

Univerzitet u Beogradu

Medicinski fakultet

Milan N. Radovanović

ISPITIVANJE BIOHEMIJSKIH I PATOHISTOLOŠKIH MARKERA ZNAČAJNIH
ZA PROGNOZU KARCINOMA BUBREŽNIH ĆELIJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

University of Belgrade
School of Medicine

Milan N. Radovanović

EXAMINATION OF BIOCHEMICAL AND PATHOHISTOLOGICAL MARKERS
IMPORTANT FOR THE PROGNOSIS OF RENAL CELL CARCINOMA

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Mentori:

Prof. dr Zoran Džamić, redovni profesor, Klinika za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Sanja Radojević Škodrić, redovni profesor, Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Aleksandra Isaković, redovni profesor, Institut za medicinsku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Tatjana Pekmezović, redovni profesor, Institut za epidemiologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Vladimir Bančević, vanredni profesor, Klinika za urologiju Vojnomedicinske akademije, Medicinski fakultet Univerziteta odbrane u Beogradu

Zahvaljujem

Zahvaljujem se svojim mentorima, Prof. dr Zoranu Džamiću i Prof. dr Sanji Radojević Škodrić, što su bili uz mene u svakom trenutku tokom ovog dugog, skoro desetogodišnjeg istraživanja. Najpre su me sa mnogo strpljenja uveli u naučno-istraživački rad, a zatim bili tu da pomognu i daju savet svaki put kada bih naišao na prepreku. Bez njihovog usmeravanja, podrške, i pomoći, ne bih stigao do cilja. Posebnu zahvalnost dugujem Prof. Dr Aleksandru Vuksanoviću bez čije pomoći i angažovanja istraživanje koje sam osmislio ne bi moglo da bude realizovano. Veliku zahvalnost dugujem celokupnom kolektivu Klinike za urologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije, kao i pacijentima ove klinike koji su učestvovali u istraživanju. Podrška koju su mi pružale drage kolege lekari, medicinski tehničari i sestre, te nemedicinsko osoblje, bila je značajna da istrajem i završim doktorsku disertaciju. Veliki deo ovog istraživanja sproveden je na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pa posebnu zahvalnost dugujem svojoj nekada asistentkinji, pa Profesorki a danas velikom prijatelju i najvećoj podršci u izradi ovog rada Prof. Dr Aleksandri Isaković, kao i ostalim divnim saradnicima i laborantima na nesebičnoj pomoći i zalaganju. Prof. Dr Vladimiru Trajkoviću veliki naklon i još veća zahvalnost što je prihvatio da učestvuje i svojim angažmanom doprinese da ovo istraživanje dobije pravu formu i zaključke.

Kažu da je uspeh čoveka nesumnjivo zasluga njegovih najbližih koji svojim često neprimetnim a ipak svakodnevnim trudom, strpljenjem i ljubavlju daju snagu da isrtaje u svemu sto želi. Ovu doktorsku disertaciju koja je svakako najznačajnije dostignuće u mojoj dosadašnjoj profesionalnoj karijeri zato posvećujem prvenstveno svojim roditeljima Anici i Nebojši jer su svih ovih godina bili bas to, moji neprimetni andjeli čuvari, podrška, motivacija i neizmerni izvor ljubavi. Veliko hvala mom mladjem bratu Nikoli koji je svakako moj veliki uzor i stariji brat u naučno-istraživačkom radu. Nadam se da će jednoga dana ovaj doktorat biti podstrek i mojim sinovima da budu bolji, vredniji i uspešniji ljudi a njihov osmeh je svakako nesto što danas mene tera da budem bolji čovek.

Za kraj hvala svim mojim prijateljima, ujaku, kumovima koji svakodnevno moj život čine sadržajnijim i koji me deleći svoje vreme i razmišljanja sa mnom čine boljim i mudrijim čovekom, daju snagu i motiv da sve što započnem i završim a nikada ne dozvole da pokleknem i predam se ma koliko izazovi bili veliki.

Naslov doktorske disertacije : ISPITIVANJE BIOHEMIJSKIH I PATOHISTOLOŠKIH MARKERA ZNAČAJNIH ZA PROGNOZU KARCINOMA BUBREŽNIH ČELIJA

Sažetak:

Karcinom bubrežnih ćelija (RCC) je najčešći maligni tumor bubrega kod odraslih. Javlja se u 85%-90% svih malignih tumora bubrega kod odraslih. Najveća incidencija karcinoma bubrega se beleži kod ljudi između 60-70 godine starosti, češće kod muškaraca (1,5:1), dok se u 7% slučajeva dijagnostikuje kod osoba mlađih od 40 godina. Prema Vankuverskoj klasifikaciji iz 2004 postoje tri glavna histološka podtipa karcinoma bubrežnih ćelija i to: svetloćelijski tip RCC (engl. clear cell RCC - ccRCC), papilarni tip RCC (engl. papillary RCC - pRCC) i hromofobni RCC (engl. chromophobe RCC - chRCC) pri čemu je najčešći tip ccRCC (70-85% svih RCC).

Veliki problem u terapijskom pristupu RCC jeste njegova rezistencija na hemioterapiju. Imajući u vidu da je angiogeneza ključan faktor koji doprinosi napredovanju svih tumora pa i RCC, kao i da apoptoza i autofagija mogu doprineti hemorezistenciji RCC smatrali smo značajnim upravo ispitivanje patohistoloških i biomolekulanih faktora kao potencijalnih markera RCC i prognostičkih faktora u odnosu na tok bolesti i njen ishod. Takođe, ispitivanjem angiogeneze, apoptoze i autofagije u različitim tipovima karcinoma bubrega bi se mogao poboljšati terapijski pristup, a samim tim i prognoza pacijenata obolelih od karcinoma bubrega, naročito onih sa metastatskom bolešću.

U okviru ovog istraživanja su izvedene dve studije na istom uzorku. Uzorak su činili pacijenti sa postavljenom dijagnozom RCC (90 pacijenata) i pacijenti sa ccRCC (30 pacijenata) koji su hirurški lečeni na Klinici za Urologiju Kliničkog Centra Srbije. Jedna studija je obuhvatila patohistološko ispitivanje ekspresije p53, VEGF, survivina i beta katenina u različitim podtipovima RCC (90 pacijenata) i njihovu međusobnu korelaciju kao i njihovu korelaciju sa stadijumom, gradusom i ishodom bolesti. Za potrebe ovog dela istraživanja je primenjena imunohistohemijska metoda primenom metode tkivnog mikroniza (engl. tissue microarray - TMA). Druga studija je obuhvatila ispitivanje ekspresije gena i proteina uključenih u kontrolu procesa apoptoze i autofagije u ccRCC kao najčešćem tipu RCC (30 pacijenata). Za potrebe ovog segmenta istraživanja primenjene su RT-qPCR metoda i imunoblot analiza.

Dobijeni rezultati su pokazali da je u tkivu RCC prisutna ekspresija p53, VEGF, survivina i beta katenina i da ekspresija ovih proliferativnih markera korelira pozitivno sa stadijumom i gradusom bolesti (izuzev beta katenina koji je pokazao negativnu korelaciju). Takođe je pokazano da između analiziranih markera nema međusobne korelacije. Istovremeno, ekspresija p53, VEGF i survivina pokazuje negativnu korelaciju sa dužim preživljavanjem dok ekspresija beta katenina pokazuje pozitivnu korelaciju. U tkivu ccRCC pokazana je povećana ekspresija iRNK za p21, p27, p53 tumorsupresor gene, Bax i Bad antiapoptotskih gena dok je ekspresija tumor supresora PTEN bila viša u peritumorskom tkivu. Ekspresija iRNK za markere autofagije p62, Atg4 i Uvrag je bila viša u tumorskom tkivu ccRCC. Analizom ekspresije proteina uključenih u inicijaciju i kontrolu apoptoze i autofagije je pokazano da je transkripciona indukcija autofagije kod ccRCC udružena sa

AMPK/mTORC1- nezavisnom ULK1 aktivacijom i povećanjem autofagnog fluksa ali ne i apoptozom. Pti tome je zaključeno da su indukcija autofagije i povišeni autofagni fluks, ali ne i apoptoza, udruženi su sa nižim stadijumom bolesti, veličinom tumora i metastatskim potencijalom kao i dužim preživljavanjem pacijenata sa ccRCC.

Kako u najnoviju klasifikaciju RCC nije uključen niti jedan od analiziranih proliferativnih markera, i markera apoptoze i autofagije, uzimajući u obzir dobijene rezultate koji su nedvosmisleno pokazali korelaciju njihove ekspresije sa stadijumom, gradusom i dužinom preživljavanja ali i ograničenje ove studije zbog relativno malog broja uzoraka, neophodna su dalja israživanja u cilju uvođenja nekog od analiziranih parametara kao prognostičkog markera u kliničku praksu.

Ključne reči: RCC, apoptoza, autofagija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Epidemiologija

UDK broj:

Title of doctoral dissertation: EXAMINATION OF BIOCHEMICAL AND PATHOHISTOLOGICAL MARKERS IMPORTANT FOR THE PROGNOSIS OF RENAL CELL CARCINOMA

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common malignant kidney tumor in adults. It occurs in 85% -90% of all malignant kidney tumors. The highest incidence of kidney cancer is recorded in people between 60-70 years of age, more often in men (1.5: 1), while in 7% of cases it is diagnosed in people younger than 40 years. According to the 2004 Vancouver classification, there are three main histological subtypes of renal cell carcinoma: clear cell type RCC (ccRCC), papillary type RCC (papillary RCC) and chromophobic RCC (chRCC).). The most common type is ccRCC which makes 70-85% of all RCCs.

A major problem with the RCC's therapeutic approach is its resistance to chemotherapy. Given that angiogenesis is a key factor which contributes to the progression of all tumors, including RCC, and that apoptosis and autophagy may contribute to RCC chemoresistance, we considered as an important goal of this study to examine pathohistological and biomolecular factors as potential markers of RCC and prognostic factors in relation to the course and outcome of the disease. Also, the examination of angiogenesis, apoptosis and autophagy in different types of kidney cancer could improve the therapeutic approach, and thus the prognosis of patients with kidney cancer, especially those with metastatic disease.

