, показана је значајна позитивна корелација између концентрације MMP-9 и агресивности KE, док је статистички тренд позитивне корелације описан између концентрације овог ензима и FIGO стадијума KE. Слично овим резултатима, претходне студије показале су да су повишене концентрације MMP-9 значајно асоциране са ризиком за развој KE, као и са FIGO стадијумом, статусом лимфних

нодуса, дубином миометријалне инвазије КЕ и са свеобухватно лошијом прогнозом КЕ (Yu и сар., 2012; Michalczyk и Cymbaluk-Płoska, 2021; Li и сар., 2022).

Повишена експресија miR-21 показала је добар дијагностички потенцијал у дискриминацији узорака КЕ од К, са AUC вредношћу од 0.793 ± 0.068 . Gao и сарадници (2016) представили су нешто више вредности за дискриминацију пацијенткиња са КЕ од здравих индивидуа (AUC = 0.831, сензитивност од 70% и специфичност 92%). Такође, Bouziyane и сарадници (2021) показали су да повећани ниво експресије miR-21 дискриминише узорке ткива КЕ од перитуморског ткива са AUC вредношћу од 0.925 (сензитивност 84.5% и специфичност 86.8%), док је за дискриминацију малигних од бенигних тумора AUC вредност износила 0.750, са сензитивношћу од 54.9% и специфичношћу од 90.7%. Поред тога, концентрације протеина MMP-9 испитане у оквиру докторске дисертације такође су показале добар дијагностички потенцијал са AUC вредношћу од 0.829 ± 0.065 , вредностима сензитивности од 90% и специфичности од 68.7%. У оквиру студије Cymbaluk-Płoska и сарадници (2017), показан је приближан али ипак нешто слабији дијагностички значај протеина MMP-9 (AUC = 0.780) у дискриминацији 80 узорака КЕ од 40 узорака бенигних тумора. Додатно, студија која је анализирала 69 КЕ и 47 контролних узорака вагиналне течности показала је AUC вредност дијагностичке ROC криве за MMP-9 од 0.890 (Martinez-Garcia и сар., 2017). Боља дијагностичка перформанса описана у наведеној студији може бити последица тога што је у експерименталну групу пацијенткиња уврштен већи проценат СКЕ који припадају КЕАТ и који показују значајно више вредности експресије протеина MMP-9 у односу на КЕНТ.

Један од најистраженијих молекула миРНК чија је експресија повећана под хипоксичним условима у различитим примарним и трансформисаним ћелијама је **miR-210**. Штавише, у промоторском региону miR-210 откривени су HRE, за који може да се директно везује HIF-1 α . Након индукције експресије од стране HIF-1 α , miR-210 доприноси бројним ћелијским процесима као одговор на хипоксију, као што су ћелијска диференцијација, пролиферација, ангиогенеза и апоптоза (Qin и сар., 2012; Hui и сар., 2019; Khalilian и сар., 2023). Значајно повишене вредности експресије miR-210 код КЕ која је приказана у оквиру докторске дисертације у складу је са литературним подацима. Devon и сарадници (2011) су такође показали значајно више нивое експресије молекула miR-210 код узорака ЕКЕ у поређењу са нормалним ендометријумом. Поред тога, Yang и сарадници (2018) су показали пораст у експресији ове миРНК, са порастом стадијума и градуса КЕ. Узимајући у обзир да су у оквиру докторске дисертације тестирани само узорци у раном стадијуму, овакав резултат није показан. Међутим, у оквиру резултата, може се приметити повишени ниво експресије miR-210 у стадијуму ПС, као и нешто виши нивои код узорака КЕ са високим градусом.

У оквиру резултата ове докторске тезе, показано је да ниво експресије miR-210 молекула позитивно корелише са експресијом гена *HIF1A*, која је такође била значајно виша код КЕ у односу на К. С обзиром на чињеницу да су ЕКЕ чврсти тумори у којима постоји хипоксично микроокружење, индукција експресије miR-210 кроз механизам одговора на HIF-1 α је очекивани исход. Поред тога, позитивна корелација је пронађена и између нивоа експресије miR-210 и гена *AGO2*. Додатно је експресија гена *AGO2* била у корелацији и са експресијом гена *HIF1A*. Овакви резултати се могу објаснити чињеницом да Ago2 поред стандардне улоге у утишавању молекула иРНК током РНК интерференције, такође може да учествује у отпуштању и усвајању молекула miR-210 током хипоксичне комуникације између ћелија (Hale и сар., 2014). Пролит-

хидроксилација протеина Ago2 делује као молекуларни прекидач чиме се подстиче ослобађање молекула miR-210 и припрема одговор анатомски удаљених ћелија на хипоксичне услове (Hale и сар., 2014). Додатно, експресија miR-210 била је у позитивној корелацији са концентрацијама MMP-9 у тестираним ткивима КЕ. С обзиром на то да се ангиогенеза активира у хипоксичним условима и да је за формирање нових крвних судова неопходно ремоделовање екстраћелијског матрикса, значајно више концентрације ензима MMP-9 и поменута корелација са експресијом молекула miR-210 код КЕ су очекивани резултати. Штавише, Chen и сарадници (2021) су показали да инхибицијом молекула miR-210 долази до смањења експресије протина MMP-2 и MMP-9 у ћелијским линијама карцинома плућа. Ниво експресије молекула miR-210 негативно је корелисао са експресијом гена *DICER1* и *PTEN* у оквиру групе пацијенткиња са КЕ. Одређена истраживања су поред неизоставне улоге miR-210 у хипоксији и ангиогенези такође показала да ова миРНК може да учествује и у промовисању пролиферације, миграције и инвазије карциномских ћелија. Прекомерна експресија молекула miR-210 промовише миграцију и инвазију ћелија карцинома плућа, услед директне инхибиције експресије UPF1 (енгл. *Up-frameshift Protein 1*), што доводи до активације сигналног пута PTEN/PI3K/AKT (Chen и сар., 2021). Додатно, повишени ниво експресије miR-210 може инхибирати експресију EFNA3 (енгл. *EphrinA3*) и заузврат активирати сигнални пут PI3K/AKT и ангиогенезу код ћелија оралног карцинома (Wang и сар., 2020).

Анализом ROC криве, показано је да miR-210 такође добро дискриминише пацијенткиње са КЕ од бенигних тумора ендометријума са AUC вредношћу од 0.750 ± 0.070 . Претрагом литературних података није установљен индивидуални дијагностички потенцијал miR-210 код КЕ. Међутим, Li и сарадници (2013) су показали сличан индивидуални дијагностички потенцијал miR-210 у дискриминацији немикроцелуларног карцинома плућа од здравих контрола са AUC вредношћу од 0.775. Додатно, експресија молекула miR-210 одлично дискриминише малигне туморе грлића материце од здравог ткива са AUC вредношћу од 0.969, сензитивношћу од 91.58% и специфичношћу од 86.76% (Shao и сар., 2020). Експресија гена *HIF1A* имала је слаб, али ипак значајан дијагностички потенцијал код КЕ (AUC = 0.680). Sumera и сарадници (2023) показали су да HIF-1 α добро дискриминише оралне сквамозне карциноме од нормалне оралне мукозе са AUC вредношћу од 0.833. Мета-анализа спроведена од стране Zhu и сарадника (2020) показала је да су повишене вредности протеинске експресије HIF-1 α асоциране са ризиком за развој карцинома, клиничком прогресијом и лошом прогнозом пацијенткиња са КЕ.

Поремећај у регулацији експресије молекула **miR-126** повезан је са високим ризиком за развој различитих малигних обољења, због чега му се преписује значајна улога у биологији канцера и његовом развоју. Бројне студије показале су битну улогу miR-126 у различитим процесима малигне трансформације као што су ангиогенеза, инвазија, метастазирање, ћелијска пролиферација и апоптоза (Guenther и Schrepfer, 2016; Jalil и сар., 2023). Претходне студије показале су тумор-супресорску улогу ове миРНК код КЕ, при чему повећана експресија miR-126 негативно регулише експресију VEGF-а и инвазију ћелија КЕ (Zheng и сар., 2019; Yu и сар., 2021). У студији Zheng и сарадника (2019) описана је значајно нижа експресија молекула miR-126 код КЕ у односу на наизмењене узорке ендометријума, док је експресија ове миРНК негативно корелисала са стадијумом и градусом КЕ. Супротно овим налазима, у оквиру ове докторске дисертације показана је значајно виша експресија miR-126 код узорака КЕ у односу на К ткива. Објашњење за овакве резултате може бити чињеница да се експериментални узорак у нашој студији састојао од КЕ у раном стадијуму и са ниским градусом. Додатно,

контролна ткива су се састојала од различитих бенигних стања ендометријума код којих такође може доћи до поремећаја у експресији ове миРНК. У резултатима се такође може приметити да је експресија miR-126 нижа код КЕ са FIGO стадијумом IIА и ПС у односу на раније стадијуме (IA, IB и IC). Поред тога, значајно виша експресија ($p = 0.013$) ове миРНК описана је у пушачкој групи пацијенткиња са КЕ (41.17 ± 17.68) у односу на оне које су били у непушачкој групи (3.78 ± 1.23), што је у великој мери могло да утиче на добијене резултате у диференцијалној експресији ове миРНК између КЕ и К. Штавише, Pontis и сарадници (2021) показали су повећану експресију miR-126 у екстрацелуларним везикулама код пушача. У оквиру ове студије додатно је утврђено да хипоксични услови могу да стимулишу експресију miR-126 у ендотелним ћелијама и секрецију ове миРНК путем екстрацелуларних везикула, што индукује продукцију VEGF-а путем формирања аутокрине петље.

Са друге стране, miR-126 је препозната као специфична миРНК у ендотелним ћелијама која стимулише ангиогенезу током ембрионалног развоја. С обзиром на то да је секвенца која кодира miR-126 лоцирана у геному у оквиру гена EGFL7, могуће је да ова миРНК повећава сензитивност пролиферативних ендотелних ћелија на VEGF или друге факторе раста путем утишавања експресије SPRED1 (енгл. *Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1*) и PIK3R2 (енгл. *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2*) (Fish и сар., 2008). Додатно, Zhang и сарадници (2022b) показали су да miR-126 и VEGF у прогениторским ћелијама под хипоксичним условима имају синергистичку улогу у активацији АКТ, која као крајњи резултат има активацију ангиогенезе. Ове студије сугеришу да улога молекула миРНК, може варирати у зависности од микроокружења. Иако је показано да miR-126 има неизоставну улогу у регулацији VEGF-а код КЕ (Liu и сар., 2009; Sanguineti и сар., 2021), корелација нивоа њихове експресије је изостала. Изостанак корелације између експресије miR-126 и VEGF-а може бити последица тога што је код пушачке групе показана значајно виша експресија ове миРНК. Нивои експресије гена HIF1A, VEGFA и AGO2 били су у међусобној позитивној корелацији. С обзиром на њихову про-ангиогену улогу код различитих карцинома, овакви резултати су очекивани. Слично томе, Pansare и сарадници (2007) су имунохистохемијском методом показали да вредности експресије HIF-1 α значајно корелишу са експресијом VEGF-а у туморским ћелијама ендометријума. У ћелијским линијама хепатоцелуларног карцинома утврђено је да експресија и секреција VEGF-а значајно корелише са експресијом протеина Ago2, при чему се утишавањем Ago2 индукује смањена експресија VEGF-а и долази до инактивације ангиогенезе у *in vitro* и *in vivo* условима (Ye и сар., 2015). У резултатима је додатно приказана значајна позитивна корелација у нивоу експресије гена AGO2 са бројем трудноћа и порођаја код пацијенткиња са КЕ. Kim и сарадници (2019) су идентификовали поједине полиморфизме у оквиру AGO1 и AGO2 гена који су доведени у асоцијацију са ризиком од рекурентног спонтаног побачаја, истичући њихов значај у регулацији трудноће омогућавањем адекватног функционисања током РНК интерференције.

Повишени нивои експресије молекула miR-126 и гена VEGFA испољили су слабији, али ипак значајан дијагностички потенцијал, са AUC вредношћу од 0.698 ± 0.071 и 0.663 ± 0.079 . Иако је неколико студија испитивало диференцијалну експресију miR-126 између КЕ и К узорака, претрагом литературних података нису пронађени подаци о дијагностичком потенцијалу ове миРНК код КЕ. Међутим, студија спроведена од стране Zhu и сарадника (2016) показала је да miR-126 индивидуално добро дискриминише узорке немикроцелуларног карцинома плућа од здравих контрола са AUC вредношћу од 0.793, сензитивношћу од 60.7% и специфичношћу од 92.5%. Претходна студија заснована

на испитивању серумског нивоа VEGF-а показала је одличан дијагностички потенцијал овог молекула ($AUC = 0.904$) у дискриминацији пацијенткиња са КЕ од К групе (Kotowicz и сар., 2017). Додатно, Zajkowska и сарадници (2018) показали су да ниво VEGF-а у плазми добро дискриминише пацијенткиње са малигним тумором грлића материце ($AUC = 0.862 \pm 0.03$) од здравих испитаница.

Поремећај у регулацији експресије **miR-130a** утврђен је код различитих карцинома. Ова миРНК може да има тумор-супресорску али и онкогену улогу, што зависи од типа тумора (Zhang и сар., 2017a). Код већине малигних тумора, miR-130 има тумор-супресорску улогу у регулацији бројних процеса као што су пролиферација, инвазија и апоптоза (Lohcharoenkal и сар., 2021; Pan и сар., 2022). Међутим, код карцинома желуца, остеосаркома, оралног карцинома и малигних тумора грлића материце има онкогену улогу тако што промовише инвазију и миграцију ћелија (Chen и сар., 2016; Hu и сар., 2021; Mallela и сар., 2021). У оквиру докторске дисертације је установљен је значајно виши ниво експресије miR-130a у ткивима КЕ у односу на К ткива. Такође, резултати су показали нешто више вредности експресије miR-130a код КЕАТ у односу на КЕНТ. Добијени резултати указују на онкогену улогу ове миРНК и код КЕ. Супротно томе, студија спроведена од стране Devog и сарадника (2011) показала је снижену експресију miR-130a код 14 узорака ЕКЕ у односу на четири бенигна ткива ендометријума, док је експресија ове миРНК била значајно виша код девет узорака СКЕ у односу на узорке ЕКЕ. Поред тога, још једна студија пријавила је повишене вредности нивоа експресије miR-130a код узорака КЕ у унапредовалом стадијуму, у односу на узорке са FIGO стадијумом IA (Asanoma и сар., 2019). Према резултатима добијеним у оквиру ове докторске дисертације, примећује се пораст у нивоу експресије miR-130a са порастом FIGO стадијума од IB до IC.