Within this research, two studies were performed on the same sample. The sample included the patients diagnosed with RCC (90 patients) and patients with ccRCC (30 patients) who were surgically treated at the Clinic of Urology of the Clinical Center of Serbia. One study included pathohistological examination of p53, VEGF, survivin, and beta catenin expression in different RCC subtypes and their correlation as well as their correlation with the stage, grade, and disease outcome (90 patients). In this part of the research, the immunohistochemical analysis including the tissue microarray (TMA) method was performed. The other study included apoptosis and autophagy related genes and proteins in the ccRCC as the most common type of RCC (30 patients). In this segment of the research RT-qPCR method and immunoblot analysis were used.

The obtained results demonstrate that the expression of p53, VEGF, survivin and beta catenin is present in RCC tissue and that the expression of these proliferative markers correlates positively with the stage and degree of the disease (except beta catenin which showed a negative correlation). No correlation was found between the analyzed markers. At the same time, the expression of p53, VEGF and survivin shows a negative correlation with longer survival while the expression of beta catenin shows a positive correlation. In ccRCC tissue, increased mRNA expression was shown for p21, p27, p53 tumor suppressor genes, Bax and Bad antiapoptotic genes while PTEN tumor suppressor expression was higher in peritumoral tissue. mRNA expression for autophagy markers p62, Atg4, and Uvrag was higher in ccRCC tumor tissue. Analysis of the expression of proteins involved in the initiation and control of apoptosis and

autophagy revealed that transcriptional induction of autophagy in ccRCC is associated with AMPK / mTORC1-independent ULK1 activation and increased autophagic flux but not apoptosis. Therefore, it was concluded that the induction of autophagy and increased autophagic flux, but not apoptosis, are associated with lower disease stage, tumor size and metastatic potential as well as longer survival of patients with ccRCC.

Taking into account that none of the analyzed proliferative, apoptotic and autophagic markers, is included in the latest RCC classification, and that the expression of investigated markers correlate with the stage, degree and length of survival, further research is needed in order to introduce some of the analyzed parameters as a prognostic marker in clinical practice.

Keywords: RCC, apoptosis, autophagy

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Epidemiology

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija.....	1
1.2. Etiologija i faktori rizika.....	1
1.2.1. Pušenje.....	2
1.2.2. Gojaznost	2
1.2.3. Hipertenzija.....	2
1.2.4. Ishrana.....	2
1.2.5. Profesija	3
1.3. Patohistologija i citogenetika tumora bubrežnog parenhima	3
1.3.1. Svetloćelijski karcinom (Clear cell type RCC)	4
1.3.2. Papilarni karcinom	4
1.3.3. Hromofobni karcinom.....	5
1.3.4. Multilokularni cistični karcinom.....	6
1.3.5. Duktalni karcinom – karcinom sabirnih kanalića	6
1.3.6. Neklasifikovani karcinomi bubrega.....	7
1.4. Simptomi i dijagnostika karcinoma bubrežnih ćelija	7
1.4.1. Simptomatologija i klinička slika	7
1.4.2. Dijagnostika tumora bubrežnog parenhima	7
1.4.2.1. Ehosonografija	8
1.4.2.2. Kompjuterizovana tomografija (CT).....	8
1.4.2.3. Nuklearna magnetna rezonanca /NMR/	9
1.4.2.4. Biopsija renalnih masa	9
1.5. Stadijumi razvoja, tok i prognoza bolesti.....	10
1.5.1. Stadijumi razvoja tumora bubrežnog parenhima	10
1.5.2. Tok i prognoza bolesti.....	12
1.5.2.1. Patoanatomski faktori.....	12
1.5.2.2. Patohistološki faktori	12
1.5.2.3. Biomolekularni faktori	13
1.5.2.3.1. Apoptoza i RCC.....	13
1.5.2.3.2. Autofagija i RCC.....	15
1.5.2.3.3. Signalni putevi autofagije u RCC	16

1.5.2.3.4. Angiogeneza i RCC.....	18
1.5.2.4. Faktori vezani za pacijenta.....	19
1.6. Terapija karcinoma bubrežnih ćelija	20
1.6.1. Lečenje lokalizovanog (nemetastaskog) karcinoma bubrežnih ćelija.....	20
1.6.2. Lečenje metastatskog karcinoma bubrežnih ćelija	21
2. CILJEVI RADA.....	23
3. MATERIJAL I METODE.....	24
3.1. Ispitivana populacija	24
3.2. Imunohemijska analiza	25
3.3. Određivanje nivoa ekspresije iRNK	25
3.3.1. RNK izolacija	25
3.3.2. Reverzna transkripcija.....	26
3.3.3. RT-qPCR analiza ekspresije gena uključenih u kontrolu apoptoze i autofagije	26
3.3.4. Immunoblot analiza ekspresije proteina uključenih u kontrolu autofagije	27
3.4. Statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI	29
4.1. Ispitivanje ekspresije patohistoloških markera RCC	29
4.2. Preživljavanje	36
4.3. Ispitivanje molekularnih markera apoptoze i autofagije u ccRCC	42
4.4. Ekspresija gena za apoptozu i autofagiju kod ccRCC-a	43
4.5. Aktivacioni status autofagije, apoptoze i AMPK/mTORC1 puta u ccRCC.....	45
4.6. Povezanost regulatora apoptoze i autofagije sa kliničkopatološkim karakteristikama ccRCC.....	47
5. DISKUSIJA	50
6. ZAKLJUČCI.....	62
7. LITERATURA.....	63

1. UVOD

Medicina se svakodnevno menja, ove promene se prvenstveno baziraju na multidisciplinarnom pristupu kako u dijagnostici tako i lečenju, a u cilju pronalaženja što boljih terapijskih mogućnosti za svakog pojedinačnog pacijenta. Na polju urologije promene su naročito izražene u sferi urološke onkologije, pa je lečenje karcinoma bubrega, prvenstveno metastatskih, u poslednjoj deceniji doživelo veliki napredak.

1.1. Epidemiologija

Karcinom bubrežnih ćelija (engl, renal cell carcinoma, RCC) čini oko 3% svih dijagnostikovanih karcinoma, uz najvišu incidenciju u zemljama zapadnog sveta (1,2). Najvišu stopu oboljevanja danas u Evropi imaju Češka Republika i Litvanija (2). Do skora je postojao trend porasta incidencije od oko 2% na godišnjem nivou širom sveta. Tako je u Evropskoj uniji 2018. godine registrovano oko 99 200 novih slučajeva RCC uz oko 39 100 smrtnih ishoda zbog ove bolesti (1,2). Poslednjih godina stopa smrtnosti u Evropi je u blagom padu ali u nekim zemljama kao što su Hrvatska, Estonija i Grčka još uvek postoji uzlazni trend (1,2).

Karcinom bubrežnih ćelija je svakako najčešća solidna maligna lezija bubrega i čini praktično 90% svih bubrežnih maligniteta. Obuhvata različite podtipove RCC koje karakterišu zasebne kako histopatološke tako i genetske osobenosti (3). Javljanje ovog karcinoma češće je u muškoj u odnosu na žensku populaciju u približnom odnosu 3:2. Najčešće se dijagnostikuje u uzrastu između 60. i 70. godine starosti, dok svega 7% obolelih predstavljaju osobe mlađe od 40 godina (2,4).

Učestalost javljanja karcinoma bubrežnog parenhima izražena je u Evropi, Sjedinjenim Američkim Državama i Kanadi, a značajno je niža u zemljama Južne Amerike i ostatku južne hemisfere. Takođe je pokazano da viši životni standard pozitivno korelira sa povećanim rizikom od nastanka karcinoma bubrega (8,11).

1.2. Etiologija i faktori rizika

Iako su do sada izvedena brojna epidemiološka i klinička ispitivanja, tačan uzrok nastanka tumora bubrežnog parenhima još nije jasno definisan. Kao potencijalni faktor rizika navode se različiti parametri, a najznačajniji među njima su: životne navike kao što su pušenje, hipertenzija i gojaznost, postojanje šećerne bolesti, nedovoljna fizička aktivnost, kao i profesionalna izloženost azbestu, olovu, kadmijumu, herbicidima, benzenu itd. Zapaženo je da se RCC javlja u 1-3% pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom koji su na dijalizi kao i u oko 1% pacijenata sa adultnom policističnom bolešću bubrega (5,6,7). Posebna pažnja u istraživanjima poklanja se genetskim faktorima. Najveći broj slučajeva je sporadičan, ali se retko (manje od 4% tumora bubrega) mogu javiti i tumori povezani sa nekim familijarnim sindromima (8) kao što su: von Hippel-Lindau (VHL) sindrom, tuberozna skleroza (TSC), Birth-Hogg-Dube (BHD) sindrom, nasledni papilarni karcinom bubrega, nasledna leiomiomatoza povezana sa karcinomom

bubrežnih ćelija. Karcinomi bubrega povezani sa naslednim bolestima češće su obostrani i multicentrični, a javljaju se u ranijoj životnoj dobi (8,9,10).

1.2.1. Pušenje

Među vodeće faktore rizika za nastanak karcinoma bubrega tradicionalno se ubraja pušenje cigareta. Medjunarodna agencija za istraživanje karcinoma (International Agency for Research on Cancer-IRAC) i Organizacija opštih hirurga Amerike (U.S. Surgeon General) zaključili su još 2004. godine da postoji dovoljno dokaza o povezanosti pušenja i razvoja RCC-a, uzimajući u obzir karcinogene efekte brojnih sastojaka duvana (12).

Povezanost RCC-a i pušenja je jasno utvrđena, iako su procenjeni rizici za nepušače u poredjenju sa pušačima umerenih vrednosti. Sprovedene meta analize na 19 studija slučajeva i kontrola i 5 kohortnih studija pokazale su da pušenje dovodi do ne tako velikog, ali ipak značajnog povećanja rizika za nastanak RCC (RR=1.38 (95%CI: 1.27-1.50)) kod oba pola (13).