Иако је статистички незначајна, примећује се негативна корелација између нивоа експресије молекула miR-130a и експресије гена *DICER1* и *PTEN*. Биолошка улога miR-130a код КЕ је недовољно истражена, међутим, поједине студије истакле су значај ове миРНК у регулацији пролиферације, инвазије и метастазе код различитих карцинома. Студије су показале да транскрипциони фактор NF- κ B може промовисати експресију miR-130a, што доводи до утишавања PTEN-а и активације сигналног пута АКТ, чиме се промовише раст малигно трансформисаних ћелија грлића материце и ћелија карцинома дојке (Feng и сар., 2016; Wei и сар., 2017). Додатно, *DICER1* такође може бити један од таргетних молекула које miR-130a циљано утишава, чиме се промовише инвазија и миграција SiHa ћелијске линије малигног тумора грлића материце (He и сар., 2014).

Експресија молекула miR-130a испољила је слаб дијагностички потенцијал код КЕ са AUC вредношћу од 0.688 ± 0.070 . Претрагом литературних података нису пронађене информације о дијагностичком потенцијалу ове миРНК код КЕ. Што се тиче других карцинома, ниво експресије miR-130a у серуму показао је високу AUC вредност од 0.907 у дискриминацији здравих контрола од пацијената са аденокарциномом једњака, са вредностима сензитивности и специфичности од 88.0 и 76.7% (Wang и сар., 2018). Додатно, Jiang и сарадници (2015) су такође показали да висока експресија miR-130a у ткивима добро дискриминише малигне туморе желуца од бенигних контролних ткива.

У оквиру биомедицинских истраживања, биомаркери се широко користе у дијагностици различитих болести код људи. За бинарну класификацију, ROC крива је један од најчешће коришћених алата за испитивање дијагностичких тестова и биомаркера. У медицинским истраживањима, постављање дијагнозе одређене болести

помоћу само једног биомаркера често је недовољно прецизно, због чега се све чешће користе комбинације више биомаркера како би се побољшале дијагностичке перформансе теста (Ху и сар., 2015; Ниа и Tian, 2021). Тренутно, молекулима миРНК преписују се бројне карактеристике које их чине погодним потенцијалним биомаркерима за коришћење у дијагностичке сврхе. Експресија молекула миРНК је стабилна и лако се може детектовати у различитим ткивима, крви, урину, столицама, итд. Додатно, поједине миРНК су испољиле бољи дијагностички и прогностички потенцијал код различитих карцинома у поређењу са стандардним биохемијским маркерима који су уврштени у клиничку праксу, као што су CEA (енгл. *Carcinoembryonic antigen*), PSA (енгл. *Prostate-specific antigen*) и AFP (енгл. *alpha-fetoprotein*). Претходне студије показале су да испитивањем експресије појединих миРНК молекула у комбинацији са традиционалним серолошким маркерима побољшава перформансе дијагностичког теста код различитих болести (Wang и сар., 2014; Dong и сар., 2021; Zhang и сар., 2022a; Zhu и сар., 2022).

Линеарна „*Stepwise*“ регресија једна је од широко прихваћених метода за одређивање биомаркера који у комбинацији показују бољу дијагностичку перформансу (Mamtani и сар., 2006; Wang и сар., 2014; Nan и сар., 2021). Помоћу ове методе у оквиру докторске дисертације добијен је модел од три и модел од пет различитих биомаркера који у комбинацији показују одличан дијагностички потенцијал. Модел од пет маркера, који се састојао од miR-200a, miR-210, PTEN, MMP-9 и PTEN, показао је снажан дијагностички перформанс са AUC вредношћу од 0.983 ± 0.013 , интервалом поверења у рангу од 0.957 до 1.000, сензитивношћу од 92.5% и специфичношћу од 100%. Међутим, испитивање великог броја различитих маркера може бити временски и финансијски захтевно у клиничкој пракси, због чега је испитан и модел са комбинацијом од три маркера. На основу резултата бинарне логистичке регресије предложен је модел који је укључивао miR-200a, ген *DICER1* и протеин PTEN, а који је испољио одличан потенцијал у дијагностици КЕ са AUC вредношћу од 0.958 ± 0.024 , интервалом поверења у рангу од 0.911 до 1.000, сензитивношћу од 87.50% и специфичношћу од 100%. На основу добијених резултата може се закључити да модели са већим бројем различитих маркера укључених у комбинацију могу побољшавати дијагностичку перформансу теста. Међутим, испитани модел који је укључивао само три маркера такође је показао одличан дијагностички потенцијал у дискриминацији пацијенткиња са КЕ од К, због чега се оба тестирана модела могу предложити за даља тестирања у већим студијама. Традиционални серумски тумор маркери HE4, CA125, CA724 и CA19-9 испољили су слаб индивидуални потенцијал у дискриминацији пацијенткиња са КЕ од контролне групе са AUC вредношћу у опсегу од 0.510 до 0.763. Комбинације од три маркера испољиле су нешто више AUC вредности које су биле у опсегу од 0.674 до 0.791, док је комбинација од свих 4 тестираних маркера показала најбољу дијагностичку перформансу са AUC вредношћу од 0.821 (Bian и сар., 2017). Wang и сарадници (2014) су представили умерен индивидуални дијагностички потенцијал серумских вредности miR-15b, miR-27a, miR-223 и CA125 у дијагностици ЕКЕ (AUC вредност у рангу од 0.739-0.813). Међутим, комбиновањем нивоа експресије miR-27a и концентрација CA125 добијен је снажан дијагностички потенцијал модела са AUC вредношћу од 0.894, 95% интервалом поверења у рангу од 0.807 до 0.980, вредностима сензитивности од 77.4% и специфичности од 97%. Lee и сарадници, су предложили комбинацију од шест различитих миРНК (miR-182, miR-183, miR-200a, miR-200c, miR-21 и miR-205) за дијагностику КЕ. Овај панел је показао одличан капацитет за дискриминацију узорака КЕ од бенигног и нормалног ендометријума (AUC = 0.961, сензитивност 91% и специфичност 91%).

Подаци добијени у оквиру докторске дисертације у складу су са литературним подацима, и показују да комбиновање различитих типова маркера доприноси оснаживању дијагностичког теста. Додатно, комбинација пет различитих маркера (миРНК, иРНК и протеина) приказана у оквиру докторске дисертације је испољила снажнији дијагностички потенцијал у односу на панеле који су састављени само од традиционалних серумских маркера или само од молекула миРНК коришћених у претходним истраживањима. Традиционални маркери су често фокусирани на панел са лимитираним сетом података, док мултиомика (истовремено испитивање генома, транскриптома, протеома и епигенома) може пружити бољи увид у различите биолошке процесе и дубље разумевање молекуларних механизма и сигналних путева укључених у развој болести (Нео и сар., 2021; Menyhárt и Györfy, 2021). Комбинација више типова биомаркера може обухватити различите аспекте болести, што доводи до прецизније дијагнозе и побољшања сензитивности и специфичности дијагностичких тестова (Etzioni и сар., 2003; Chen и сар., 2017б). Додатно, експресија молекула миРНК, иРНК и протеина може да указује на молекуларне промене које се догађају у раном стадијуму болести, често и пре него што се поједини симптоми испоље, због чега овакав приступ има обећавајућу улогу у правовременој детекцији болести, интервенцији и побољшању изгледа пацијенткиња у излечењу.

Бројне варијације у генима за миРНК могу довести до поремећаја у биогенези и функционисању миРНК молекула, што може довести до повећаног ризика за развој различитих болести, укључујући и малигне (Iorio и Croce, 2012; Otmani и Lewalle, 2021). Претходним студијама откривен је велики број SNP-а и мутација у генима за миРНК, међутим, само неколико њих је тестирано у контексту ризика за развој КЕ. Полиморфизми и мутације које мењају секвенцу матичног региона миРНК могу директно утицати на циљано препознавање иРНК и самим тим на њихово утишавање (Machowska и сар., 2022). Осим утицаја на ефикасност регулације циљних иРНК, овај тип варијанти може довести до драматичне промене сета циљних иРНК, као и до поремећаја у биогенези миРНК услед измена у конформацији прекурсора или до промена у селекцији водећег ланца. За генетичку варијанту C/T (rs11614913) која утиче на секвенцу матичног региона ланца миРНК синтетисаног гена за miR-196a2 који има у неизмењеним ткивима функцију пратећег ланца, доказано је да утиче на поремећај у експресији зреле miR-196a2, као и на повећан ризик за развој различитих карцинома (Zhan и сар., 2011; Wang и сар., 2013; Liu и сар., 2018; Gawish и сар., 2020). С обзиром на локализацију и ефекат на експресију зреле миРНК, ова генетичка варијанта може негативно утицати на обраду пре-миРНК до зреле миРНК и самим тим на њену регулацију циљаних гена. Наиме, ређи алел Т утиче на стабилност секундарне структуре молекула miR-196a2 (Wojcicka, 2014; Chhichholiya и сар., 2021). Претходне студије показале су да miR-196a2 има онкогену улогу код различитих карцинома, односно да њена висока експресија негативно регулише експресију бројних тумор-супресорских гена, као што су HOXA10, DDX3, SPRR2C и KRT5 (Maru и сар., 2009; Yang и сар., 2016; Ni и сар., 2020). Такође, поједине мета-анализе показале су да генетичка варијанта rs11614913 може допринети развоју карцинома плућа, хепатоцелуларног карцинома и малигнух тумора главе и врата (Liu и сар., 2018). Међутим, утицај ове генетичке варијанте на ризик за развој карцинома може да се разликује у односу на етничку припадност испитаника, тип карцинома и тип контрола коришћених у анализама (Yan и сар., 2017). С обзиром на то су лимитирани подаци о ефектима ове генетичке варијанте код КЕ, у оквиру докторске дисертације испитана је асоцијација rs11614913 у оквиру гена за miR-196a2 са ризиком за развој КЕ, као и асоцијација са патохистолошким и клиничким параметрима. Додатно, испитана је и учесталост алела генетичке варијанте

rs6864584 у оквиру гена за miR-146a код испитаница са КЕ и К групе. Међутим, генетичка варијанта rs6864584 је изузета из резултата и дискусије с обзиром на то да је наведени локус у испитиваној популацији мономорфан.

У оквиру докторске дисертације, није показана статистички значајна асоцијација генетичка варијанта rs11614913 са ризиком за развој КЕ. Међутим, с обзиром на то да је ређи алел Т био нешто учесталији код пацијенткиња са КЕ, показан је статистички тренд значајности у тесту асоцијације са ризиком за развој КЕ по рецесивном моделу. Узимајући у обзир релативно мали број узорака КЕ и К, неопходно је потврдити резултате на доста већем узорку у истој и популацијама различитог етничког порекла. Претрагом литературних података пронађена је само једна студија која је испитивала учесталост генотипова ове генетичке варијанте код КЕ у оквиру Кинеске популације испитаника. Liu и сарадници (2015) нису пронашли статистичку значајну разлику у дистрибуцији генотипова између 141 узорака КЕ и 100 К узорака ($p = 0.096$), при чему се такође примећује нешто већа учесталост ређег алела Т код пацијенткиња са КЕ. Додатно, у оквиру исте студије показано је да је rs11614913 асоциран са ризиком за развој карцинома оваријума. За разлику од тога, Thakur и сарадници (2019) су показали у оквиру Индијске популације да је присуство ређег алела Т асоциран са смањеним ризиком за развој малигних тумора грлића материце ($OR = 0.36$, $95\% CI = 0.26-0.50$), с обзиром на да је био учесталији код пацијенткиња из К групе ($N = 150$) у поређењу са експерименталном групом ($N = 150$). Испитивањем учесталости генотипова ове генетичке варијанте у оквиру узорака КЕ са FIGO стадијумом IA и узорака у каснијим стадијумима (IB, IC, IIA и IIC) ове докторске дисертације, установљена је значајна асоцијација ређег алела Т са вишим стадијумима КЕ. Међутим, с обзиром на још мањи број испитаница у подгрупама након стратификације према стадијуму, добијен је широк интервал поверења ($95\% CI 1.03-16.41$) што говори да је процена ефеката непрецизна и да је неопходно потврдити добијене резултате на већем узорку. Асоцијација генетичке варијанте rs11614913 са агресивношћу и градусом КЕ није показана. Поред тога, показан је статистички тренд асоцијације ређег алела Т са повећаним ризиком за развој КЕ код пацијенткиња са две или више трудноћа. Међутим, и код ових резултата примећује се широк опсег интервала поверења. С обзиром на то да претходне студије нису испитивале учесталост генотипова ове генетичке варијанте у односу на патохистолошке и опште клиничке карактеристике пацијенткиња са КЕ, поређење добијених резултата са другим литературним подацима није било могуће.

Основна ограничења резултата и закључака ове докторске дисертације односе се на релативно мали број испитаника који умањује снагу студије за детекцију реалних генетичких асоцијација и биомаркерских својстава испитиваних молекула, а који је нарочито релевантан у случају стратификације група испитаница на основу патохистолошких карактеристика КЕ и клиничких карактеристика пацијенткиња. Из наведеног разлога проистиче и неопходност потврђивања добијених статистички значајних асоцијација у репликативним студијама са већим експерименталним узорком. Такође, ради тестирања прогностичког значаја потенцијалних маркера обухваћених овом тезом, потребно је проширење експерименталне групе у циљу укључивања пацијенткиња са узнапредовалим формама КЕ. С обзиром да се молекули миРНК могу налазити у телесним течностима будућа истраживања могу се фокусирати на испитивању нивоа експресије молекула миРНК у неинвазивним узорцима за детекцију КЕ у његовом раном стадијуму.