1.2.2. Gojaznost

Bergstrom i saradnici su ispitivali odnos povećane prevalencije gojaznosti i povećane incidencije karcinoma bubrežnih ćelija i došli do zaključka da se preko 30% slučajeva RCC u Evropi i čak preko 40% slučajeva RCC uopšte može pripisati povišenoj telesnoj težini ili patološkoj gojaznosti (14,15). Renehan i saradnici u svojoj meta analizi većeg broja istraživanja o povezanosti bubrežnog karcinoma i gojaznosti utvrdili su da porast indeksa telesne težine (body mass index-BMI) za 5kg/m², povećava relativni rizik za nastanak RCC kod muškaraca za 1,24 a kod žena 1,34 puta (16). Studija koju su sprovedeli Ketrin Kalahan i saradnici 2018. godine bavila se procenom uticaja gojaznosti na razvoj pojedinih podtipova RCC-a i pokazala je da postoji povezanost u slučaju svetloćelijskog podtipa RCC, nešto manje značajna povezanost kod hromofobnog podtipa, dok u slučaju papilarnog podtipa povezanost nije dokazana (17).

1.2.3. Hipertenzija

Osobe sa karcinomima bubrega često razvijaju i hipertenziju kao jedan od pridruženih znakova bolesti, međutim u poslednje vreme sve je više ispitivanja koja ističu da i sama hipertenzija predstavlja faktor rizika za nastanak karcinoma bubrežnog parenhima. Istraživanje sprovedeno u Švedskoj među muškarcima kod kojih je redovno praćena vrednost krvnog pritiska pokazalo je da je u grupi onih kod kojih je pritisak varirao u pravcu hipertenzije postojao veći rizik za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija, a da je efikasna kontrola krvnog pritiska snižavala rizik od obolevanja (18). Studija Weikerta i saradnika iz 2008. godine ukazala je da hipertenzija predstavlja nezavistan prognostički factor za nastanak RCC-a u odnosu na gojaznost i pušenje ali i da udruženost hipertenzije i gojaznosti svakako povećava rizik za nastanak bolesti. (18,19)

1.2.4. Ishrana

Geografske varijacije u incidenciji i mortalitetu pacijenata sa RCC upućuju na ulogu životnog okruženja i navika u nastanku karcinoma bubrežnih ćelija. To je podstaklo i interesovanje za uticaj načina ishrane u nastanku ovih tumora. Veći broj studija ispitivao je uticaj zapadnog načina

ishrane, prvenstveno konzumiranje crvenog i obrađenog mesa na porast rizika za pojavu RCC. Iako je više manjih studija ukazalo da veza postoji, ona ipak nije potvrđena većim kohortnim studijama. (20,21). Meta analiza Lee-a i saradnika utvrdila je jasnu povezanost ishrane bogate voćem i povrćem i smanjenog rizika za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija (22).

1.2.5. Profesija

Različita istraživanja sprovedena prethodnih godina ukazala su na povezanost pojedinih profesija i povišene stope javljanja karcinoma bubrežnih ćelija. Prevedno se to odnosi na radnike zaposlene u petrohemijskoj industriji, proizvodnji kože, a posebno u grupi radnika izloženih derivatima azbesta i kadmijuma (23,24). Ispitivanje Kelsh-a i saradnika iz 2010. godine pokazalo je da je izloženost radnika u industriji prerade metala, tri-hloretilenu (engl, Trichloroethylene, TCE) u značajnoj korelaciji sa razvojem karcinoma bubrega (25). Moore i saradnici su istakli jasnu povezanost izlaganja TCE-u i nastanka RCC-a prvenstveno kod osoba koje nose polimorfizam gena uključenih u glutathione S-transferase (GST) vezivanje i bioaktivaciju renal cysteine beta-lyase (CCBL1) (26).

1.3. Patohistologija i citogenetika tumora bubrežnog parenhima

Bubreg je epitelni organ čije poreklo nije ektodermalno nego mezodermalno. Tokom embriogeneze dešava se mezenhimalno-epitelijalna transformacija, što vodi u nastanak praktično celog tubularnog sistema bubrega izuzev sabirnih kanalića koji nastaju iz ureteričnog pupoljka od kojeg nastaje prelazni epitel. Tumori bubrežnog parenhima potiču od epitela tubula bubrega. U gotovo u 95% slučajeva su maligni, dok njih 5-7 % su benigne prirode. Sa druge strane tumori koji nastaju u sabirnim kanalićima primarno pripadaju tranziciocelularnim karcinomima (TCC).

Međunarodno udruženje za urološku patologiju (The International Society of Urological Pathology – ISUP) je 2012. godine izvršilo modifikaciju Klasifikacije svetske zdravstvene organizacije (WHO classification) iz 2004. godine i tako je nastala Vankuverska klasifikacija koja se danas koristi za klasifikovanje karcinoma bubrežnih ćelija. Prema toj Klasifikaciji postoje tri glavna histološka podtipa karcinoma bubrežnih ćelija i to:

(1) svetloćelijski tip RCC (engl. clear cell RCC - ccRCC) - nastaje u proksimalnim izvijuganim tubulima i predstavlja najčešći podtip RCC-a kod odraslih čineći 70-85%,

(2) papilarni tip RCC (engl. papillary RCC - pRCC) – javlja se u dva podtipa, podtip I i podtip II, i čini 10-15% slučajeva RCC, od kojih se u 60-70% u pitanju podtipu I

(3) hromofobni RCC (engl. chromophobe RCC - chRCC) - čini samo oko 4-5% slučajeva RCC (27).

Postoje i karcinomi znatno manje učestalosti kakvi su karcinom Belinijevih sabirnih kanalića, papilarni adenom, Xp11.2 translokacijski bubrežni karcinom, multilokularni cistični svetloćelijski karcinom, renalni medularni karcinom, mucinozni tubularni karcinom vretenastih ćelija (27). Oko 2% svih karcinoma bubrežnih ćelija ne poseduju karakteristike nekog od prethodnih grupa

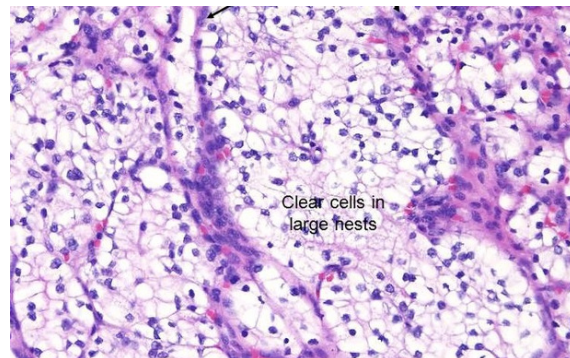
te se nazivaju neklasifikovanim tumorima bubrežnih ćelija (27). Ranijih godina sarkomatoidni RCC često je klasifikovan kao poseban podtip. Danas je opšteprihvaćeno mišljenje da svaki tip RCC-a osim predominantne forme može da ima i sarkomatoidnu komponentu, a to govori u prilog tumora visokog gradusa i lošije prognoze (28).

1.3.1. Svetloćelijski karcinom (Clear cell type RCC)

Karcinom svetlih ćelija je najčešći histološki tip karcinoma bubrežnih ćelija i čini oko tri četvrtine svih slučajeva. Regstruje se podjednako na oba bubrega, a bilateralnost se javlja u 0,5-3% slučajeva. U 4% slučajeva postoji multicentričan rast (29). Vodi poreklo od epitela proksimalnih tubula o čemu svedoče ultrastrukturne i imunohistohemijske osobine tumorskih ćelija. Makroskopski gledano ovaj tumora je zlatno-žute boje. Mogu postojati polja hemoragija, nekroze tumora, cistične degeneracije ili kalcifikacije (slika 1). Može biti ograničen fibroznom kapsulom. Može biti prisutna i sarkomatoidna komponenta (30). Kako naziv ovog tipa tumora kazuje tumorske ćelije imaju svetlu citoplazmu bogatu glikogenima i lipidima. Ćelijsko jedro je obično pravilno, okruglo (slika 2). Kod ovog tumora često se registruje mutacija von Hippel-Lindau (VHL) gena na hromozomu 3p25 i gubitak dela hromozoma 3p. Pokazano je da gubitak funkcije von Hippel-Lindau proteina korelira sa nastankom i progresijom tumora kao i pojavom metastaza (32). Prisustvo mikrovaskularne invazije je od značaja za prognozu kod tumora niskog stadijuma a pomaže i u proceni verovatnoće pojave recidiva nakon hirurške intervencije. Uopšte posmatrano svetloćelijski tip RCC ima lošiju prognozu no papilarnim i hromofobnim RCC, ali prognoza ipak prevashodno zavisi od stadijuma i gradusa bolesti.



Slika 1. Makroskopski izgled ccRCC
Preuzeto iz Robbins Basic Pathology 9th Edition



Slika 2. Mikroskopski izgled ccRCC
Preuzeto iz Robbins Basic Pathology 9th Edition

1.3.2. Papilarni karcinom

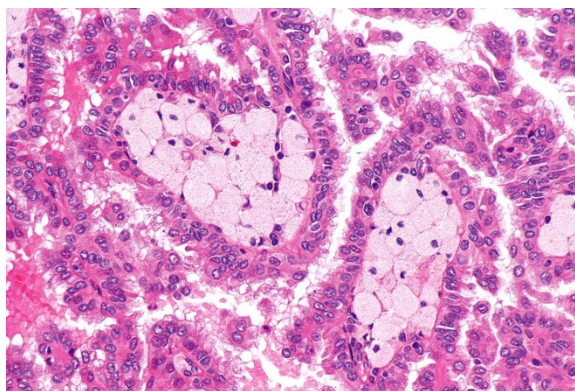
Papilarni tip karcinoma bubrežnih ćelija značajno je ređi no svetloćelijski tip i čini oko 10-15% svih RCC. Bilateralan je u oko 4% slučajeva. Kod njega se znatno češće javlja multifokalan rast no kod drugih tipova karcinoma bubrežnog parenhima, u čak 39% slučajeva (32). Makroskopski gledano ovaj tumor je čvrste konzistencije, na preseku tamne boje, dobro ograničen, neretko s

pseudokapsulom (slika 3). Prema histološkim karakteristikama razlikuju se dva podtipa papilarnog karcinoma – tip I i tip II, pri čemu je tip I oko dva puta češći. Kod tipa I papilarnog RCC postoji prekomerna ekspresija MET (mesenchymal epithelial transformation factor) proto onkogen, dok kod tipa II postoji inaktivacije fumarat hidrataze (FH) tumor supresorskog gena (33). Mikroskopski gledano papilarni tip I izgrađen je od malih ćelija sa pravilnim jedrom i oskudnom, svetlom citoplazmom, dok tip II karakterišu veće ćelije sa obilnom citoplazmom i uvećanim, eozinofilnim jedrom koje su obično višeg nuklearnog gradusa (slika 4). Pokazano je da su podtipovi papilarnog karcinoma u korelaciji malignim potencijalom tumora, pa time i sa prognozom bolesti. Papilarni karcinim tip II je značajno agresivniji no tip I. U oba podtipa tumora može biti prisutna sarkomatoidna komponenta u oko 5% slučajeva, što dodatno pogoršava prognozu bolesti (32). Najčešće gentske anomalije registrovane kod papilarnog RCC su gubitak Y hromozoma i trizomija hromozoma 7 i 17 (29).