VI ЗАКЉУЧЦИ

Према добијеним резултатима истраживања, могу се издвојити следећи закључци:

- Експресија молекула miR-200a, miR-21, miR-210, miR-126 и miR-130a значајно је повишена у ткивима карцинома ендометријума у раном стадијуму у односу на контролна ткива, што указује на њихову потенцијалну улогу у регулацији различитих процеса током малигне трансформације и прогресије овог типа карцинома у раном стадијуму болести.
- Експресија иРНК *DICER1* и експресија PTEN-а на транскрипционом и протеинском нивоу је значајно снижена, док је експресија протеина MMP-9 и иРНК *HIF1A* и *VEGFA* повишена код малигнух ткива, што је у складу са њиховом улогом у стицању инвазивног фенотипа ћелија карцинома ендометријума путем регулације пролиферације, инвазије и ангиогенезе.
- Испитивањем повезаности нивоа експресије анализираних молекула са патохистолошким карактеристикама КЕ добијени су резултати коју указују на потенцијал за коришћење протеина MMP-9 као једног од маркера за одређивање типа агресивности карцинома ендометријума, с обзиром на значајно повишене концентрације овог протеина код агресивнијих форми.
- Поређењем експресије анализираних молекула у групама пацијенткиња формираним на основу основних клиничких карактеристика добијени су резултати који указују да пушење значајно утиче на ниво експресије молекула miR-126 у тестираним узорцима ткива карцинома ендометријума.
- С обзиром на значајну корелацију између нивоа експресије miR-200a, miR-21 и miR-210 и експресије гена *DICER1*, *PTEN*, *HIF1A* и концентрација протеина MMP-9, може се претпоставити да поменути молекули микроРНК имају важну улогу у регулацији малигнух процеса карцинома ендометријума у раном стадијуму, као што су пролиферација, ангиогенеза и инвазија. Ови процеси се могу активирати путем сигналног пута PTEN–PI3K–АКТ који је један од најчешће измењених сигналних путева код карцинома ендометријума.
- Експресија молекула miR-200a, гена *DICER1* и концентрација протеина MMP-9 показале су снажан индивидуални потенцијал у дискриминацији карцинома ендометријума у раном стадијуму од бенигнух ткива.
- Комбиновањем различитих типова маркера може се побољшати дијагностичка перформанса теста, при чему је предложени модел од три маркера који укључује молекула miR-200a, иРНК *DICER1* и протеин PTEN показао одличан потенцијал да дискриминише узорке карцинома ендометријума од контролних узорака са AUC вредношћу од 0.958. Са повећањем броја укључених потенцијалних маркера добијен је панел који укључује miR-200a, miR-210, иРНК *PTEN*, протеине MMP-9 и PTEN, а који је испољио најбољи дијагностички потенцијал (AUC = 0.983) за детекцију карцинома ендометријума. Оба модела се могу предложити за кандидате потенцијално корисне за детекцију карцинома ендометријума у раној

фази болести, због чега је неопходно додатно тестирати дијагностичку ефикасност ових панела у оквиру обимнијих пажљиво дизајнираних студија.

- За генетичку варијанту rs11614913 у оквиру гена miR-196a2 није установљена повезаност са ризиком за развој карцинома ендометријума. Међутим, учесталост ређега алела Т је нешто већа код узорака карцинома ендометријума у односу на контролне узорке.

Коначни закључак

- Ниво експресије тестираних миРНК, иРНК и протеина значајно се разликује између бенигних и малигно трансформираних ткива ендометријума, при чему може добро да осликава стање туморског ткива и додатно унапреди тренутно знање о молекуларним механизмима развоја и прогресије карцинома ендометријума. Поремећај у експресији молекула miR-200a, miR-210, иРНК *DICER1*, протеина MMP-9 и PTEN, поседује висок потенцијал за формирање новог дијагностичког биомаркерског панела за рану детекцију пацијенткиња са карциномом ендометријума који заслужује даља испитивања. Идентификација новог теста који показује високу дијагностичку прецизност у раној детекцији карцинома ендометријума може довести до побољшања тренутних дијагностичких метода и побољшања изгледа пацијенткиња у излечењу од ове опасне болести.

VII ЛІТЕРАТУРА

1. Al-Ostoot, F. H., Salah, S., Khamees, H. A., & Khanum, S. A. (2021). Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities. *Cancer treatment and research communications*, 28, 100422. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100422>
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Garland Science, New York.
3. Allithy, A. N., Ammar, I. M. M., Mohammed M. H. (2022). Diagnostic and Prognostic Values of PTEN Expression in Functional and Pathological Endometrial Biopsies. *Asian Pac J Cancer Biol*, 7(1), 21–7. <https://doi.org/10.31557/APJCB.2022.7.1.21-27>
4. Arancibia, T., Morales-Pison, S., Maldonado, E., & Jara, L. (2021). Association between single-nucleotide polymorphisms in miRNA and breast cancer risk: an updated review. *Biological research*, 54(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40659-021-00349-z>
5. Asanoma, K., Hori, E., Yoshida, S., Yagi, H., Onoyama, I., Kodama, K., Yasunaga, M., Ohgami, T., Kaneki, E., Okugawa, K., Yahata, H., & Kato, K. (2019). Mutual suppression between BHLHE40/BHLHE41 and the MIR301B-MIR130B cluster is involved in epithelial-to-mesenchymal transition of endometrial cancer cells. *Oncotarget*, 10(45), 4640–4654. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27061>
6. Augoff, K., Hryniewicz-Jankowska, A., Tabola, R., & Stach, K. (2022). MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer. *Cancers*, 14(7), 1847. <https://doi.org/10.3390/cancers14071847>
7. Baker-Rand, H., & Kitson, S. J. (2024). Recent Advances in Endometrial Cancer Prevention, Early Diagnosis and Treatment. *Cancers*, 16(5), 1028. <https://doi.org/10.3390/cancers16051028>
8. Banno, K., Kisu, I., Yanokura, M., Tsuji, K., Masuda, K., Ueki, A., Kobayashi, Y., Yamagami, W., Nomura, H., Tominaga, E., Susumu, N., & Aoki, D. (2012). Biomarkers in endometrial cancer: Possible clinical applications (Review). *Oncology letters*, 3(6), 1175–1180. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.654>
9. Bautista-Sánchez, D., Arriaga-Canon, C., Pedroza-Torres, A., De La Rosa-Velázquez, I. A., González-Barrios, R., Contreras-Espinosa, L., Montiel-Manríquez, R., Castro-Hernández, C., Fragoso-Ontiveros, V., Álvarez-Gómez, R. M., & Herrera, L. A. (2020). The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Molecular therapy, Nucleic acids*, 20, 409–420. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.03.003>
10. Bell, D. W., & Ellenson, L. H. (2019). Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. *Annual review of pathology*, 14, 339–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043609>
11. Beral, V., Bull, D., Reeves, G., & Million Women Study Collaborators (2005). Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 365(9470), 1543–1551. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66455-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66455-0)
12. Berek, J. S., Matias-Guiu, X., Creutzberg, C., Fotopoulou, C., Gaffney, D., Kehoe, S., Lindemann, K., Mutch, D., Concin, N., & Endometrial Cancer Staging Subcommittee, FIGO Women's Cancer Committee (2023). FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *International journal of gynaecology and obstetrics*, 162(2), 383–394. <https://doi.org/10.1002/ijgo.14923>

13. Bian, J., Sun, X., Li, B., & Ming, L. (2017). Clinical Significance of Serum HE4, CA125, CA724, and CA19-9 in Patients With Endometrial Cancer. *Technology in cancer research & treatment*, 16(4), 435–439. <https://doi.org/10.1177/1533034616666644>
14. Bogani, G., Ray-Coquard, I., Concin, N., Ngoi, N. Y. L., Morice, P., Caruso, G., Enomoto, T., Takehara, K., Denys, H., Lorusso, D., Coleman, R., Vaughan, M. M., Takano, M., Provencher, D. M., Sagae, S., Wimberger, P., Póka, R., Segev, Y., Kim, S. I., Kim, J. W., ... Monk, B. J. (2023). Endometrial carcinosarcoma. *International journal of gynecological cancer*, 33(2), 147–174. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2022-004073>
15. Bouziyane, A., Lamsisi, M., Benaguida, H., Benhessou, M., El Kerroumi, M., & Ennaji, M. M. (2021). Diagnostic Value of MicroRNA 21 in Endometrial Cancer and Benign Lesions and its Differential Expression with Clinicopathological Parameters. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 10(2), 146–152. <https://doi.org/10.2174/2211536610666210604122816>
16. Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., & Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular cell*, 64(2), 320–333. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004>
17. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A. D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A. G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C. C., Yau, C., Laird, P. W., Ding, L., Zhang, W., Mills, G. B., Kucherlapati, R., Mardis, E. R., & Levine, D. A. (2013). Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497(7447), 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>
18. Carter, J. V., O'Brien, S. J., Burton, J. F., Oxford, B. G., Stephen, V., Hallion, J., Bishop, C., Galbraith, N. J., Eichenberger, M. R., Sarojini, H., Hattab, E., & Galandiuk, S. (2019). The microRNA-200 family acts as an oncogene in colorectal cancer by inhibiting the tumor suppressor RASSF2. *Oncology letters*, 18(4), 3994–4007. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10753>
19. Chakraborty, A., Patton, D. J., Smith, B. F., & Agarwal, P. (2023). miRNAs: Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Genes*, 14(7), 1375. <https://doi.org/10.3390/genes14071375>
20. Chauhan, S., More, A., Chauhan, V., & Kathane, A. (2022). Endometriosis: A Review of Clinical Diagnosis, Treatment, and Pathogenesis. *Cureus*, 14(9), e28864. <https://doi.org/10.7759/cureus.28864>
21. Chelmow, D., Brooks, R., Cavens, A., Huber-Keener, K., Scott, D. M., Sheth, S. S., Whetstone, S., Worly, B., & Burke, W. (2022). Executive Summary of the Uterine Cancer Evidence Review Conference. *Obstetrics and gynecology*, 139(4), 626–643. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004711>
22. Chen, C., Zhang, Y., Zhang, L., Weakley, S. M., & Yao, Q. (2011). MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(1), 14–23. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01219.x>
23. Chen, Y., Zhou, B., Xu, L., Fan, H., Xie, J., & Wang, D. (2017). MicroRNA-146a promotes gastric cancer cell apoptosis by targeting transforming growth factor β -activated kinase 1. *Molecular medicine reports*, 16(1), 755–763. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6640>

24. Chen, J., Yan, D., Wu, W., Zhu, J., Ye, W., & Shu, Q. (2016). MicroRNA-130a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma by targeting PTEN. *Oncology reports*, 35(6), 3285–3292. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4719>
25. Chen, Q., Zhang, H., Zhang, J., Shen, L., Yang, J., Wang, Y., Ma, J., & Zhuan, B. (2021). miR-210-3p Promotes Lung Cancer Development and Progression by Modulating USF1 and PCGF3. *OncoTargets and therapy*, 14, 3687–3700. <https://doi.org/10.2147/OTT.S288788>
26. Chen, Z., Gaudino, G., Pass, H. I., Carbone, M., & Yang, H. (2017). Diagnostic and prognostic biomarkers for malignant mesothelioma: an update. *Translational lung cancer research*, 6(3), 259–269. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.05.06>
27. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 97, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.05.007>
28. Chhichholiya, Y., Suryan, A. K., Suman, P., Munshi, A., & Singh, S. (2021). SNPs in miRNAs and Target Sequences: Role in Cancer and Diabetes. *Frontiers in genetics*, 12, 793523. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.793523>
29. Choupani, J., Nariman-Saleh-Fam, Z., Saadatian, Z., Ouladsahebmadarek, E., Masotti, A., & Bastami, M. (2019). Association of mir-196a-2 rs11614913 and mir-149 rs2292832 Polymorphisms With Risk of Cancer: An Updated Meta-Analysis. *Frontiers in genetics*, 10, 186. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00186>
30. Coll-de la Rubia, E., Martinez-Garcia, E., Dittmar, G., Gil-Moreno, A., Cabrera, S., & Colas, E. (2020). Prognostic Biomarkers in Endometrial Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of clinical medicine*, 9(6), 1900. <https://doi.org/10.3390/jcm9061900>
31. Corr, B., Cosgrove, C., Spinosa, D., & Guntupalli, S. (2022). Endometrial cancer: molecular classification and future treatments. *BMJ medicine*, 1(1), e000152. <https://doi.org/10.1136/bmjmed-2022-000152>
32. Crosbie, E. J., Kitson, S. J., McAlpine, J. N., Mukhopadhyay, A., Powell, M. E., & Singh, N. (2022). Endometrial cancer. *Lancet (London, England)*, 399(10333), 1412–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00323-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00323-3)
33. Cymbaluk-Płoska, A., Chudecka-Głaz, A., Pius-Sadowska, E., Sompolska-Rzechuła, A., Chudecka, K., Bulsa, M., Machaliński, B., & Menkiszak, J. (2017). Clinical Relevance of NGAL/MMP-9 Pathway in Patients with Endometrial Cancer. *Disease markers*, 2017, 6589262. <https://doi.org/10.1155/2017/6589262>
34. de Ziegler, D., Pirtea, P., Galliano, D., Cicinelli, E., & Meldrum, D. (2016). Optimal uterine anatomy and physiology necessary for normal implantation and placentation. *Fertility and sterility*, 105(4), 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.02.023>
35. Devor, E. J., Hovey, A. M., Goodheart, M. J., Ramachandran, S., & Leslie, K. K. (2011). microRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. *Oncology reports*, 26(4), 995–1002. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1372>
36. Diedrich, K., Fauser, B. C., Devroey, P., Griesinger, G., & Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group (2007). The role of the endometrium and embryo in human