Slika 3. Morfološki izgled papilarnog RCC

Preuzeto iz Robbins Basic Pathology 9th Edition

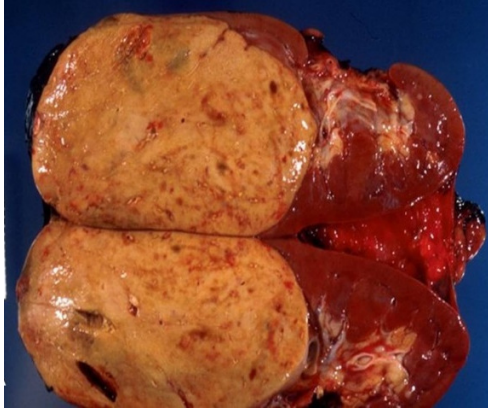


Slika 4. Mikroskopski izgled papilarnog RCC tip II

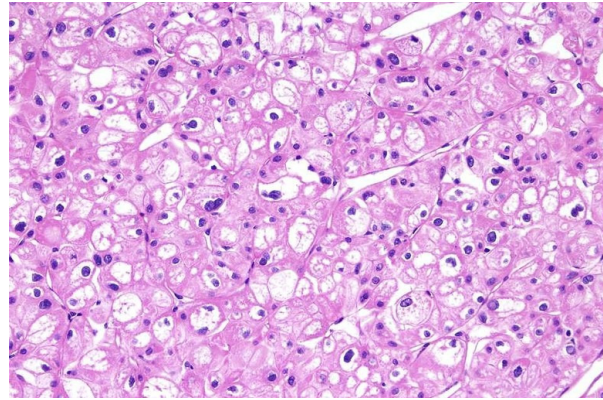
Preuzeto iz Robbins Basic Pathology 9th Edition

1.3.3. Hromofobni karcinom

Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija su Thones i saradnici opisali tek 1985, godine. Ovaj tumor čini oko 5% svih bubrežnih karcinoma. Na osnovu ultrastrukturnih i imunohistohemijskih karakteristika zaključeno je da ćelije hromofobnog karcinoma potiču od interkalatnih ćelija sabirnih kanalića korteksa (34). Makroskopski gledano ovaj tip tumora je obično dobro ograničen, lobularne površine, svetao na preseku, sa poljima hemoragija (slika 5). Mikroskopski, tumorske ćelije imaju hiperhromatično jedro sa svetlim haloomokolo i bledu citoplazmu sa brojnim invaginiranim vezikulama i depoima glikogena (slika 6) (29). Hromofobni RCC generalno ima ima dobru prognozu, izuzev kada je prisutna sarkomatoidna komponenta. Genetska ispitivanja su pokazala da kod oko 75% slučajeva sporadičnog hromofobnog karcinoma postoji neka od monozomija, najčešće monozomija hromozoma 1,2,6,10,13,17 ili 21, dok kod preostalih 25% sporadičnih formi ovog tumora obično postoji tačkasta mutacija p53 gena (34).



Slika 5. Makroskopski izgled chRCC
Preuzeto iz Robbins Basic Pathology 9th Edition



Slika 6. Mikroskopski izgled chRCC
Preuzeto iz Robbins Basic Pathology 9th Edition

1.3.4. Multilokularni cistični karcinom

Multilokularni cistični karcinom je dugo posmatran kao svetloćelijski RCC i tek je Klasifikacijom tumora bubrežnog parenhima svetske zdravstvene organizacije iz 2004. godine prepoznat kao poseban entitet. Poznato je da oko 5% svetloćelijskih karcinoma ima predomonantno cističnu formu. Osnovna karakteristika multilokularnog cističnog karcinoma je da kod njega nisu registrovane metastaze bolesti, kao ni recidivi posle hirurškog uklanjanja, tako da ima dobru prognozu (35). Makroskopski gledano tumorsko tkivo je jasno odvojeno od zdravog parenhima bubrega, a karakteriše ga postojanje grupisanih, sitnijih cističnih struktura ispunjenih seroznom tečnošću koje su jedna od druge odvojene fibroznom kapsulom koja može da bude i kalcifikovana (31). Mikroskopski gledano ćelije ovog tumora imaju mala, kružna jedra sa gustim hromatinom i svetlu citoplazmu, a pri imunohistochemijskom bojenju liče na svetloćelijski karcinom (35).

1.3.5. Duktalni karcinom – karcinom sabirnih kanalića

Karcinom sabirnih kanalića vodi poreklo od Belinijevog sabirnog kanala. Čini oko 0,4 – 1,8% karcinoma bubrežnog parenhima. Po svojim karakteristikama podseća na urotelni karcinom (TCC) (36). Nastaje u medularnoj zoni bubrežnog parenhima i obično ima centralnu lokalizaciju. Po pravilu je dimenzija do 5 cm, mada postoje i veće lezije. Makroskopski, tumor je na preseku sivo-beličast, nejasno ograničen, infiltrira bubrežni parenhim, hilarne elemente i perirenalno masno tkivo (37). Mikroskopski tumorske ćelije pokazuju visok stepen maligne alteracije. Karcinom sabirnih kanalića ima lošu prognozu, veoma je agresivan tako da su metastatske promene prvenstveno u limfnim čvorovima i u nadbubregu često prisutne već u momentu postavljanja dijagnoze bolesti.

1.3.6. Neklasifikovani karcinomi bubrega

U ovu grupu karcinoma spadaju svi primarni karcinomi bubrežnog parenhima koji ne mogu da se svrstaju u neku od prethodno definisanih kategorija i predstavljaju oko 4% malignih tumora bubrega (38). Zajedničko im je da poseduju izražen maligni potencijal, nemaju prepoznatljive epitelne elemente uz izraženu anaplaziju i prisustvo sarkomatoidnih ćelija a samim tim i nisku stopu preživljavanja (29).

1.4. Simptomi i dijagnostika karcinoma bubrežnih ćelija

1.4.1. Simptomatologija i klinička slika

Simptomi koji prate RCC uglavnom su uslovljeni lokalnim rastom tumora ili postojanjem udaljenih metastatskih promena odnosno paraneoplastičnim sindromom. Trijas simptoma karakterističan za karcinom bubrega obuhvata hematuriju, bol u predelu slabina i palpabilnu masu. Ovakav trijas simptoma danas se praktično retko susreće, kod svega 6-10% obolelih, prvenstveno zbog napretka i dostupnosti dijagnostičkih procedura, kao i zahvaljujući sve većoj zdravstvenoj prosvetljenosti (39). Svedoci smo činjenice da se više od polovine karcinoma bubrega danas slučajno otkrije tokom ispitivanja drugih oboljenja ili tokom skrining i redovnih sistematskih pregleda. Najčešće se radi o malim tumorskim lezijama koje su asimptomatske (40). Kod 20-30% pacijenata pri inicijalnoj dijagnostici RCC-a istovremeno se konstatuje i postojanje metastatskih promena. Javljanje metastatskih promena nakon hirurškog lečenja javlja se u 20-40% slučajeva pa se može zaključiti da 30-50% pacijenata obolelih od karcinoma bubrežnih ćelija ima rizik da razvije metastatsku bolest. U oko 30% slučajeva ovaj karcinom prate i simptomi paraneoplastičnog sindroma koji uključuju gubitak telesne težine, febrilnost, anemija, ubzana sedimentacija i kaheksija. Uporan kašalj i cervikalna limfadenopatija mogu biti znak metastatske bolesti. Metastatske promene u kostima dovode do bolova i patoloških fraktura (41,42).

1.4.2. Dijagnostika tumora bubrežnog parenhima

Da bi se došlo do definitivne dijagnoze tumora bubrežnog parenhima potrebno je provesti određeni niz postupaka koji obuhvata anamnezu, fizikalni pregled, kompletne laboratorijske analize, radiološke procedure i patohistološku verifikaciju. Bimanuelnim pregledom moguće je detektovati tumorsku masu u lumbalnoj loži, dok postojanje otoka donjih ekstremiteta i pojava varikocela kod muškaraca mogu biti posledica zahvatanja donje šuplje vene tumorom (43).

Od laboratorijskih analiza pažnju treba obratiti na: porast sedimentacije, vrednost alkalne fosfataze, hemoglobina, laktat dehidrogenaze /LDH/ i kalcijuma serumu. Malokrvnost se sreće kod nešto manje od trećine pacijenata sa RCC, dok se eritrocitoza javlja kod 2-5% pacijenata najverovatnije usled hiperprodukcije eritropoetina. Analizom sedimenta urina može se konstatovati prisustvo mikro i makrohaturije (43).