- implantation. *Human reproduction update*, 13(4), 365–377. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm011>
37. Dong, X., Chang, M., Song, X., Ding, S., Xie, L., & Song, X. (2021). Plasma miR-1247-5p, miR-301b-3p and miR-105-5p as potential biomarkers for early diagnosis of non-small cell lung cancer. *Thoracic cancer*, 12(4), 539–548. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13800>
 38. Donkers, H., Bekkers, R., & Galaal, K. (2020). Diagnostic value of microRNA panel in endometrial cancer: A systematic review. *Oncotarget*, 11(21), 2010–2023. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27601>
 39. Donkers, H., Hirschfeld, M., Weiß, D., Erbes, T., Jaeger, M., Pijnenborg, J. M. A., Bekkers, R., Galaal, K., & ENITEC-consortium (2021). Usefulness of microRNA detection in the diagnostics of endometrial cancer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 100(6), 1148–1154. <https://doi.org/10.1111/aogs.14141>
 40. Ellis, H. (2011). Anatomy of the uterus. *Anaesthesia Intensive Care Med*, 12(3), 99–101, <https://doi.org/10.1016/J.Mpaic.2010.11.005>
 41. Emons, G., Beckmann, M. W., Schmidt, D., Mallmann, P., & Uterus commission of the Gynecological Oncology Working Group (AGO) (2015). New WHO Classification of Endometrial Hyperplasias. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 75(2), 135–136. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1396256>
 42. Etzioni, R., Kooperberg, C., Pepe, M., Smith, R., & Gann, P. H. (2003). Combining biomarkers to detect disease with application to prostate cancer. *Biostatistics (Oxford, England)*, 4(4), 523–538. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/4.4.523>
 43. Fan, X., Zou, X., Liu, C., Cheng, W., Zhang, S., Geng, X., & Zhu, W. (2021). MicroRNA expression profile in serum reveals novel diagnostic biomarkers for endometrial cancer. *Bioscience reports*, 41(6), BSR20210111. <https://doi.org/10.1042/BSR20210111>
 44. Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M. C., & Martelli, F. (2008). MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *The Journal of biological chemistry*, 283(23), 15878–15883. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800731200>
 45. Fatima, I., Barman, S., Rai, R., Thiel, K. W. W., & Chandra, V. (2021). Targeting Wnt Signaling in Endometrial Cancer. *Cancers*, 13(10), 2351. <https://doi.org/10.3390/cancers13102351>
 46. Favier, A., Rocher, G., Larsen, A. K., Delangle, R., Uzan, C., Sabbah, M., Castela, M., Duval, A., Mehats, C., & Canlorbe, G. (2021). MicroRNA as Epigenetic Modifiers in Endometrial Cancer: A Systematic Review. *Cancers*, 13(5), 1137. <https://doi.org/10.3390/cancers13051137>
 47. Feng, Y., Zhou, S., Li, G., Hu, C., Zou, W., Zhang, H., & Sun, L. (2016). Nuclear factor-κB-dependent microRNA-130a upregulation promotes cervical cancer cell growth by targeting phosphatase and tensin homolog. *Archives of biochemistry and biophysics*, 598, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.019>
 48. Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R. F., Wythe, J. D., Ivey, K. N., Bruneau, B. G., Stainier, D. Y., & Srivastava, D. (2008). miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental cell*, 15(2), 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.008>

49. Fitzgerald, H. (2023). The Endometrium: Understanding its Structure, Function and Importance. *Gynecology & Obstetrics Case report*, 9(4), 32. <https://doi.org/10.36648/2471-8165.9.4.32>
50. Gammon, A., Jasperson, K., & Champine, M. (2016). Genetic basis of Cowden syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *The application of clinical genetics*, 9, 83–92. <https://doi.org/10.2147/TACG.S41947>
51. Gasner, A., & P A, A. (2023). Physiology, Uterus. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557575/> (Пристапљено 10.03.2024)
52. Gawish, E.A., Abu-Raia, G.Y., Osheba, I., Sabry, A., & Allam, E. (2020). Association between miR-196a2 polymorphism and the development of hepatocellular carcinoma in the Egyptian population. *Egypt Liver Journal*, 10, 16. <https://doi.org/10.1186/s43066-020-0019-2>
53. Ghalehbandi, S., Yuzugulen, J., Pranjol, M. Z. I., & Pourgholami, M. H. (2023). The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *European journal of pharmacology*, 949, 175586. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175586>
54. Ghanavati, M., Khorshidi, Y., Shadnoush, M., Akbari, M. E., Ardehali, S. H., Chavarri-Guerra, Y., Akbari, A., Barragan-Carrillo, R., Amin Amlashi, M., Javid, Z., & Rahmani, J. (2023). Tamoxifen use and risk of endometrial cancer in breast cancer patients: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Cancer reports (Hoboken, N.J.)*, 6(4), e1806. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1806>
55. Glaviano, A., Foo, A. S. C., Lam, H. Y., Yap, K. C. H., Jacot, W., Jones, R. H., Eng, H., Nair, M. G., Makvandi, P., Geoerger, B., Kulke, M. H., Baird, R. D., Prabhu, J. S., Carbone, D., Pecoraro, C., Teh, D. B. L., Sethi, G., Cavalieri, V., Lin, K. H., Javid-Sharifi, N. R., ... Kumar, A. P. (2023). PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular cancer*, 22(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01827-6>
56. Gong, T. T., Wang, Y. L., & Ma, X. X. (2015). Age at menarche and endometrial cancer risk: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Scientific reports*, 5, 14051. <https://doi.org/10.1038/srep14051>
57. González, I. A., Stewart, D. R., Schultz, K. A. P., Field, A. P., Hill, D. A., & Dehner, L. P. (2022). DICER1 tumor predisposition syndrome: an evolving story initiated with the pleuropulmonary blastoma. *Modern pathology*, 35(1), 4–22. <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00905-8>
58. Guenther, S. P., & Schrepfer, S. (2016). miR-126: a potential new key player in hypoxia and reperfusion? *Annals of translational medicine*, 4(19), 377. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.22>
59. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
60. Hale, A., Lee, C., Annis, S., Min, P. K., Pande, R., Creager, M. A., Julian, C. G., Moore, L. G., Mitsialis, S. A., Hwang, S. J., Kourembanas, S., & Chan, S. Y. (2014). An Argonaute 2 switch regulates circulating miR-210 to coordinate hypoxic adaptation across cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1843(11), 2528–2542. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.06.012>

61. Han, X., Wang, H., Li, Y., Liu, L., & Gao, S. (2021). A 2 miRNAs-based signature for the diagnosis of atherosclerosis. *BMC cardiovascular disorders*, 21(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s12872-021-01960-4>
62. Hashemi, M., Mirdamadi, M. S. A., Talebi, Y., Khaniabad, N., Banaei, G., Daneii, P., Gholami, S., Ghorbani, A., Tavakolpournegari, A., Farsani, Z. M., Zarrabi, A., Nabavi, N., Zandieh, M. A., Rashidi, M., Taheriazam, A., Entezari, M., & Khan, H. (2023). Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents. *Pharmacological research*, 187, 106568. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106568>
63. Hata, A., & Kashima, R. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 51(3), 121–134. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1117054>
64. He, L., Wang, H. Y., Zhang, L., Huang, L., Li, J. D., Xiong, Y., Zhang, M. Y., Jia, W. H., Yun, J. P., Luo, R. Z., & Zheng, M. (2014). Prognostic significance of low DICER expression regulated by miR-130a in cervical cancer. *Cell death & disease*, 5(5), e1205. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.127>
65. Heo, Y. J., Hwa, C., Lee, G. H., Park, J. M., & An, J. Y. (2021). Integrative Multi-Omics Approaches in Cancer Research: From Biological Networks to Clinical Subtypes. *Molecules and cells*, 44(7), 433–443. <https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0042>
66. Hsieh, P., & Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 129(7-8), 391–407. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.02.012>
67. Hu, W., Zheng, X., Liu, J., Zhang, M., Liang, Y., & Song, M. (2021). MicroRNA MiR-130a-3p promotes gastric cancer by targeting Glucosaminyl N-acetyl transferase 4 (GCNT4) to regulate the TGF- β 1/SMAD3 pathway. *Bioengineered*, 12(2), 11634–11647. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1995099>
68. Hua, J., & Tian, L. (2021). Combining multiple biomarkers to linearly maximize the diagnostic accuracy under ordered multi-class setting. *Statistical methods in medical research*, 30(4), 1101–1118. <https://doi.org/10.1177/0962280220987587>
69. Huang H. (2018). Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(10), 3249. <https://doi.org/10.3390/s18103249>
70. Huang, J. T., Wang, J., Srivastava, V., Sen, S., & Liu, S. M. (2014). MicroRNA Machinery Genes as Novel Biomarkers for Cancer. *Frontiers in oncology*, 4, 113. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00113>
71. Huang, J., Du, F., & Wang, N. (2022). Development of a 4-miRNA prognostic signature for endometrial cancer. *Medicine*, 101(41), e30974. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000030974>
72. Huang, X., Le, Q. T., & Giaccia, A. J. (2010). MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in molecular medicine*, 16(5), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.004>
73. Hui, X., Al-Ward, H., Shaher, F., Liu, C. Y., & Liu, N. (2019). The Role of miR-210 in the Biological System: A Current Overview. *Human heredity*, 84(6), 233–239. <https://doi.org/10.1159/000509280>

74. Iacomino, G., & Siani, A. (2017). Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & nutrition*, 12, 23. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0577-z>
75. Ignatov, A., & Ortmann, O. (2020). Endocrine Risk Factors of Endometrial Cancer: Polycystic Ovary Syndrome, Oral Contraceptives, Infertility, Tamoxifen. *Cancers*, 12(7), 1766. <https://doi.org/10.3390/cancers12071766>
76. Indumati, S., Apurva, B., Gaurav, G., Nehakumari, S., & Nishant, V. (2023). The Role of MicroRNAs in Development of Endometrial Cancer: A Literature Review. *Journal of reproduction & infertility*, 24(3), 147–165. <https://doi.org/10.18502/jri.v24i3.13271>
77. Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(3), 215–222. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318250c001>
78. Jaafar, S. O., Jaffar, J. O., Ibrahim, S. A., & Jarjees, K. K. (2022). MicroRNA Variants miR-27a rs895819 and miR-423 rs6505162, but not miR-124-1 rs531564, are Linked to Endometriosis and its Severity. *British journal of biomedical science*, 79, 10207. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2021.10207>
79. Jalil, A. T., Abdulhadi, M. A., Al-Ameer, L. R., Abbas, H. A., Merza, M. S., Zabibah, R. S., & Fadhil, A. A. (2023). The emerging role of microRNA-126 as a potential therapeutic target in cancer: a comprehensive review. *Pathology, research and practice*, 248, 154631. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154631>
80. Jiang, N. J., Yin, Y. N., Lin, J., Li, W. Y., Long, D. R., & Mei, L. (2023). MicroRNA-21 in gynecological cancers: From molecular pathogenesis to clinical significance. *Pathology, research and practice*, 248, 154630. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154630>
81. Jiang, H., Yu, W. W., Wang, L. L., & Peng, Y. (2015). miR-130a acts as a potential diagnostic biomarker and promotes gastric cancer migration, invasion and proliferation by targeting RUNX3. *Oncology reports*, 34(3), 1153–1161. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4099>
82. Jurišić, V., Živančević-Simonović, S. (2002). Etiologija i patogeneza tumora. U: Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac.
83. Kalampokas, E., Giannis, G., Kalampokas, T., Papathanasiou, A. A., Mitsopoulou, D., Tsironi, E., Triantafyllidou, O., Gurumurthy, M., Parkin, D. E., Cairns, M., & Vlahos, N. F. (2022). Current Approaches to the Management of Patients with Endometrial Cancer. *Cancers*, 14(18), 4500. <https://doi.org/10.3390/cancers14184500>
84. Kelly, T. J., Souza, A. L., Clish, C. B., & Puigserver, P. (2011). A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1alpha stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Molecular and cellular biology*, 31(13), 2696–2706. <https://doi.org/10.1128/MCB.01242-10>
85. Khalilian, S., Bijanvand, A., Abedinlou, H., & Ghafouri-Fard, S. (2023). A review on the role of miR-210 in human disorders. *Pathology, research and practice*, 241, 154244. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154244>
86. Kim, T., & Croce, C. M. (2023). MicroRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies. *Experimental & molecular medicine*, 55(7), 1314–1321. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01050-9>

87. Kim, Y. R., Ryu, C. S., Kim, J. O., An, H. J., Cho, S. H., Ahn, E. H., Kim, J. H., Lee, W. S., & Kim, N. K. (2019). Association study of AGO1 and AGO2 genes polymorphisms with recurrent pregnancy loss. *Scientific reports*, 9(1), 15591. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52073-0>
88. Klicka, K., Grzywa, T. M., Mielniczuk, A., Klinke, A., & Włodarski, P. K. (2022). The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer. *Frontiers in oncology*, 12, 965231. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.965231>
89. Korpál, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of biological chemistry*, 283(22), 14910–14914. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800074200>
90. Kotowicz, B., Fuksiewicz, M., Jonska-Gmyrek, J., Berezowska, A., Radziszewski, J., Bidzinski, M., & Kowalska, M. (2017). Clinical significance of pretreatment serum levels of VEGF and its receptors, IL- 8, and their prognostic value in type I and II endometrial cancer patients. *PloS one*, 12(10), e0184576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184576>
91. Króliczewski, J., Sobolewska, A., Lejnowski, D., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2018). microRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity. *Gene*, 640, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.021>
92. Kruger, N.J. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. In: Walker, J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
93. Kumari, P., Sharma, I., Saha, S. C., Srinivasan, R., & Minhas, P. (2021). Diagnostic potential of differentially regulated microRNAs among endometriosis, endometrioid ovarian cancer, and endometrial cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 17(4), 1003–1011. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_969_19
94. Lan, H., Lu, H., Wang, X., & Jin, H. (2015). MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *BioMed research international*, 2015, 125094. <https://doi.org/10.1155/2015/125094>
95. Lao, T. D., & Le, T. A. H. (2020). MicroRNAs: Biogenesis, Functions and Potential Biomarkers for Early Screening, Prognosis and Therapeutic Molecular Monitoring of Nasopharyngeal Carcinoma. *Processes*, 8(8), 966. <https://doi.org/10.3390/pr8080966>
96. Lee, H., Choi, H. J., Kang, C. S., Lee, H. J., Lee, W. S., & Park, C. S. (2012). Expression of miRNAs and PTEN in endometrial specimens ranging from histologically normal to hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. *Modern pathology*, 25(11), 1508–1515. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.111>
97. Li, X., Zha, L., Li, B., Sun, R., Liu, J., & Zeng, H. (2022). Clinical significance of MMP-9 overexpression in endometrial cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Frontiers in oncology*, 12, 925424. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.925424>
98. Li, L. M., Zhu, Y. X., Zhong, Y., Su, T., Fan, X. M., Xi, Q., Li, M. Y., Fu, J., Tan, H., & Liu, S. (2018). Human epididymis protein 4 in endometrial cancer: A meta-analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 482, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.03.040>

99. Li, Y., Li, C., Liu, S., Yang, J., Shi, L., & Yao, Y. (2021). The associations and roles of microRNA single-nucleotide polymorphisms in cervical cancer. *International journal of medical sciences*, 18(11), 2347–2354. <https://doi.org/10.7150/ijms.57990>
100. Li, Z. H., Zhang, H., Yang, Z. G., Wen, G. Q., Cui, Y. B., & Shao, G. G. (2013). Prognostic significance of serum microRNA-210 levels in nonsmall-cell lung cancer. *The Journal of international medical research*, 41(5), 1437–1444. <https://doi.org/10.1177/0300060513497560>
101. Liao, D., & Johnson, R. S. (2007). Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer metastasis reviews*, 26(2), 281–290. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9066-y>
102. Liu, Q., Wang, W., Yang, X., Zhao, D., Li, F., & Wang, H. (2016). MicroRNA-146a inhibits cell migration and invasion by targeting RhoA in breast cancer. *Oncology reports*, 36(1), 189–196. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4788>
103. Liu, Y., He, A., Liu, B., Zhong, Y., Liao, X., Yang, J., Chen, J., Wu, J., & Mei, H. (2018). rs11614913 polymorphism in miRNA-196a2 and cancer risk: an updated meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 11, 1121–1139. <https://doi.org/10.2147/OTT.S154211>
104. Liu, Z. L., Chen, H. H., Zheng, L. L., Sun, L. P., & Shi, L. (2023). Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 198. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>
105. Liu, B., Peng, X. C., Zheng, X. L., Wang, J., & Qin, Y. W. (2009). MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 66(2), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.01.010>
106. Liu, X., Xu, B., Li, S., Zhang, B., Mao, P., Qian, B., Guo, L., & Ni, P. (2015). Association of SNPs in miR-146a, miR-196a2, and miR-499 with the risk of endometrial/ovarian cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 47(7), 564–566. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv042>
107. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
108. Lohcharoenkal, W., Li, C., Das Mahapatra, K., Lapins, J., Homey, B., Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2021). MiR-130a Acts as a Tumor Suppressor MicroRNA in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Regulates the Activity of the BMP/SMAD Pathway by Suppressing ACVR1. *The Journal of investigative dermatology*, 141(8), 1922–1931. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.01.028>
109. Lu, D., Yao, Q., Zhan, C., Le-Meng, Z., Liu, H., Cai, Y., Tu, C., Li, X., Zou, Y., & Zhang, S. (2017). MicroRNA-146a promote cell migration and invasion in human colorectal cancer via carboxypeptidase M/src-FAK pathway. *Oncotarget*, 8(14), 22674–22684. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15158>
110. Luo, X., Yang, W., Ye, D. Q., Cui, H., Zhang, Y., Hirankarn, N., Qian, X., Tang, Y., Lau, Y. L., de Vries, N., Tak, P. P., Tsao, B. P., & Shen, N. (2011). A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PLoS genetics*, 7(6), e1002128. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002128>

111. Machowska, M., Galka-Marciniak, P., & Kozłowski, P. (2022). Consequences of genetic variants in miRNA genes. *Computational and structural biotechnology journal*, 20, 6443–6457. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.036>
112. Makker, V., MacKay, H., Ray-Coquard, I., Levine, D. A., Westin, S. N., Aoki, D., & Oaknin, A. (2021). Endometrial cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 88. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00324-8>
113. Mallela, K., Shivananda, S., Gopinath, K. S., & Kumar, A. (2021). Oncogenic role of MiR-130a in oral squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, 11(1), 7787. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87388-4>
114. Mamtani, M. R., Thakre, T. P., Kalkonde, M. Y., Amin, M. A., Kalkonde, Y. V., Amin, A. P., & Kulkarni, H. (2006). A simple method to combine multiple molecular biomarkers for dichotomous diagnostic classification. *BMC bioinformatics*, 7, 442. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-442>
115. Mansour, T., & Chowdhury, Y. S. (2023). Endometrial Polyp. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557824/> (Пристаплено 12.03.2024)
116. Domènech, M., Grau, E., Solanes, A., Izquierdo, A., Del Valle, J., Carrato, C., Pineda, M., Dueñas, N., Pujol, M., Lázaro, C., Capellà, G., Brunet, J., & Navarro, M. (2021). Characteristics of Adrenocortical Carcinoma Associated With Lynch Syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 106(2), 318–325. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa833>
117. Martinez-Garcia, E., Lesur, A., Devis, L., Cabrera, S., Matias-Guiu, X., Hirschfeld, M., Asberger, J., van Oostrum, J., Casares de Cal, M. L. Á., Gómez-Tato, A., Reventos, J., Domon, B., Colas, E., & Gil-Moreno, A. (2017). Targeted Proteomics Identifies Proteomic Signatures in Liquid Biopsies of the Endometrium to Diagnose Endometrial Cancer and Assist in the Prediction of the Optimal Surgical Treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(21), 6458–6467. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0474>
118. Maru, D. M., Singh, R. R., Hannah, C., Albarracin, C. T., Li, Y. X., Abraham, R., Romans, A. M., Yao, H., Luthra, M. G., Anandasabapathy, S., Swisher, S. G., Hofstetter, W. L., Rashid, A., & Luthra, R. (2009). MicroRNA-196a is a potential marker of progression during Barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus. *The American journal of pathology*, 174(5), 1940–1948. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080718>
119. Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T., & Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2), 647–658. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.022>
120. Menyhárt, O., & Györfy, B. (2021). Multi-omics approaches in cancer research with applications in tumor subtyping, prognosis, and diagnosis. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 949–960. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.009>
121. Michalczyk, K., & Cymbaluk-Płoska, A. (2021). Metalloproteinases in Endometrial Cancer-Are They Worth Measuring?. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12472. <https://doi.org/10.3390/ijms222212472>

122. Miśkiewicz, J., Mielczarek-Palacz, A., & Gola, J. M. (2023). MicroRNAs as Potential Biomarkers in Gynecological Cancers. *Biomedicines*, 11(6), 1704. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061704>
123. Molina, J. R., & Adjei, A. A. (2006). The Ras/Raf/MAPK pathway. *Journal of thoracic oncology*, 1(1), 7–9. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)31506-9](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)31506-9)
124. Moreira, I., Bartosch, C., Teixeira, M., & Ferreira, M. (2022). Molecular Classification of Endometrial Carcinoma: Protocol for a Cohort Study. *JMIR research protocols*, 11(8), e34461. <https://doi.org/10.2196/34461>
125. Moszyńska, A., Gebert, M., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2017). SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open biology*, 7(4), 170019. <https://doi.org/10.1098/rsob.170019>
126. Mukaka, M. M. (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal*, 24(3), 69–71.
127. Nero, C., Ciccarone, F., Pietragalla, A., & Scambia, G. (2019). PTEN and Gynecological Cancers. *Cancers*, 11(10), 1458. <https://doi.org/10.3390/cancers11101458>
128. Ni, J., Chen, L., Ling, L., Wu, M., Ren, Q., & Zhu, W. (2020). MicroRNA-196a promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human ovarian cancer by directly targeting DDX3 and regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 22(2), 1277–1284. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11236>
129. Ni, L., Tang, C., Wang, Y., Wan, J., Charles, M. G., Zhang, Z., Li, C., Zeng, R., Jin, Y., Song, P., Wei, M., Li, B., Zhang, J., & Wu, Z. (2022). Construction of a miRNA-Based Nomogram Model to Predict the Prognosis of Endometrial Cancer. *Journal of personalized medicine*, 12(7), 1154. <https://doi.org/10.3390/jpm12071154>
130. Nijkang, N. P., Anderson, L., Markham, R., & Manconi, F. (2019). Endometrial polyps: Pathogenesis, sequelae and treatment. *SAGE open medicine*, 7, 2050312119848247. <https://doi.org/10.1177/2050312119848247>
131. North, S., Moenner, M., & Bikfalvi, A. (2005). Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer letters*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.007>
132. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
133. O'Carroll, D., & Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 39–54. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.87>
134. Olena, A. F., & Patton, J. G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of cellular physiology*, 222(3), 540–545. <https://doi.org/10.1002/jcp.21993>
135. Onstad, M. A., Schmandt, R. E., & Lu, K. H. (2016). Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. *Journal of clinical oncology*, 34(35), 4225–4230. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.4638>
136. Otrock, Z. K., Mahfouz, R. A., Makarem, J. A., & Shamseddine, A. I. (2007). Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood cells, molecules & diseases*, 39(2), 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.04.001>

137. Pados, G., Gordts, S., Sorrentino, F., Nisolle, M., Nappi, L., & Daniilidis, A. (2023). Adenomyosis and Infertility: A Literature Review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(9), 1551. <https://doi.org/10.3390/medicina59091551>
138. Page, L. K., Staples, K. J., Spalluto, C. M., Watson, A., & Wilkinson, T. M. A. (2021). Influence of Hypoxia on the Epithelial-Pathogen Interactions in the Lung: Implications for Respiratory Disease. *Frontiers in immunology*, 12, 653969. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653969>
139. Pan, Y., Li, J., Lou, S., Chen, W., Lin, Y., Shen, N., & Li, Y. (2022). Down-Regulated miR-130a/b Attenuates Rhabdomyosarcoma Proliferation via PPAR γ . *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 766887. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.766887>
140. Pansare, V., Munkarah, A. R., Schimp, V., Haitham Arabi, M., Saed, G. M., Morris, R. T., & Ali-Fehmi, R. (2007). Increased expression of hypoxia-inducible factor 1 α in type I and type II endometrial carcinomas. *Modern pathology, Inc*, 20(1), 35–43. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800718>
141. Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development*, 22(7), 894–907. <https://doi.org/10.1101/gad.1640608>
142. Passaro, A., Al Bakir, M., Hamilton, E. G., Diehn, M., André, F., Roy-Chowdhuri, S., Mountzios, G., Wistuba, I. I., Swanton, C., & Peters, S. (2024). Cancer biomarkers: Emerging trends and clinical implications for personalized treatment. *Cell*, 187(7), 1617–1635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.041>
143. Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 1, 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
144. Penha, R. C. C., Sepe, R., De Martino, M., Esposito, F., Pellicchia, S., Raia, M., Del Vecchio, L., Decaussin-Petrucci, M., De Vita, G., Pinto, L. F. R., & Fusco, A. (2017). Role of Dicer1 in thyroid cell proliferation and differentiation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 16(23), 2282–2289. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1380127>
145. Sanderson, P. A., Critchley, H. O., Williams, A. R., Arends, M. J., & Saunders, P. T. (2017). New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Human reproduction update*, 23(2), 232–254. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw042>
146. Piergentili, R., Gullo, G., Basile, G., Gulia, C., Porrello, A., Cucinella, G., Marinelli, E., & Zaami, S. (2023). Circulating miRNAs as a Tool for Early Diagnosis of Endometrial Cancer-Implications for the Fertility-Sparing Process: Clinical, Biological, and Legal Aspects. *International journal of molecular sciences*, 24(14), 11356. <https://doi.org/10.3390/ijms241411356>
147. Pontis, F., Roz, L., Mensah, M., Segale, M., Moro, M., Bertolini, G., Petraroia, I., Centonze, G., Ferretti, A. M., Suatoni, P., Pastorino, U., Fortunato, O., & Sozzi, G. (2021). Circulating extracellular vesicles from individuals at high-risk of lung cancer induce pro-tumorigenic conversion of stromal cells through transfer of miR-126 and miR-320. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 40(1), 237. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02040-3>

148. Qin, Q., Furong, W., & Baosheng, L. (2014). Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 33(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-50>
149. Qin, X., Yan, L., Zhao, X., Li, C., & Fu, Y. (2012). microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer. *Oncology letters*, 4(6), 1290–1296. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.896>
150. Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J. C., Arana-Argáez, V., Lara-Riegos, J., Ramírez-Camacho, M. A., & Alvarez-Sánchez, M. E. (2019). Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 1370. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01370>
151. Raglan, O., Kalliala, I., Markozannes, G., Cividini, S., Gunter, M. J., Nautiyal, J., Gabra, H., Paraskevidis, E., Martin-Hirsch, P., Tsilidis, K. K., & Kyrgiou, M. (2019). Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *International journal of cancer*, 145(7), 1719–1730. <https://doi.org/10.1002/ijc.31961>
152. Ramírez-Moya, J., Wert-Lamas, L., Riesco-Eizaguirre, G., & Santisteban, P. (2019). Impaired microRNA processing by DICER1 downregulation endows thyroid cancer with increased aggressiveness. *Oncogene*, 38(27), 5486–5499. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0804-8>
153. Rhim, J., Baek, W., Seo, Y., Kim, J. H. (2022), From Molecular Mechanisms to Therapeutics: Understanding MicroRNA-21 in Cancer. *Cells*, 11(18), 2791. <https://doi.org/10.3390/cells11182791>
154. Hutt, S., Tailor, A., Ellis, P., Michael, A., Butler-Manuel, S., & Chatterjee, J. (2019). The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. *Acta oncologica*, 58(3), 342–352. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1540886>
155. Sabry, D., El-Deek, S. E. M., Maher, M., El-Baz, M. A. H., El-Bader, H. M., Amer, E., Hassan, E. A., Fathy, W., & El-Deek, H. E. M. (2019). Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 α -VEGF signaling pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 454(1-2), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3462-1>
156. Salimi, S., Sargazi, S., Mollashahi, B., Heidari Nia, M., Mirinejad, S., Majidpour, M., Ghasemi, M., & Sargazi, S. (2022). Association of Polymorphisms in *miR146a*, an Inflammation-Associated MicroRNA, with the Risk of Idiopathic Recurrent Spontaneous Miscarriage: A Case-Control Study. *Disease markers*, 2022, 1495082. <https://doi.org/10.1155/2022/1495082>
157. Samarnthai, N., Hall, K., & Yeh, I. T. (2010). Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstetrics and gynecology international*, 2010, 162363. <https://doi.org/10.1155/2010/162363>
158. Sanguineti, R., Puddu, A., Nicolò, M., Traverso, C. E., Cordera, R., Viviani, G. L., & Maggi, D. (2021). miR-126 Mimic Counteracts the Increased Secretion of VEGF-A Induced by High Glucose in ARPE-19 Cells. *Journal of diabetes research*, 2021, 6649222. <https://doi.org/10.1155/2021/6649222>
159. Santoro, A., Angelico, G., Travaglino, A., Inzani, F., Arciuolo, D., Valente, M., D'Alessandris, N., Scaglione, G., Fiorentino, V., Raffone, A., & Zannoni, G. F. (2021). New Pathological and Clinical Insights in Endometrial Cancer in View of the Updated