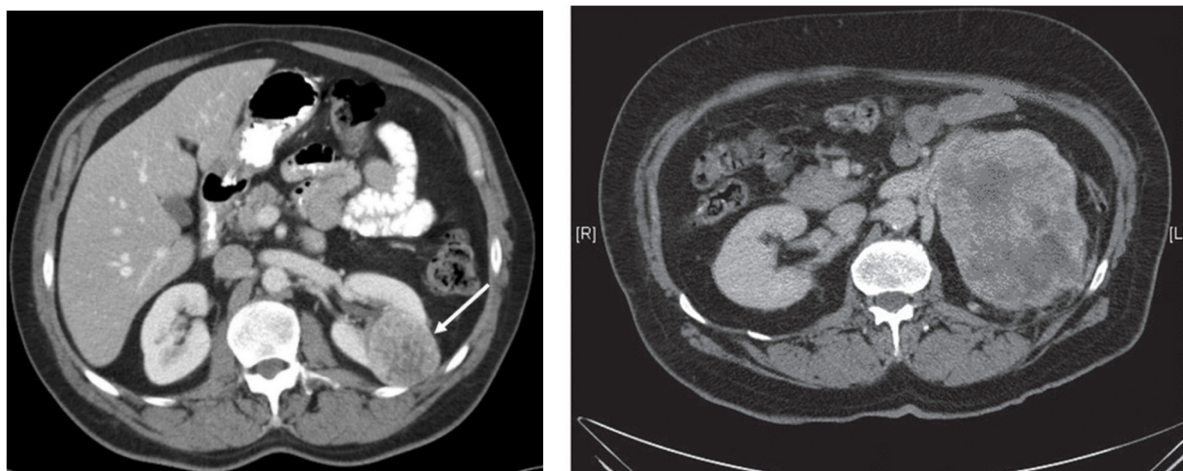
1.4.2.1. Ehosonografija

Iako danas postoje znatno modernije i naprednije procedure u dijagnostici tumora bubrega značaj ultrazvučnog pregleda nesumnjivo je i dalje vrlo veliki. To je procedura koja je gotovo svima dostupna, lako se izvodi, jeftina je, praktično nema kontraindikacija za njeno izvođenje, ne dovodi do komplikacija. Sprovodi i kao skrining procedura (44). Danas je učestalost asimptomatskih tumora bubrežnog parenhima veća od 50%. Približno 83% svih slučajno otkrivenih tumora bubrežnog parenhima prvo je uočeno ehosonografski (45). Pomoću ehosonografije se sa visokom preciznošću sagledavaju veličina, lokalizacija i ehostruktura tumorske lezije, ali ovaj dijagnostički postupak nije dovoljan za određivanje stadijuma bolesti i planiranje hirurškog lečenja. Niske je specifičnosti za male izoehogene intraparenhimske tumore (46). Većina tumora bubrežnog parenhima su solidne formacije i opisuju se kao izo, hipo ili hiperehogene u odnosu na okolni parenhim. Najčešće se sreću hiperehogene lezije. Hiperehogenost je odraz hipervaskularizacije tumora i/ili postojanja nekroze, što se najčešće sreće kod tumora većih dimenzija (46). Anehogene tumorske lezije najčešće ukazuju na maligno izmenjene benigne ciste na bubregu (Bosniak III/IV). Papilarni tumori bubrega su uglavnom izo i hipoehogeni. Angiomiolipomi su obično hiperehogeni, najčešće < 3cm sa masnom kapsulom. Prisustvo protoka krvi u suspektnoj bubrežnoj masi usko je vezano za RCC.

1.4.2.2. Kompjuterizovana tomografija (CT)

Zbog svoje senzitivnosti i specifičnosti, veće od 85% kompjuterizovana tomografija (CT) je suverena metoda u dijagnostici tumora bubrežnog parenhima (47). Da bi se postigla što preciznija evaluacija tumorskih promena neophodno je multifazno snimanje, sa ciljem što boljeg sagledavanja morfoloških i funkcionalnih aspekata RCC i njihove promene po fazama. Kod snimanja tumora bubrega kompjuterizovanim tomografijom razlikujemo predkontrastnu i kontrastnu fazu, pri čemu je preporučeno da se preseči prave na najmanje 5mm. (48) Sama MCT urografija ima četiri faze. Prvu fazu čini nativni skenogram I u ovoj fazi možemo identifikovati prisustvo kalcifikacija i masti a i konstatovati da li je tumorska promena hiper, hipo ili izoatenuisana u odnosu na parenhim bubrega. Nakon ovog dela pregleda sledi ubrizgavanje kontrastnog sredstva u cilju određivanja postkontrastnog pojačanja. Druga faza pregleda, kortikomedularna faza ili arterijska faza (15-30 sekundi od aplikacije) ima za cilj identifikacija renalnih lezija, procenu stanja vaskularnih struktura i postojanja tumorske invazije u njima. Ova faza daje najznačajnije informacije o karakteristikama lezije. Treća faza pregleda je nefrografska faza ili venska faza (60-90 sekundi od aplikacije) i ova faza služi otkrivanju solidnih renalnih masa. Takođe ova faza pregleda je bitna za izbegavanje lažno pozitivnih i lažno negativnih interpretacija. Poslednja četvrta faza pregleda ili ekskretorna faza (180-300 sekundi od aplikacije) daje najbolji prikaz anatomske abnormalnosti tumora lokalizovanih u sabirnom sistemu bubrega (48). Svetloćelijski tip RCC u 90% slučajeva prikazuje se kao hipervaskularan i heterogen, papilarni tip RCC-70% slučajeva je hipovaskularan i homogen dok se kod hromofobnog tipa RCC-a obično registruje umereno pojačanje kontrasta (49,50).

Slike 7,8. MDCT prikaz karcinoma bubrežnih ćelija



1.4.2.3. Nuklearna magnetna rezonanca /NMR/

Pregled nuklearnom magnetnom rezonancom nesumnjivo ima svoje značajno mesto u dijagnostici RCC-a prvenstveno za pacijente sa oštećenom funkcijom bubrega, alergijom na jodni kontrast, i u slučajevima kada ekspozicija jonizujućem zračenju nije poželjna (51). Zahvaljujući svojim karakteristikama NMR pregled je često dodatna dijagnostika prethodno učinjenoj kompjuterizovanoj tomografiji u sučaju atipičnih i tumorskih promena manjih dimenzija (52). Kako se NMR pregledom mogu jasno sagledati granice tumorski izmenjenog parenhima bubrega, infiltracija krvnih sudova prvenstveno bubrežne i donje šuplje vene, odnosno zahvaćenost limfnih čvorova i udaljenih meta promena ovu proceduru možemo primenjivati i pri određivanju stadijuma bolesti. Posebno mesto NMR pregled ima u kontroli nakon poštednih operacija na bubregu zbog kvalitetnog prikaza mekih tkiva (53).

1.4.2.4. Biopsija renalnih masa

Imajući u vidu da su u većini slučajeva promene na bubrezima maligne prirode, biopsija solidnih ili kompleksnih cističnih renalnih masa nije neophodna pre ekscizije. (54) Iako nije deo standardne evaluacije stanja pacijenta savetuje se kod sumnje da je renalna masa posledica infekcije, inflamacije, sumnje na angiomiolipom, limfom odnosno suspektnu metastazu drugog malignoma u bubrež. Zatim u slučajevima kada se kod pacijenta koji je kandidat za nefrektomiju odluči za praćenje, ablaciju ili embolizaciju (54). Najčešći razlog za biopsiju bubrega u našoj svakodnevnoj kliničkoj praksi je potreba za potvrđivanjem dijagnoze RCC-a pre sistemske terapije kod pacijenata sa metastaskim promenama koji nisu kandidati za citoreduktivnu nefrektomiju.

1.5. Stadijumi razvoja, tok i prognoza bolesti

1.5.1. Stadijumi razvoja tumora bubrežnog parenhima

Prvu klasifikaciju za određivanje stadijuma tumora bubrežnog parenhima, predložio je Robson 1969. godine. Nastala je na osnovu procene uspeha hirurškog lečenja kao i kancer specifičnog preživljavanja (CSS) a bazirala se na ograničenosti tumorske lezije prema okolnim strukturama. Prvi stadijum prema ovoj klasifikaciji odnosio se na tumor koji je ograničen na bubrežnu kapsulu, drugi stadijum na tumor ograničen na Gerotinu fasciju, treći se na odnosio na proboj tumora u bubrežnu venu, donju šuplju venu ili regionalne limfne čvorove dok se pod četvrtim stadijumom tumora smatrao tumor proširen na susedne organe ili u vidu udaljenih metastaza. Ipak klinička primena ove klasifikacije za procenu stadijuma tumorske bolesti nosila je nekoliko nedostataka pre svega zbog zanemarivanja veličine tumorske promene kao parametra a zatim i zbog neadekvatnog grupisanja diseminacije tumora u limfne čvorove i tumorske infiltracije bubrežne vene u isti stadijum bolesti. Deceniju kasnije, 1978. godine Međunarodna asocijacija za borbu protiv raka (UICC) uvela je TNM klasifikaciju pomoću koje se zasebno ispituju osobenosti primarnog tumora, zahvaćenost limfnih čvorova kao i prisustvo udaljenih metastaza. Ovakva klasifikacija prognostički gledano pokazala se značajno preciznijom u odnosu na Robsonovu klasifikaciju (55). TNM klasifikacija vremenom je doživela nekoliko izmena, a najveći značaj pre svega u prognostičkom smislu, imala je njena revizija iz 2002.godine kada je dotadašnji T1 stadijum (do 7cm.), podeljen na T1a (<4cm) i T1b (4-7cm) stadijum, što je značajno odredilo pristup lečenju tumora bubrega manjih dimenzija (56). Danas je aktuelna revizija TNM klasifikacije iz 2017. godine koja predstavlja do sada najbolji indikator preživljavanja pacijenata sa tumorom bubrežnog parenhima. (Slika 9)