<https://doi.org/10.3390/cancers13112623>

160. Sargazi, S., Mollashahi, B., Sargazi, S., Heidari Nia, M., Saravani, R., Mirinejad, S., & Alidadi, A. (2021). Prevalence of miR146a Gene Polymorphisms in Diabetic and Non-diabetic Patients with Chronic Kidney Disease. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 46, 21-31. <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01229-7>
161. Sarhadi, V. K., & Armengol, G. (2022). Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules*, 12(8), 1021. <https://doi.org/10.3390/biom12081021>
162. Schumer, S. T., Cannistra, S. A. (2003). Granulosa cell tumor of the ovary. *Journal of Clinical Oncology*, 21(6), 1180-9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.10.019>
163. Seeber, L. M., Horrée, N., Vooijs, M. A., Heintz, A. P., van der Wall, E., Verheijen, R. H., & van Diest, P. J. (2011). The role of hypoxia inducible factor-1alpha in gynecological cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 78(3), 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.05.003>
164. Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T., & Spillane, C. (2009). miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 4), 918–925. <https://doi.org/10.1042/BST0370918>
165. Semenza, G. L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology*, 19, 176–182. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2004>
166. Shao, M. X., Qu, A. Z., Wang, Y. Q., & Zhong, Y. Y. (2020). Expression level of miRNA-210-3p in cervical cancer and its prognostic potential. *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(12), 6583-6588. https://doi.org/10.26355/eurrev202006_21643
167. Sharma, P. C., & Gupta, A. (2020). MicroRNAs: potential biomarkers for diagnosis and prognosis of different cancers. *Translational cancer research*, 9(9), 5798–5818. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-1294>
168. Shi, C., Yang, Y., Zhang, L., Yu, J., Qin, S., Xu, H., & Gao, Y. (2019). MiR-200a-3p promoted the malignant behaviors of ovarian cancer cells through regulating PCDH9. *OncoTargets and therapy*, 12, 8329–8338. <https://doi.org/10.2147/OTT.S220339>
169. Singh, G., Cue, L., & Puckett, Y. (2024). Endometrial Hyperplasia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560693/> (Приступљено 14.03.2024)
170. Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłło, K., & Hogendorf, P. (2022). miRNAs in Cancer (Review of Literature). *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2805. <https://doi.org/10.3390/ijms23052805>
171. Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(15), 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>
172. Song, F., Chen, Q., Rao, W., Zhang, R., Wang, Y., Ge, H., & Wei, Q. (2019). OVA66 promotes tumour angiogenesis and progression through enhancing autocrine VEGF-VEGFR2 signalling. *EBioMedicine*, 41, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.051>

173. Spadaccino, F., Gigante, M., Netti, G. S., Rocchetti, M. T., Franzin, R., Gesualdo, L., Castellano, G., Stallone, G., & Ranieri, E. (2021). The Ambivalent Role of miRNAs in Carcinogenesis: Involvement in Renal Cell Carcinoma and Their Clinical Applications. *Pharmaceuticals*, 14(4), 322. <https://doi.org/10.3390/ph14040322>
174. Stavast, C. J., & Erkeland, S. J. (2019). The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, 8(11), 1465. <https://doi.org/10.3390/cells8111465>
175. Sternberg, A. K., Buck, V. U., Classen-Linke, I., & Leube, R. E. (2021). How Mechanical Forces Change the Human Endometrium during the Menstrual Cycle in Preparation for Embryo Implantation. *Cells*, 10(8), 2008. <https://doi.org/10.3390/cells10082008>
176. Su, X., Lang, C., Luan, A., & Zhao, P. (2020). MiR-200a promotes proliferation of cervical cancer cells by regulating HIF-1 α /VEGF signaling pathway. *Journal of B.U.ON.*, 25(4), 1935–1940.
177. Sumera, S., Ali, A., Yousafzai, Y. M., Durrani, Z., Alorini, M., Aleem, B., & Zahir, R. (2023). Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Its Relation with Aggressiveness and Grade of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Diagnostics*, 13(3), 451. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13030451>
178. Talhouk, A., McConechy, M. K., Leung, S., Li-Chang, H. H., Kwon, J. S., Melnyk, N., Yang, W., Senz, J., Boyd, N., Karnezis, A. N., Huntsman, D. G., Gilks, C. B., & McAlpine, J. N. (2015). A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *British journal of cancer*, 113(2), 299–310. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.190>
179. Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., & Gong, C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncology letters*, 15(3), 2735–2742. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638>
180. Thakur, N., Singhal, P., Mehrotra, R., & Bharadwaj, M. (2019). Impacts of single nucleotide polymorphisms in three microRNAs (miR-146a, miR-196a2 and miR-499) on the susceptibility to cervical cancer among Indian women. *Bioscience reports*, 39(4), BSR20180723. <https://doi.org/10.1042/BSR20180723>
181. Tian, Y., Zhao, L., Gui, Z., Liu, S., Liu, C., Yu, T., & Zhang, L. (2023). PI3K/AKT signaling activates HIF1 α to modulate the biological effects of invasive breast cancer with microcalcification. *NPJ breast cancer*, 9(1), 93. <https://doi.org/10.1038/s41523-023-00598-z>
182. Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., & Takahashi, T. (2008). let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*, 29(11), 2073–2077. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn187>
183. Urick, M. E., & Bell, D. W. (2019). Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer. *Nature reviews. Cancer*, 19(9), 510–521. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0177-x>
184. Wang, C., Li, Q., & He, Y. (2020). MicroRNA-21-5p promotes epithelial to mesenchymal transition by targeting SRY-box 17 in endometrial cancer. *Oncology reports*, 43(6), 1897–1905. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7556>
185. Wang, X. (2009). A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(4), 716–723. <https://doi.org/10.1261/rna.1460509>

186. Wang, L., Chen, Y. J., Xu, K., Xu, H., Shen, X. Z., & Tu, R. Q. (2014). Circulating microRNAs as a fingerprint for endometrial endometrioid adenocarcinoma. *PloS one*, 9(10), e110767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110767>
187. Wang, L., Ji, F., Liu, G., Wang, W., Li, Z., Yue, Y., & Wang, Z. (2018). Upregulation of circulating miR130a is correlated with development of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *OncoTargets and therapy*, 12, 1–7. <https://doi.org/10.2147/OTT.S162603>
188. Wang, N., Li, Y., Zhu, L. J., Zhou, R. M., Jin, W., Guo, X. Q., Wang, C. M., Chen, Z. F., & Liu, W. (2013). A functional polymorphism rs11614913 in microRNA-196a2 is associated with an increased risk of colorectal cancer although not with tumor stage and grade. *Biomedical reports*, 1(5), 737–742. <https://doi.org/10.3892/br.2013.146>
189. Wei, H., Cui, R., Bahr, J., Zanesi, N., Luo, Z., Meng, W., Liang, G., & Croce, C. M. (2017). miR-130a Deregulates PTEN and Stimulates Tumor Growth. *Cancer research*, 77(22), 6168–6178. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0530>
190. Weinberg, R.A. (2014). The Biology of Cancer. 2nd ed. *Garland Science*, New York and London.
191. WHO Classification of Tumours Editorial Board. (2020). Female Genital Tumours, 5th ed., WHO Classification of Tumours. Vol 4. *IARC Press*.
192. Wilczynski, M., Danielska, J., Dzieńiecka, M., Szymanska, B., Wojciechowski, M., & Malinowski, A. (2016). Prognostic and Clinical Significance of miRNA-205 in Endometrioid Endometrial Cancer. *PloS one*, 11(10), e0164687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164687>
193. Wojcicka, A., de la Chapelle, A., & Jazdzewski, K. (2014). MicroRNA-related sequence variations in human cancers. *Human genetics*, 133(4), 463–469. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1397-x>
194. Wu, C., So, J., Davis-Dusenbery, B. N., Qi, H. H., Bloch, D. B., Shi, Y., Lagna, G., & Hata, A. (2011). Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Molecular and cellular biology*, 31(23), 4760–4774. <https://doi.org/10.1128/MCB.05776-11>
195. Wu, Q., Lu, R. L., Li, J. X., & Rong, L. J. (2017). MiR-200a and miR-200b target PTEN to regulate the endometrial cancer cell growth in vitro. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(5), 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.05.007>
196. Xi, Z., Jing, L., Le-Ni, K., Zhu, L., Ze-Wen, D., Hui, Y., Ming-Rong, X., & Guang-Dong, L. (2019). Evaluation of PTEN and CD4+FOXP3+ T cell expressions as diagnostic and predictive factors in endometrial cancer: A case control study. *Medicine*, 98(30), e16345. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016345>
197. Xie, Y., Shi, X., Sheng, K., Han, G., Li, W., Zhao, Q., Jiang, B., Feng, J., Li, J., & Gu, Y. (2019). PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Molecular medicine reports*, 19(2), 783–791. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9713>
198. Xu, T., Fang, Y., Rong, A., & Wang, J. (2015). Flexible combination of multiple diagnostic biomarkers to improve diagnostic accuracy. *BMC medical research methodology*, 15, 94. <https://doi.org/10.1186/s12874-015-0085-z>

199. Yan, W., Gao, X., & Zhang, S. (2017). Association of miR-196a2 rs11614913 and miR-499 rs3746444 polymorphisms with cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(69), 114344–114359. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22547>
200. Yang, B., Liu, Y., Li, L., Deng, H., & Xian, L. (2020a). MicroRNA-200a promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation, migration and invasion through extensive target genes. *Molecular medicine reports*, 21(5), 2073–2084. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11002>
201. Yang, B., Li, S. Z., Ma, L., Liu, H. L., Liu, J., & Shao, J. J. (2016). Expression and mechanism of action of miR-196a in epithelial ovarian cancer. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(11), 1105–1110. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.09.002>
202. Yang, L., Yang, Z., Yao, R., Li, Y., Liu, Z., Chen, X., & Zhang, G. (2018). miR-210 promotes progression of endometrial carcinoma by regulating the expression of NFIX. *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(11), 5213–5222.
203. Yang, R., Xu, J., Hua, X., Tian, Z., Xie, Q., Li, J., Jiang, G., Cohen, M., Sun, H., & Huang, C. (2020b). Overexpressed miR-200a promotes bladder cancer invasion through direct regulating Dicer/miR-16/JNK2/MMP-2 axis. *Oncogene*, 39(9), 1983–1996. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1120-z>
204. Yao, Q., Cao, Z., Tu, C., Zhao, Y., Liu, H., & Zhang, S. (2013). MicroRNA-146a acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting WASF2. *Cancer letters*, 335(1), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.031>
205. Ye, P., Liu, J., He, F., Xu, W., & Yao, K. (2013). Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *International journal of medical sciences*, 11(1), 17–23. <https://doi.org/10.7150/ijms.7329>
206. Ye, Z. L., Huang, Y., Li, L. F., Zhu, H. L., Gao, H. X., Liu, H., Lv, S. Q., Xu, Z. H., Zheng, L. N., Liu, T., Zhang, J. L., Jin, H. J., & Qian, Q. J. (2015). Argonaute 2 promotes angiogenesis via the PTEN/VEGF signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *Acta pharmacologica Sinica*, 36(10), 1237–1245. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.18>
207. Yoneyama, K., Ishibashi, O., Kawase, R., Kurose, K., & Takeshita, T. (2015). miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the PTEN gene in endometrioid endometrial carcinoma. *Anticancer research*, 35(3), 1401–1410.
208. Yu, F., Jiang, Q., Zhou, Y., Yang, Z., Yu, X., Wang, H., Liu, Z., Wang, L., Fang, W., & Guo, S. (2012). Abnormal expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) correlates with clinical course in Chinese patients with endometrial cancer. *Disease markers*, 32(5), 321–327. <https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0886>
209. Yu, J., Fan, Q., & Li, L. (2021). The MCM3AP-AS1/miR-126/VEGF axis regulates cancer cell invasion and migration in endometrioid carcinoma. *World journal of surgical oncology*, 19(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02316-0>
210. Zajkowska, M., Zbucka-Krętowska, M., Sidorkiewicz, I., Lubowicka, E., Będkowska, G. E., Gacuta, E., Szmitkowski, M., & Ławicki, S. (2018). Human Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinase 9, and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 and Their Applicability as Tumor Markers in Diagnoses of Cervical Cancer Based on ROC Analysis. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, 25(1), 1073274818789357. <https://doi.org/10.1177/1073274818789357>