Slika 9. TNM klasifikacija revizija 2017.godina

<u>T – primarni tumor</u>	<u>N – regionalno limfno tkivo</u>
Tx – prisustvo primarnog tumora nije utvrđeno	
To – bez evidencije o primarnom tumoru	Nx – nije utvrđeno širenje u regionalne limfne žlezde
T1 – 7 cm ili manje, tumor ograničen na bubrežno tkivo	No – ne postoje metastaze u regionalnim limfnim žlezdama
T1a – 4cm ili manje	N1 – prisustvo pojedinačnih metastaza
T1b – veci od 4 cm ali manji od 7cm	N2 – metastaza tumora u jednu ili više limfnih žlezda
T2 – veci od 7cm, ogranicen na bubrežno tkivo	
T2a – tumor veći od 7cm ali manji od 10 cm	
T2b – tumor veći od 10 cm	
T3 – tumor direktno invadira venu, suprarenalnu venu ili perirenalno tkivo, ali ne probija Gerota fasciju niti infiltriše istostranu nadbubrežnu žlezdu	
T3a – direktno prodire u renalnu venu ili njene segmentalne grane, ili zahvata pijelokaliksni sistem ili zahvata perirenalnu ili mast renalnog sinusa ali bez Gerota fascije	
T3b – tumor ima masivno širenje u venu kavu ispod dijafragme	
T3c – tumor ima masivno širenje u venu kavu iznad dijafragme ili zahvata zid vene kave	
T4 – tumor zahvata Gerota fasciju (uključujući i kontinuirano širenje u istostranu nadbubrežnu žlezdu	
	<u>M – prisustvo udaljenih metastaza</u>
	Mx – nije utvrđeno prisustvo udaljenih metastaza
	Mo – bez vidljivih metastaza
	M1 – prisustvo udaljenih metastaza

1.5.2. Tok i prognoza bolesti

Kao što je već ranije pomenuto kod 20-30% pacijenata pri inicijalnoj dijagnostici RCC-a istovremeno se konstatuje i postojanje metastatskih promena. Javljanje metastatskih promena nakon hirurškog lečenja javlja se u 20-40% slučajeva pa se može zaključiti da 30-50% pacijenata obolelih od karcinoma bubrežnih ćelija ima rizik da razvije metastatsku bolest. Zbog svega navedenog radi adekvatnog i pravovremenog lečenja pacijenata sa RCC-om potrebno je posebno obratiti pažnju na prediktivne faktore koji određuju tok bolesti a istovremeno daju jasniju sliku o prognozi i samom ishodu lečenja (57).

Prognostičke faktore možemo grupisati kao: patoanatomske (stadijum tumora), patohistološke (gradus i tip tumora), biomolekularne i faktore vezane za samog pacijenta.

1.5.2.1. Patoanatomski faktori

Verovatno najznačajniji prognostički faktor kada govorimo o karcinomu bubrežnih ćelija je stadijum bolesti i nedvosmisleno je potvrđeno da je prognoza ishoda bolesti značajno bolja kada je tumorska promena ograničena samo na bubreg, u odnosu na stanje kada tumor zahvata limfne čvorove, renalnu ili donju šuplju venu, istostranu nadbubrežnu žlezdu odnosno u situacijama kada postoje udaljene metastatske promene (58). U situaciji kada je tumor ograničen samo na bubreg, petogodišnje preživljavanje iznosi 75-95%. Međutim, ako dođe do širenja bolesti u lokoregionalne limfne čvorove (N+) preživljavanje je značajno niže (10-20%), dok kod pacijenata kod kojih je došlo do daljeg širenja bolesti tj. pojave udaljenih metastatskih promena (M+) preživljavanje iznosi svega 0-15%. Posebno lošu prognozu imaju pacijenti sa visceralnim metastazama prvenstveno oni kod kojih je njihovo prisustvo dokazano u vreme inicijalne dijagnoze tumora. Kasniji razvoj metastatskih promena nešto je prognostički povoljniji, prve svega kada se radi o solitarnim lezijama koje se javljaju nakon dužeg vremena praćenja nakon hirurškog lečenja. (59)

1.5.2.2. Patohistološki faktori

Stepen ćelijske diferencijacije, odnosno određivanje gradusa tumorske bolesti takodje predstavlja značajan prognostički faktor i značajno utiče na prognozu ishoda bolesti. Zaključci multicentričnih studija kojima je procenjivan rizik od smrtnog ishoda uz korišćenje Fuhrman gradus sistema (FGS) pokazali su da je petogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa tumorom najnižeg gradusa (Gr I) iznosilo 86-89%, tumora gradus II 72-79%, kod pacijenata sa tumorom gradus III 50-60 %, dok je kod pacijenata sa tumorom najvišeg gradusa (Gr IV) po Fuhrmanu između 28 i 30%. Treba imati na umu da je procena gradusa tumorske bolesti subjektivna procena patologa, te ovaj parameter koji ima neosporan prognostički značaj ipak ima manju prediktivnu vrednost u odnosu na procenjeni stadijum tumorske bolesti. (60). Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa ccRCC ako se u obzir uzmu svi gradusi tumorske bolesti iznosi oko 60%. Pacijenti sa pRCC imaju statistički nešto bolje petogodišnje preživljavanje u odnosu na pacijente sa ccRCC, s tim da je prognoza bolja kod papilarnog tipa1 u odnosu na tip2 koji se pokazao kao značajno agresivniji i sklon davanju metastaza. Najbolju prognozu imaju pacijenti sa

chRCC kod kojih u različitim studijama petogodišnje preživljavanje ide i preko 95% prvenstveno zbog nižeg stadijuma i gradusa bolesti. Nasuprot njemu Belinijev (duktalni karcinom) najčešće se karakteriše visokim stepenom anaplazije, agresivnošću kao i velikim potencijalom za davanje udaljenih metastatskih promena (61). U svojim rezultatima istraživanja iz 2006. godine Ficarra i saradnici ustanovili su da je petogodišnje kancer specifično preživljavanje (CSS) za ccRCC između 43-83%, za pRCC 61-90%, a za chRCC između 80-100% (62). Prisustvo sarkomatoidne komponente kod svih tipova RCC veoma je nepovoljan prognostički znak. Preživljavanje takvih pacijenata je obično manje od dve godine od operativnog lečenja. U različitim studijama pacijenti sa sarkomatoidnom komponentom RCC-a imali su petogodišnje preživljavanje od oko 22%, odnosno 13% na destogodišnjem nivou (63,64). Mikrovaskularna invazija (MVI) registruje se kod 22-36,5% operisanih zbog RCC i svakako je prediktor loše prognoze i progresije inicijalno nemetastatske u metastatsku bolest, ali ne i nezavisni prognostički faktor (65,66).

1.5.2.3. Biomolekularni faktori

Ključni problem u terapijskom pristupu RCC jeste njegova rezistencija na hemioterapeutike koji indukuju apoptozu (programirana ćelijska smrt tip I) zbog čega manipulacija apoptotskom kaskadom može doprineti većoj osetljivosti ćelija na pokretanje procesa apoptoze. Pored apoptoze, i autofagija (programirana ćelijska smrt tip II) predstavlja značajnu metu za terapiju RCC jer su i apoptoza i autofagija genetski regulisane i evolutivno konzervisane i imaju značajnu ulogu u kontroli života i smrti ćelije. Takođe, angiogeneza i faktori uključeni u njenu kontrolu predstavlja važan faktor u progresiji RCC kao i odgovoru RCC na terapiju.

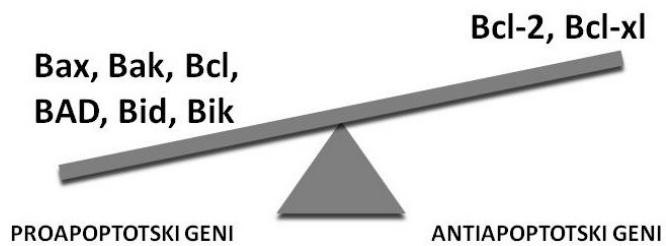
1.5.2.3.1. Apoptoza i RCC

Proces apoptoze je visoko konzervisan u viševićijskim organizmima i genetski je kontrolisan (67). Apoptoza se može pokrenuti od strane same ćelije koja detektuje sopstveno oštećenje posredstvom brojnih unutarćelijskih senzora- unutrašnji put aktivacije apoptoze. Alternativno, apoptoza se može pokrenuti kao rezultat interakcije ćelije sa ćelijama imunskog sistema ili drugih oštećenih ćelija- spoljašnji put apoptoze (68,69).

Unutrašnji i spoljašnji put aktivacije apoptoze funkcionišu sinergistički u cilju održavanja homeostaze i fiziološkog stanja organizma. Nemogućnost ćelije da pokrene apoptozu dovodi do mnogih patoloških stanja među kojima su i maligna stanja.

Unutrašnji put je poznat i kao mitohondrijalni put aktivacije apoptoze. (70). Stimulusi koji iniciraju unutrašnji put svoje efekte ostvaruju nezavisno od receptora i mogu biti pozitivni i negativni. Negativni signali uključuju odsustvo određenih faktora rasta, hormona i citokina koji tako mogu da dovedu do izostanka supresije apoptoze. Pozitivni faktori obuhvataju zračenje, toksine, hipoksiju, hipertermiju, virusne infekcije i slobodne radikale. Svi ovi stimulusi dovode do promena u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrane, što dovodi do otvaranja posebnih kanala, mitohondrijalne tranzitorne pore (engl, mitochondrial permeability transition pore MPT), gubitka mitohondrijalnog transmembranskog potencijala i oslobađanja dve glavne grupe pro-apoptotičkih proteina iz međumembranskog prostora u citosol (71). Prvu grupu čine citohrom c,

Smac/DIABLO i serin proteaza HtrA2/Omi (72; 73,74). Ovi proteini predstavljaju okidač za aktivaciju mitohondrijskog puta zavisnog od kaspaza. Citohrom c se vezuje i aktivira Apaf-1 kao i prokaspazu-9, formirajući „apoptozom“(75). Grupisanje prokaspaze-9 na ovaj način dovodi do aktivacije kaspaze-9. Za Smac/DIABLO i HtrA2/Omi se navodi da promovišu apoptozu inhibicijom aktivnosti IAP (inhibitori proteina apoptoze) (74,76). Druga grupa pro-apoptotičkih proteina, AIF, endonukleaza G i kaspaza zavisna DNA-za (engl, caspase activated DNA-se, CAD), oslobađaju se iz mitohondrija tokom apoptoze i dislocira u jedro gde učestvuje u fragmentaciji hromatina. AIF, Endonukleaza G vrše funkcionišu nezavisno od kaspaza (77). CAD se u jedru aktivira u prisustvu kaspaze 3 i dovodi do izraženije kondenzacije hromatina (78). Kontrola i regulacija ovih apoptotičkih mitohondrijalnih događaja odvija se posredstvom članova Bcl-2 porodice proteina (79). Bcl-2 familija obuhvata tri podfamilije koje sadrže između jednog i četiri BCL-2 homologa domena (BH). Neki proteini su pro-apoptotski (Bax i Bak i Bid, Bam, Bim, Puma, Noxa) jer pospešuju oslobađanje citohroma c dok su drugi anti-apoptotski (Bcl-2 kao i Bcl-X) jer ga upravo sprečavaju. Anti- i pro-apoptostki proteini BCL familije se vezuju jedni za druge u različitim kombinacijama formirajući heterodimere u kojima se proteini inhibiraju međusobno. Ravnoteža između funkcionalne aktivnosti ove dve klase BCL-2 proteina određuje sudbinu ćelije: da li će se apoptoza pokrenuti ili neće). (Slika 10) . Istraživanja ukazuju na to da je glavni mehanizam delovanja Bcl-2 porodice proteina regulacija oslobađanja citohroma c iz mitohondrija putem promene propustljivosti mitohondrijalne membrane.



Slika 10. Bcl-2 familija proteina: pro i antiapoptotska kontrola

Spoljašnji put apoptoze, takođe je poznat i kao put receptora smrti (70). Ovaj put se pokreće vezivanjem liganada smrti za receptore smrti koji se nalaze u plazma membrane ćelije. Aktivacija receptora smrti dovodi do stvaranja DISC formacije (engl Death-inducing signaling complex) koja regrutuje monomernu prokaspazu 8 preko njenog domena koji indukuje smrt (DED, death execution domain) i aktivira je u kaspazu 8 (80). Kaspaza 8 dovodi do aktivacije kaspaze 3 što predstavlja mesto na kome se susstiču unutrašnji i spoljašnji put apoptoze.

Imajući u vidu značajnu ulogu apoptoze u kancerogenezi, progresiji tumora i hemorezistenciji ccRCC, manipulacija apoptotskog signalnog puta može potencijalno da poveća osetljivosti tumora na dostupne terapijske modalitete. Zbog toga je izuzetno značajno ispitati ekspresiju gena

odgovornih za sintezu ključnih proteina koji su uključeni u kontrolu apoptoze u tumorskom i peritumorskom tkivu.

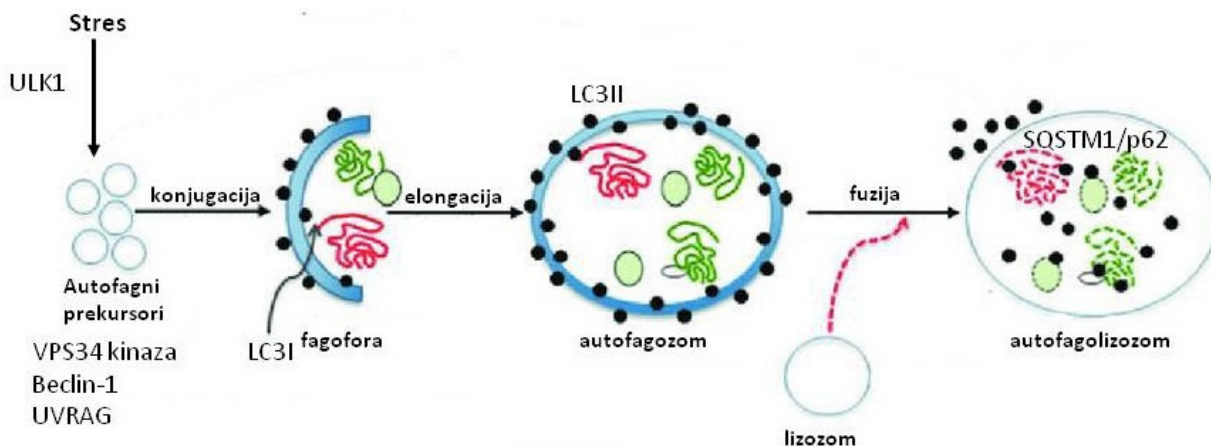
1.5.2.3.2. Autofagija i RCC

Autofagija (makroautofagija) je proces koji omogućava ćeliji da ukloni svoje različite, oštećene, ćelijske komponente. U pitanju je genski kontrolisan proces koji za svoju realizaciju zahteva utrošak energije. Brojni geni koji regulišu autofagiju se zajednički nazivaju ATG geni (AuTophagy-related Genes) i identifikovani su u kvascu, a mnogi od njih imaju svoje homologe u ćelijama sisara (81).

Do danas su identifikovana 3 različita oblika autofagije – makroautofagija, mikroautofagija i selektivna autofagija (82). U najčešće opisanom obliku autofagije „makroautofagije“ celi regioni ćelije se zatvaraju u vezikule sa dvostrukom membranom koje se nazivaju autofagozomi. Ovi autofagozomi se zatim spajaju sa lizozomima da bi postali autofagolizozomi, a sadržaj se zatim razgrađuje proteazama prisutnim u njima.

Autofagija se često naziva „mač sa dve oštrice“. Naime, autofagija pod određenim uslovima može omogućiti ćeliji da preživi, obezbeđujući ćeliji neophodne molekule za održavanje metaboličkih procesa, na primer sintezu ATP. (83). Pod drugim uslovima, autofagija može biti i mehanizam kojim ćelija umire. Ukoliko govorimo o ćelijama tumora, u zavisnosti od stadijuma karcinogeneze, tipa tumorske ćelije ili tkiva kao i prirode stresora, aktivacija autofagije će omogućiti tumorskim ćelijama da prežive, ili će biti mehanizam njihovog umiranja. (84, 85).

Autofagija je process koji je posredovan lizozomima i koji se realizuje u nekoliko faza. Na početku autofagije, deo citoplazme koji sadrži unutarćelijske komponente koje treba ukloniti se okružuje membranom i dolazi do formiranja fagofore. (86). (slika 11): Pokretanje autofagije se najčešće inicira određenim stresom i posredovano je proteinskim kompleksom koji sadrži protein ULK1 (serin-treonin protein kinaza); fagofora se formira aktivacijom kompleksa koji sadrži VPS34 kinazu, Beclin-1 i tumor supresor gen UVRAG; elongacija fagofore je posredovana ATG4-zavisnim cepanjem lakog lanca proteina 3 (LC3) koji je povezan sa mikrotubulama i njegovom naknadnom konjugacijom sa fosfatidiletanolaminom u LC3-II. LC3II je specifični marker formiranja autofagozom); kada se jednom formira, autofagozom koji sadrži citosolni materijal će se stopiti sa lizozomom, čime se pokreće razgradnja ubikvitiniranog citoplazmatskog materijala koji je vezan za specifični receptor za ubikvitinirani materijal- (sequestosome-1/p62, SKSTM1/p62).



Slika 11- Shematski prikaz formiranja autofagolizozoma

Centralna uloga u regulisanju autofagije, generalno, pripada mTOR kompleksu (engl, mammalian target of rapamycin), i njegovom signalnom putu. mTOR integriše brojne signale koji utiču na autofagiju, kao što su faktori rasta, nutrijenti, različiti stresori i energetski status ćelije. (slika 2).

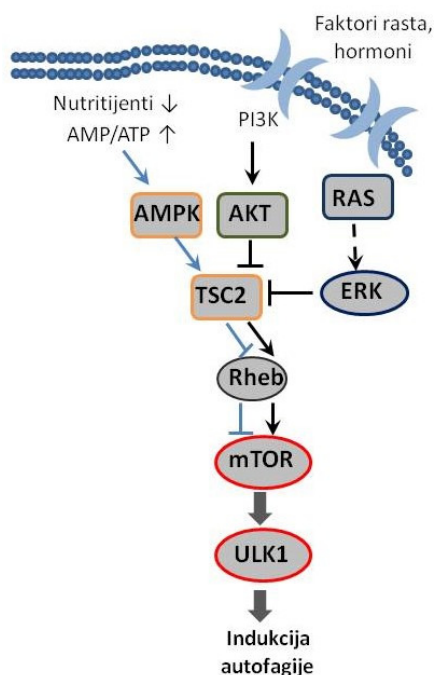
mTOR kinaza je glavni represor autofagije i uključena je u kontrolu rasta i proliferacije ćelija. Jedan od glavnih aktivatora mTOR puta je signalni put Akt / protein kinaze B, koji aktiviraju različiti hormoni i faktori rasta. Akt protein vrši indirektnu aktivaciju mTOR posredstvom inhibicije fosforilacije tumor supresorskog gena TSC 1/2 (engl, tuberousclerosis complex 1/2). TSC 1/2 je glavni mTOR inhibitor, preko koga mnogi mTOR aktivatori ispoljavaju svoje dejstvo (87). S druge strane, tokom deprivacije nutrijenata dolazi do povećanja unutarćelijske koncentracije AMP, što dovodi do aktivacije AMP zavisne protein kinaze (engl, AMP dependent protein kinase, AMPK). Suprotno signalnom putu Akt / protein kinaze B, AMPK aktivira TSC 1/2, što dovodi do inhibicije mTOR i indukcije autofagije koja će, kao što je ranije pomenuto, doprineti obnavljanju ATP. Pored pomenutih puteva, mnogu drugi unutarćelijski signalni molekuli, kao što su: RAS, ERK, MEK, c-Jun kinaza, su uključeni takođe u regulaciju autofagije. Štaviše, različiti stresori takođe mogu inicirati autofagiju. Na primer, oštećenja mitohondrija ili endoplazmatskog retikuluma, predstavljaju okidače za početak autofagije (88,89). Autofagija može biti inicirana i povećanom proizvodnjom reaktivnih kiseoničnih vsta (engl, reactive oxygen species, ROS) (90).