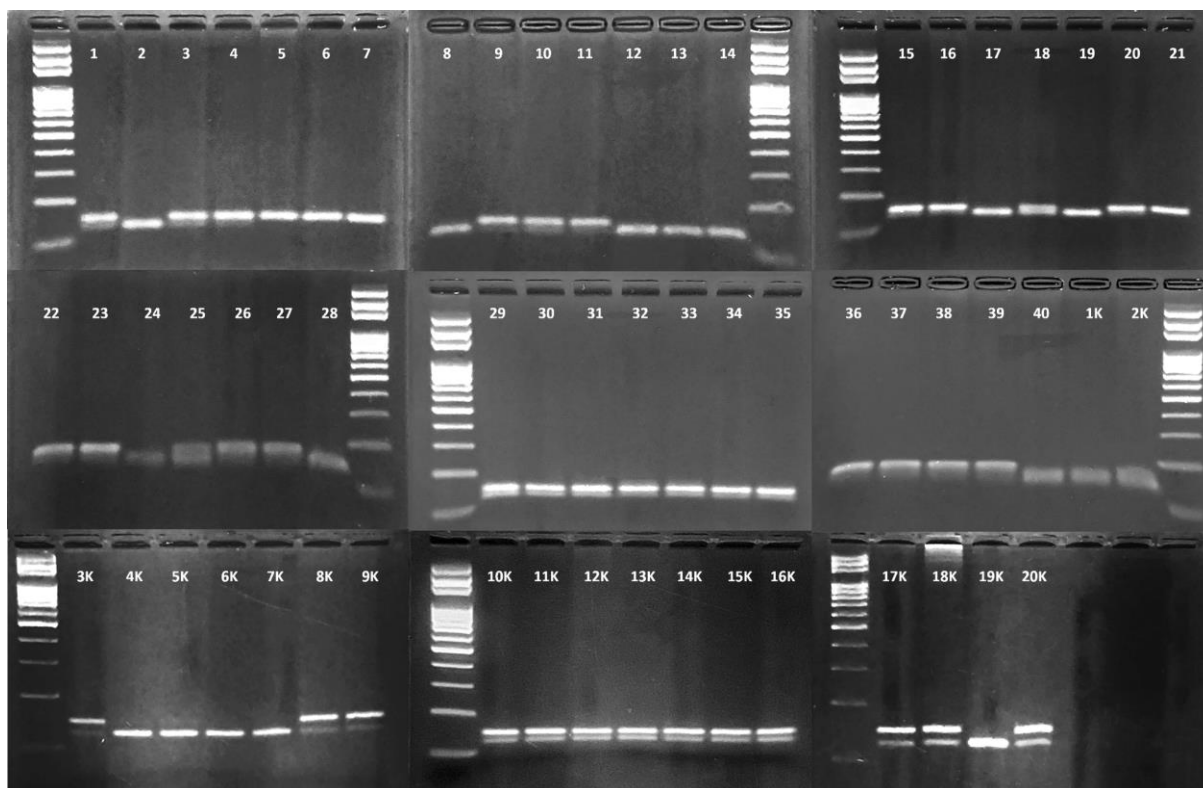
211. Zangari, J., Ilie, M., Rouaud, F., Signetti, L., Ohanna, M., Didier, R., Roméo, B., Goldoni, D., Nottet, N., Staedel, C., Gal, J., Mari, B., Mograbi, B., Hofman, P., & Brest, P. (2017). Rapid decay of engulfed extracellular miRNA by XRN1 exonuclease promotes transient epithelial-mesenchymal transition. *Nucleic acids research*, 45(7), 4131–4141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1284>
212. Zhan, J. F., Chen, L. H., Chen, Z. X., Yuan, Y. W., Xie, G. Z., Sun, A. M., & Liu, Y. (2011). A functional variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility of colorectal cancer in a Chinese population. *Archives of medical research*, 42(2), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.04.001>
213. Zhang, C., Sun, C., Zhao, Y., Wang, Q., Guo, J., Ye, B., & Yu, G. (2022). Overview of MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for High-Incidence Cancers in 2021. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11389. <https://doi.org/10.3390/ijms231911389>
214. Zhang, H. D., Jiang, L. H., Sun, D. W., Li, J., & Ji, Z. L. (2017). The role of miR-130a in cancer. *Breast cancer*, 24(4), 521–527. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0776-x>
215. Zhang, H. M., Fan, T. T., Li, W., & Li, X. X. (2017). Expressions and significances of TTF-1 and PTEN in early endometrial cancer. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(3 Suppl), 20–26.
216. Zhang, Y., Xu, Y., Zhou, K., Kao, G., & Xiao, J. (2022). MicroRNA-126 and VEGF enhance the function of endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction. *Experimental and therapeutic medicine*, 23(2), 142. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.11065>
217. Zheng, X., Liu, M., Song, Y., & Feng, C. (2019). Long Noncoding RNA-ATB Impairs the Function of Tumor Suppressor miR-126-Mediated Signals in Endometrial Cancer for Tumor Growth and Metastasis. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 34(1), 47–55. <https://doi.org/10.1089/cbr.2018.2565>
218. Zhou, L. L., Shen, Y., Gong, J. M., Sun, P., & Sheng, J. H. (2017). MicroRNA-466 with tumor markers for cervical cancer screening. *Oncotarget*, 8(41), 70821–70827. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19992>
219. Zhu, P., Shen, L., Ren, Q., Zeng, Q., & He, X. (2020). Prognostic and Clinicopathological Significance of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in oncology*, 10, 587420. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.587420>
220. Zhu, W., Zhou, K., Zha, Y., Chen, D., He, J., Ma, H., Liu, X., Le, H., & Zhang, Y. (2016). Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PloS one*, 11(4), e0153046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153046>
221. Zhu, Z., Chen, Z., Wang, M., Zhang, M., Chen, Y., Yang, X., Zhou, C., Liu, Y., Hong, L., & Zhang, L. (2022). Detection of plasma exosomal miRNA-205 as a biomarker for early diagnosis and an adjuvant indicator of ovarian cancer staging. *Journal of ovarian research*, 15(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-00961-x>
222. Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), 51–60.

223. Zigelboim, I., Reinhart, A. J., Gao, F., Schmidt, A. P., Mutch, D. G., Thaker, P. H., & Goodfellow, P. J. (2011). DICER1 expression and outcomes in endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Cancer*, 117(7), 1446–1453. <https://doi.org/10.1002/cncr.25665>
224. Zu, Y., Yang, Y., Zhu, J., Bo, X., Hou, S., Zhang, B., Qiu, J., & Zheng, J. (2016). MiR-146a suppresses hepatocellular carcinoma by downregulating TRAF6. *American journal of cancer research*, 6(11), 2502–2513.

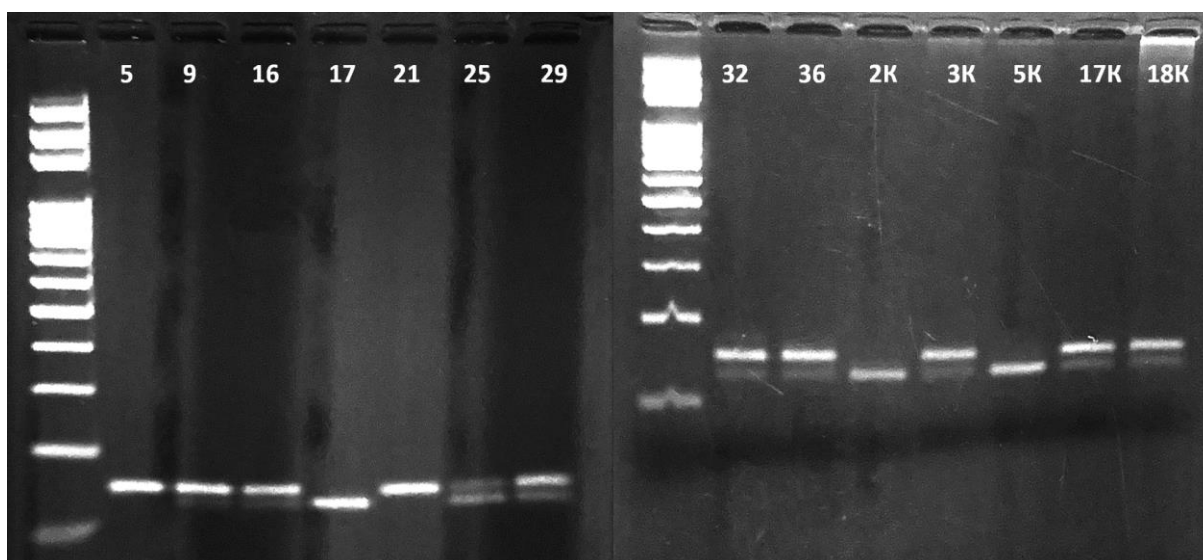
Коришћене интернет странице:

1. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/en> (Приступљено 22.03.2024.)
2. <https://commons.wikimedia.org> (Приступљено 27.03.2024.)
3. <https://www.snpstats.net/start.htm> (Приступљено 26.02.2024.)

VIII ПРИЛОГ



Слика 1. Визуализација реакције PCR-RFLP вршена електрофорезом у 3% агарозном гелу за генетичку варијанту rs11614913 у оквиру гена за miR-196a2.



Слика 2. Потврда насумично селекованих узорака PCR-RFLP реакције вршена електрофорезом у 3% агарозном гелу за генетичку варијанту rs11614913 у оквиру гена за miR-196a2.

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

3'-UTR - *3' Untranslated Region*
AFP - *Alpha-fetoprotein*
AGO2 - *Argonaute RISC Catalytic Component 2*
AKT - *Alpha serine/threonine-protein kinase*
AMACR - *Alpha-Methylacyl-CoA Racemase*
AUC - *Area Under the Curve*
Bcl-2 - *B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 Protein*
bHLH-PAS - *helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*
BMI – *Body mass index*
CA125 - *Cancer antigen 125*
CCNE1 - *Cyclin E1*
CCR4-NOT - *Carbon Catabolite Repressor 4–negative on TATA complex*
CEA - *Carcinoembryonic antigen*
COX10 - *Cytochrome C Oxidase 10)*
CT - *Computed tomography*
Ct - *Cyclus threshold*
CTNNB1 - *Catenin Beta 1*
CVD – *Cardiovascular diseases*
DDX3 - *DEAD box RNA helicase*
DEPC - *Diethylpyrocarbonate*
DGCR8 - *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*
Dicer - *Dicer RNase III endonuclease*
DMSO - *Dimethyl Sulfoxide*
Drosha - *Drosha ribonuclease III*
EFNA3 - *EphrinA3*
EGFL7 - *Epidermal growth factor-like domain-containing gene 7*
EGLN1 - *egl-9 family hypoxia inducible factor 1*
EMT - *Epithelial–mesenchymal transition*
ERBB2 - *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*
ERK1/2 - *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*
FAK - *Focal Adhesion Kinase*
FBXW7 - *F-box/WD Repeat-Containing Protein 7*
FIGO - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*
GCO - *Global Cancer Observatory*
GPD1L - *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like*
GW182 - *Glycine-Tryptophan protein of 182 kDa*
HE4 - *Human epididymis protein 4*
HNF-1 β - *Hepatocyte Nuclear Factor-1 β*
HOXC10 - *Homeobox C10*
IARC - *International Agency for Research on Cancer*
IQR – *Interquartile range (интерквартални опсег)*
IRS1 - *Insulin receptor substrate-1*

ISCU - *Iron-sulfur cluster assembly enzyme*
 KRAS - *Kirsten Rat Sarcoma Viral oncogene homolog*
 LKB1 - *Liver Kinase B1*
 LVSI - захваћеност лимфоваскуларног простора
 MEK1/2 - *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1/2*
 MMP-9 - *Matrix metalloproteinase-9*
 MMR - *DNA Mismatch Repair*
 MMRd - *Mismatch repair deficiency*
 MSI-H - *Microsatellite Instability-High*
 MYC - *Myelocytomatosis oncogene*
 Napsin-A - *Novel Aspartic Proteinase of the Pepsin family A*
 NIFX - *Nuclear factor I/X*
 NSMP - *No Specific Molecular Profile*
 ODD - *Oxygen dependent degradation*
 p – Статистичка значајност
 p38MAPK - *mitogen-activated protein kinases*
 p53abn - p53 abnormal
 PBS - *Phosphate Buffered Saline*
 PDK - *Pyruvate dehydrogenase kinase*
 PET - *Positron emission tomography*
 PHD 1-3 - *Prolyl hydroxylase domain proteins*
 PI3K - *Phosphoinositide 3-Kinase*
 PIGF - *Placental Growth Factor*
 PIK3CA - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*
 PIK3R1 - *Phosphoinositide-3-kinase Regulatory Subunit 1*
 PIK3R2 - *Phosphoinositide-3 kinase regulatory subunit 2*
 PIP2 - *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*
 PIP3 - *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*
 POLE - *Polymerase-ε*
 POLEmut - *POLE mutated*
 PPP2R1A - *Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit A, Alpha*
 PSA - *Prostate-specific antigen*
 PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog*
 qPCR - *quantitative real-time PCR*
 r – Коефицијент корелације
 Ran-GTP - *Ras-related nuclear protein guanosine triphosphate*
 RASSF2 - *Ras Association Domain Family Member 2*
 RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
 RISK - *RNA-induced silencing complex*
 RNF43 - *Ring Finger Protein 43*
 ROC - *Receiver Operating Characteristics Curve*
 SCNA-h - *Somatic Copy-Number Alteration high*
 SCNA-l - *Somatic Copy-Number Alteration low*
 SDHD - *Succinate dehydrogenase complex subunit D*

SNPs - *Single Nucleotide Polimorphisms*
 SOX12 - *SRY-box Transcription Factor 12*
 SOX17 - *SRY-box transcription factor 17*
 SPRED1 - *Sprouty Related EVH1*
 TAK1 - *transforming growth factor β -activated kinase 1*
 TBE - *Tris/Borate/EDTA*
 TCGA - *The Cancer Genome Atlas*
 TGF- β - *Transforming Growth Factor Beta*
 TMB - *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*
 TNRC6A–TNRC6C - *Trinucleotide Repeat-containing gene 6A–6C*
 TRIS - *Tris(hydroxymethyl) aminomethane*
 TSC2 - *Tuberous Sclerosis Complex 2*
 U6 snRNA - *U6 Small Nuclear RNA*
 UPF1 - *Up-frameshift Protein 1*
 VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*
 VHL - *Von Hippel-Lindau*
 WHO - *World Health Organization*
 XPO5 - *Exportin 5*
 XRN1 - *5'-3' Exoribonuclease 1*
 ZEB1 - *Zinc finger E-box binding homeobox 1*
 Г – Градус
 ЕКЕ - Ендометриодни карцином ендометријума
 иРНК - информациона РНК
 КЕ - Карцином ендометријума
 КЕАТ - Агресиван тип карцинома ендометријума
 КЕНТ - Неагресиван тип карцинома ендометријума
 КСЕ - Карциносарком ендометријума
 МКЕ - Мешовити тип карцинома ендометријума
 НДКЕ - Недиференциран карцином ендометријума
 СКЕ - Серозни карцином ендометријума
 СЋКЕ - Светло-ћелијски карцином ендометријума

БИБИОГРАФИЈА

Стефан З. Благојевић рођен је 05.08.1993. године, у Крагујевцу. Основну школу „Мирко Јовановић“ завршио је 2008. године у Крагујевцу. Средњу школу „Друга крагујевачка гимназија“ завршио је 2012. године. Исте године уписао је основне академске студије биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу, које је завршио 2016. године са просечном оценом 9.54. Школске 2016. године уписао је мастер академске студије Биологија – Молекуларна биологија. Други семестар мастер студија реализовао је преко ERASMUS+ CREDIT MOBILITY програма на факултету за Биологију и Заштиту животне средине, Универзитета у Лођу (Пољска). Завршни рад под насловом „Статистичко груписање IC₅₀ вредности као показатеља цитотоксичности биоактивних супстанци на HCT-116 и SW-480 ћелијским линијама карцинома колона“, одбранио је са оценом 10 (29. септембра 2017.) и стекао академско звање Мастер биолог – молекуларни биолог са просечном оценом 9.89.

Прву годину докторских академских студија Биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2017/2018 године. У звању истраживач-приправник изабран је 06.06.2018. године, а у звање истраживач сарадник 16.06.2021. године. Од јуна 2018. до 2019. био је ангажован на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ (ПИБАС, бр. ИИИ41010). У оквиру научноистраживачког рада, Стефан Благојевић је овладао савременим техникама и методама ћелијске и молекуларне биологије и активно учествовао у експерименталним истраживањима. Током докторских академских студија фокусирао се на истраживања молекула иРНК, миРНК, протеина и полиморфизама у циљу дефинисања потенцијалних тумор маркера код карцинома.

Библиографски подаци

Током докторских студија, Стефан Благојевић је публикувао укупно 26 библиографске јединице: четири рада у међународним часописима (M21, M22 и M23), четири рада у националним часописима међународног значаја (M24), једну научну критику и полемику у истакнутом међународном часопису (M25), једно саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33), девет саопштења на међународном скупу штампана у изводу (M34) и седам саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу (M64). Референце под редним бројем 1, 9, 20 и 23 се односе на резултате публиковане из докторске дисертације.

Радови објављени у врхунском међународном часопису (M21):

1. **Blagojević, S.**, Andrić, B., Jovankić, J., Milutinović, M., Nikodijević, D., Arsenijević, P., Cvetković, D. (2023). MicroRNA expression as a diagnostic parameter in early endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 33(9), 1394-1401. ISSN: 1048-891X. IF₂₀₂₂: 4.8 DOI: 10.1136/ijgc-2023-004579
2. Novaković, S.B., Bogdanović G.A., Ratković, Z., **Blagojević S.**, Matić S.L.J., Muškinja J. (2024). Synthesis, structural properties and DNA protective activity of ferrocenyl N-acyl pyrazolines. *Applied Organometallic Chemistry*, 38(6), e7464. ISSN: 0268-2605. IF₂₀₂₂: 3.9 DOI: 10.1002/aoc.7464

Рад објављен у истакнутом међународном часопису (M₂₂):

3. Medjedović, M., Simović, A., Čočić, D., Milutinović, M., Senft, L., **Blagojević, S.**, Milivojević, N., Petrović, B.. (2020). Dinuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes: Mechanistic study with biomolecules, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *Polyhedron*, 178, 114334.
ISSN: 0277-5387. IF₂₀₂₀: 3.052
DOI: 10.1016/j.poly.2019.114334

Рад објављен у међународном часопису (M₂₃):

4. Andrić, B., Cvetković, D., Blagojević, S., Stanković M., Kokošar, N., Sretenović, D., Šljivančanin, D., Milošević, B., Milošev, D., Arsenijević P. (2023). Expression analysis of COPB2 and Bcl-2 in early stages of endometrial carcinoma. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 50(12), 254.
ISSN: 0390-6663. IF₂₀₂₃: 0.2
DOI: 10.31083/j.ceog5012254

Радови објављени у националним часописима међународног значаја (M₂₄):

5. Jovankić, J.V., Nikodijević, D.D., **Blagojević, S.Z.**, Radenković, N.M., Jakovljević, D.Z., Grbović, F.J., Cvetković, D.M. (2022). The biological activity of *Ocimum minimum* L. flowers on redox status parameters in HCT-116 colorectal carcinoma cells. *Kragujevac Journal of Science*, 44, 155–168.
ISSN: 1450-9636
UDC 57.083.36:616.34-006:582.943.11
DOI: 10.5937/KgJSci2244155J
6. Arsenijević, D.D., **Blagojević, S.Z.**, Planojević, N.S., Nikezić, A.G., Vidanović, D.S., Milosavljević, N., Marković, S.D. (2021). DNA-based molecular identification of *Urnula mediterranea* (Ascomycota, Pezizales) collected in central Serbia. *Kragujevac Journal of Science*, 43, 53-62.
ISSN: 1450-9636
UDC 577.21:582.282:(497.11)
DOI: 10.5937/KgJSci2143053A
7. **Blagojević, S.Z.**, Cvjetković, V.M., Nikezić, A.G., Milutinović, M.G., Marković, S.D. (2020). Bioinformatics online support for bioactive substances cytotoxicity testing and their statistical analysis. *Kragujevac Journal of Science*, 42, 55-72.
ISSN: 1450-9636
UDC 004.658.2:577.1/.2
DOI: 10.5937/KgJSci2042055B
8. Nikezić, A.G., **Blagojević, S.Z.**, Ćupurdija, M.Đ., Planojević, N.S., Jovankić, J.V., Rakobradović, J.D., Vidanović, D.S., Arsenijević, D.D., Marković, S.D. (2020). Comparative analysis of human DNA extraction methods and mitochondrial DNA HV1 and HV2 haplogroup determination. *Kragujevac Journal of Science*, 42, 73-83.
ISSN: 1450-9636

Научна критика и полемика у истакнутом међународном часопису (M₂₅):

9. **Blagojević, S.**, Milutinović, M., Cvetković, D. (2024). Response to: Correspondence on 'MicroRNA expression as a diagnostic parameter in early endometrial cancer' by Coad et al. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 34, 177.
ISSN: 1048-891X. IF₂₀₂₂: 4.8
DOI: 10.1136/ijgc-2023-005179

Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M₃₃):

10. Muškinja, J., Ratković, Z., Milutinović, M., **Blagojević, S.**, Novaković, S.B., Bogdanović, G.A., Matić S. *In vitro* DNA protective potential of selected ferrocenyl N-acyl pyrazolines, in Proceedings of the 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30.11.2023. MDPI: Basel, Switzerland.
DOI: 10.3390/ECMC2023-15643

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M₃₄):

11. Radenković, N., Nikodijević, D., Jovankić, J., **Blagojević, S.**, Nikezić, A., Ristanović, F., Milutinović, M. Mechanisms of resistance development to 5-fluorouracil in HT-29 colorectal cancer cells. 3rd International Conference „Conference on Advances in Science and Technology” COAST 2024, Herceg Novi, Montenegro. 29.05-01.06.2024. pp.76.
ISBN: 978-9940-611-07-1
12. Radenković, N., Milutinović, M., Nikodijević, D., Jovankić, J., **Blagojević, S.**, Jurišić, V., Predojević, D., Vukajlović, F., Pešić, S. Silk of Indian meal moth induces apoptosis of SW-480 colorectal cancer cells. Serbian Biochemical Society Twelfth Conference „Biochemistry in Biotechnology”, Belgrade, Serbia. 21-23.09.2023, pp. 135.
ISBN: 978-86-7220-140-6 (FOC)
13. **Blagojević, S.**, Planojević, N., Nikezić, A., Milutinović, M., Jovankić, J., Arsenijević, D., Radisavljević, S., Međedović, M., Petrović, B., Arsenijević, P., Jović, N., Mujković, S., Marković, S. Impact of gold(III) and ruthenium(II) complexes on miRNA expression involved in metastasis on primary ovarian cell culture isolated from ascites. 10th Conference of Serbian Biochemical Society “Biochemical Insights into Molecular Mechanisms”, Kragujevac, Serbia, 24.09.2021, pp. 52.
ISBN 978-86-7220-108-6 (FOC)
14. Nikezić, A., Jovankić, J., Nikodijević, D., Milutinović, M., **Blagojević, S.**, Planojević, N., Grbović, F., Marković, S. Anticancer potential of *Alchemilla vulgaris* L. on triple negative breast cancer cell lines. 10th Conference of Serbian Biochemical Society “Biochemical Insights into Molecular Mechanisms”, Kragujevac, Serbia, 24.09.2021, pp. 110.
ISBN 978-86-7220-108-6 (FOC)

15. Planojević, N., **Blagojević, S.**, Nikezić, A., Milutinović, M., Jovankić, J., Radenković, N., Radisavljević, S., Međedović, M., Petrović, B., Arsenijević, P., Jović, N., Mujković, S., Marković, S. The influence of newly synthesized Au(III) and Ru(II) complexes on gene expression on primary ovarian cancer cell culture from ascites. 10th Conference of Serbian Biochemical Society "Biochemical Insights into Molecular Mechanisms", Kragujevac, Serbia, 24.09.2021, pp.128.
ISBN 978-86-7220-108-6 (FOC)
16. Nikezić, A., **Blagojević, S.**, Planojević, N., Čupurdija, M., Jovankić, J., Cvetković, D., Veličković, T., Simić, V., Marković, S.D. Comparative analysis of DNA extraction methods from human buccal swabs and fish tissue samples. 9th Conference of Serbian Biochemical Society "Diversity of Biochemistry". Belgrade, Serbia 14-16. 10. 2019, pp. 140.
ISBN: 987-86-7220-101-7
17. Čupurdija, M., Planojević, N., **Blagojević, S.**, Nikezić, A., Jovankić, J., Milutinović, M., Lazović, M., Grbović, F., Marković, S.D. Comparative study of different DNA isolation methods from plants and fungus. 9th Conference of Serbian Biochemical Society "Diversity of Biochemistry", Belgrade, Serbia, 14-16.10.2019, pp. 83.
ISBN: 987-86-7220-101-7
18. **Blagojević, S.**, Milutinović, M., Milivojević, N., Živanović, M., Marković, S. Cytotoxic and proapoptotic effects of extracts from *Vitis vinifera* L. petiole on colon cancer cell lines. 8th Conference of Serbian Biochemical Society "Coordination in Biochemistry and Life", Novi Sad, Serbia, 16.10.2018, pp. 117.
ISBN: 978-86-7220-096-6
19. **Blagojević, S.Z.**, Furtula, B., Nikezić, A.G., Milutinović, M.G., Živanović, M.N., Marković, S.D. Statistical clustering of IC50 values as indicators of cytotoxicity of bioactive substances on HCT-116 and SW-480 cell line on colon cancer. 7th Conference of Serbian Biochemical Society "Biochemistry of Control in Life and Technology", Belgrade, Serbia, 10.10.2017, pp. 129.
ISBN: 978-86-7220-091-1

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64):

20. **Blagojević, S.**, Jovankić, J., Andrić, B., Milutinović, M., Nikodijević, D., Milojević, S., Radenković, N., Arsenijević, P., Cvetković, D. MIR200A and MIR210 as potential markers in detection of endometrial adenocarcinomas. CoMBoS2 - 2nd Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Serbia. 06-08.10.2023, pp. 54.
ISBN: 978-86-7078-173-3
21. Radenković, N., Nikodijević, D., Jovankić, J., **Blagojević, S.**, Milutinović, M. Isorhamnetin - Antitumor potential and impact on drug resistance in colorectal carcinoma cell lines. CoMBoS2 - 2nd Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Serbia. 06-08.10.2023, pp. 145.
ISBN 978-86-7078-173-3
22. Jovankić, J., Nikodijević, D., Milutinović, M., **Blagojević, S.**, Radenković, N., Cvetković, D. Imbalance in redox homeostasis induced by Orlistat in breast cancer cells.

CoMBoS2 - 2nd Congress of Molecular Biologists of Serbia, Belgrade, Serbia. 06-08.10.2023, pp. 150.
ISBN 978-86-7078-173-3

23. **Blagojević, S.**, Jovankić, J., Andrić, B., Milutinović, M., Nikodijević, D., Milojević, S., Radenković, N., Arsenijević, P., Cvetković, D. Dijagnostički značaj mikroRNK-126 u ranom stadijumu adenokarcinoma endometrija. Prva konferencija Srpskog biološkog društva „Stevan Jakovljević”, Kragujevac, Srbija 20-22.09.2023, pp.102.
ISBN 978-86-905643-4-7
24. Jovankić, J., Milutinović, M., **Blagojević, S.**, Nikodijević, D., Radenković, N., Cvetković, D. Efekat *Ocimum minimum* L. na koncentraciju lipida u MDA-MB-468 ćelijama karcinoma dojke. Prva konferencija Srpskog biološkog društva „Stevan Jakovljević”, Kragujevac, Srbija 20-22.09.2023, pp.103.
ISBN 978-86-905643-4-7
25. Jovankić, J.V., Nikodijević, D.D., Milutinović, M.G., Nikezić, A.G., Planojević, N.P., **Blagojević, S.Z.**, Cvetković, D.M. Anti-obesity drug Orlistat (Xenical®) induces antiangiogenic potential in breast cancer cell lines. The 5th Congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation „Translational potential of cancer research in Serbia“, Virtual event, Belgrade, Serbia, 03.12.2021, pp. 53.
ISBN: 987-86-919183-3-0
26. Nikodijević, D., Jovankić, J., Cvetković, D., Nikezić, A., **Blagojević, S.**, Planojević, N., Milutinović, M. Bee venom and melittin induce apoptosis in colon cancer cell lines by Caspase 8 activation. The 5th Congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation „Translational potential of cancer research in Serbia“, Virtual event, Belgrade, Serbia, 03.12.2021, pp. 75.
ISBN 978-86-919183-3-0

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

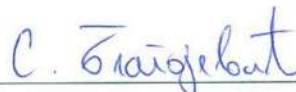
**„Експресија микроРНК и њихових регулаторних гена као дијагностички
параметар у раном стадијуму карцинома ендометријума“**

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине* других лица,

У Крагујевцу, 14.06.2024. године,


потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Експресија микроРНК и њихових регулаторних гена као дијагностички
параметар у раном стадијуму карцинома ендометријума“**

истоветне.

У Крагујевцу, 14.06.2024. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Стефан З. Благојевић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

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

„Експресија микроРНК и њихових регулаторних гена као дијагностички параметар у раном стадијуму карцинома ендометријума“

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

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- ⑤ Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 18.06.2024. године,

С. Биљојевић
потпис аутора

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