1.5.2.3.3. Signalni putevi autofagije u RCC

Poznato je da je regulacija autofagije povezana sa održavanjem homeostaze RCC ćelija, same bolesti, njene patogeneze i rezistencije tumorskih ćelija na ciljnu terapiju. (91)

Signalni put autofagije u RCC-u je pod kontrolom mnogih različitih molekula. Najvažniji je signalni put PI3K/AKT/mTOR (Slika 12). Njegova aktivacija dovodi do preživljavanja tumorskih ćelija posredstvom mTOR aktivacije i time inhibicije autofagije. (92) Štaviše, PI3K/Akt/mTOR put je definisan kao najvažniji put u regulaciji, inicijaciji i progresiji autofagije u RCC (93). Geni koji su uključeni u mTOR put, kao što su geni koji kodiraju fosfatidilinozitol-3-kinazu (engl,

phosphoinositide 3-kinase, PI3K), PTEN (engl, phosphatase and tensin homolog), protein kinazu B (AKT) i mTOR, su mutirani u čak 28% slučajeva RCC.(94, 95) U tom pogledu, veliki značaj je posvećen PTEN, kao povoljnom prognostičkom faktoru u RCC. (96) U skladu sa njegovom poznatom ulogom u kancerogenezi (97), ekspresija PTEN je značajno niža u tumorskom tkivu ccRCC (98). Takođe je pokazano da se tokom kancerogeneze ccRCC ekspresija PTEN smanjuje do skoro potpunog gubitka i da ovakva promena u ekspresiji PTEN predstavlja rani događaj u evoluciji ccRCC (99). Osim toga, gubitak PTEN-a je takođe povezan sa nastankom rezistencije na terapiju (100).



Slika 12 – PI3K/AKT/mTOR signalni put u kontroli procesa autofagije

U skladu sa prethodno opisanih osnovnim postulatima mTOR signalnog puta, inhibicija PI3K signalnog puta dovodi do inhibicije rasta tumora RCC zbog čega se PI3K može posmatrati kao interesantna terapijska meta. To je potvrđeno u *in vitro* istraživanjima korišćenjem različitih RCC ćelijskih linija koje su tretirane različitim inhibitorima PI3K/mTOR puta. Pozitivni rezultati su dobijeni primenom LI294002 kao specifičnog inhibitora PI3K koji je ispoljio citotoksični efekat *in vitro*. Obećavajući rezultati su dobijeni u studiji Seo et al (101) simultanom primenom inhibitora PP242 koji inhibira mTORC1 i mTORC2 i kurkuminom koji je indukovao smanjenje regulacije AKT i autofagije u RCC. Važno je spomenuti blisku povezanost u regulaciji autofagije i apoptoze u RCC koja se ostvaruje pomoću p53 proteina. Ova međupovezanost je veoma važna jer modulacija autofagije može pomoći ćelijama da prevaziđu rezistenciju koja nastaje na terenu inhibirane apoptoze. Protein p53 je proizvod p53 tumor supresorskog gena koji ima ključnu ulogu u kontroli ćelijske deobe i smrti ćelije. Njegova aktivnost se promoviše kada dođe do oštećenja DNK. Tada,

p53 indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa omogućavajući popravk DNK u oštećenoj ćeliji. Ako ćelija ne uspe da izvrši popravku, započinje apoptotska ćelijska smrt. U uslovima prekomerne ekspresije, p53 može indukovati i autofagiju transaktivacijom gena koji indukuju autofagiju i inhibicijom mTOR delovanjem na AMPK i TSC1/TSC2 signalne puteve. (102) Zanimljivo je da je prekomerna ekspresija p53 pokazana u tkivima RCC u dve kliničke studije (103, 104) koje potvrđuju njegovu ulogu u tumorogenezi RCC. Uzimajući u obzir njegovu fiziološku ulogu, takođe je pokazano da je promocija rasta tumorskih ćelija prekomernom ekspresijom p53 verovatno posredovana njegovom ulogom u popravci DNK. (105). Imajući u vidu kritičnu ulogu p53 u evoluciji tumora, kao i u međusobnu povezanosti apoptoze i autofagije, više od 30 studija je ispitivalo prognostičku moć p53 u predviđanju RCC (106) potvrđujući da pozitivan status p53 može predvideti recidiv tumora i smanjeno preživljavanje. Takođe postoje dokazi da je prekomerna ekspresija p53 prisutna u primarnim i metastatskim RCC uzorcima (104).

Skorija istraživanja pokazuju da se Beclin-1 i LC3-II mogu smatrati prognostičkim markerima za RCC jer je visoka ekspresija Beclin-1 identifikovana u tkivima i ćelijama RCC (A498 i ACHN ćelijske linije) i da je kretanje ćelija, a time i mogućnost njihovog metastaziranja, promovisana u uslovima povećane ekspresije LC3-II (107).

Dugo je RCC posmatran kao monomorfna bolest koja vodi poreklo iz zajedničke prekursorske ćelije, uz različite histološke i kliničko-bioloških karakteristike. Zahvaljujući citogenetici i molekularnoj biologiji danas znamo da je nastanak različitih podtipova RCC-a posledica različitih genetskih abnormalnosti koje određuju poseban patohistološki izgled, biološko ponašanje i fenotipske karakteristike. Različiti metabolički putevi mogu da objasne biološku različitost karcinoma bubrežnih ćelija. Precizno određivanje podtipa RCC ima presudan uticaj kako na određivanje protokola lečenja tako i na predviđanje prognoze bolesti (108, 109, 110).

1.5.2.3.4. Angiogeneza i RCC

Angiogeneza je važan faktor za razvoj malignih tumora i njihovu progresiju. Nasledni i sporadični karcinomi bubrežnih ćelija se karakterišu inaktivacijom Von-Hippel- Lindau (VHL) gena, što rezultuje hiperaktivnošću hipoksija-inducibilnog faktora (HIFA). Kao posledica toga, dolazi do proizvodnje angiogenih faktora, kao što je faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i trombocitni faktor rasta (PDGF). Ekspresija ovih faktora je povezana sa tumorogenezom, rastom i metastatskim potencijalom karcinoma bubrežnih ćelija (111). Ovi podaci ukazuju da angiogeni faktori predstavljaju važne terapijske ciljeve kod karcinoma bubrežnih ćelija. Hirurgija može da izleči bolesnika sa karcinomom bubrega ukoliko se tumor dijagnostikuje u ranom stadijumu. Suprotno tome, karcinom bubrega sa metastazama nije izlečiv. Do pre petnaest godina, jedini lekovi odobreni za lečenje uznapredovale bolesti su bili citokini, interferon i interleukin. Ipak, mali procenat pacijenata (oko 15%) su imali dobar efekat navedene terapije (112,113). U poslednjoj deceniji brojna klinička ispitivanja su izbacila brojne biološke agense od kojih su neki odobreni, kao što su Sunitinib (114), Bevacizumab (115), Sorafenib (116), Temserolimus (117) i Axitinib (118). Zajedničko za sve ove agense jeste inhibicija tirozin kinaznih receptora koja dovodi do inhibicije angiogeneze a može dovesti i do modulacije apoptoze i autofagije (119). Za sve je

dokazano da imaju znatno bolji efekat kod karcinoma bubrega u odnosu na ranije primenjivan interferon. Navedene činjenice ukazuju na potrebu za ispitivanjem angiogeneze, apoptoze i autofagije u različitim tipovima karcinoma bubrega kako bi se poboljšala terapija, a samim tim i prognoza pacijenata obolelih od karcinoma bubrega, naročito onih sa metastatskom bolešću.

Pored već pomenutog VEGF danas se u svrhu predviđanja ishoda lečenja odnosno procene o adekvatnosti terapije koriste i p53, Beta katenin i Survivin.

Beta katenin je multifunkcionalni glikoprotein uključen u različite ćelijske funkcije. Ima svoju ulogu u ćelijskoj adheziji, ćelijskom signalnom putu kao i regulaciji transkripcije gena, važnim događajima kako u normalnom razvoju ćelije tako i u kancerogenezi. Ranije studije potvrdile su da je ekspresija beta katenina značajno povišena u tumorskom tkivu pacijenata sa RCC-om u odnosu na peritumorsko zdravo tkivo. (120,121)

Survivin pripada inhibitorima apoptoze (IAP gene family). Kontrolise mitotsku progresiju i indukuje promene u genskoj ekspresiji koje su u korelaciji sa invazivnošću tumorskih ćelija. Survivin mRNA ima selektivnu ekspresiju tokom embrionalnog i fetalnog razvoja, i postaje praktično nedektabilna ili sa minimalnom ekspresijom u dobro diferentovanim tkivima odraslih, a ostaje izražene ekspresije u humanim karcinomima kao što je RCC (122). Survivin je prisutan u svim tipovima RCC-a (123). Visoka ekspresija survivina udružena je sa lošom tumorskom diferencijacijom, agresivnijom formom bolesti i nižom stopom preživljavanja kod svetloćelijske forme RCC-a (ccRCC).

P53 protein je DNA vezujući molekul koji učestvuje u regulaciji transkripcije (124). P53 ima značajnu ulogu u regulaciji rasta i proliferacije ćelije tako što zaustavlja ćelijski ciklus i indukuje apoptozu kada dodje do DNA oštećenja (125). P53 mutacije mogu biti detektovane imunohistohemijskim bojenjem usled produženog poluživota (126). Slično Survivinu i p53 je prisutan u svim tipovima RCC-a.

1.5.2.4. Faktori vezani za pacijenta

Stadijum i gradus tumora kao i opšte stanje pacijenta prikazano kroz Karnofsky performans status i ECOG performans status su svakako najvažniji prognostički faktori. Prisutni komorbiditeti nesumnjivo nepovoljno utiču na preživljavanje pacijenata sa RCC-om. Pol i godine starosti nisu dokazani kao faktori od značaja za prognozu bolesti (127).

Procenjuje se da se kod oko 20% bolest inicijalno prezentuje paraneoplastičnim simptomima dok oko 40% pacijenata razvija neke od simptoma paraneoplastičnog sindroma tokom trajanja bolesti. Nakon hirurškog lečenja vraćanje prethodnih paraneoplastičnih simptoma obično govori u prilog progresije bolesti. Najčešći simptomi su mršavljenje, febrilnost, kaheksija, otok donjih ekstremiteta i varikocela kao znak kompromitovanosti donje šuplje vene, bolovi u kostima i patološke frakture. Pokazatelji loše prognoze su anemija, ubrzana sedimentacija eritrocita, trombocitoza, povišene vrednosti alkalne fosfataze i laktat dehidrogenaze (LDH), hiperkalcemija. (128) Elson i sar. 1988. bili su među prvima koji su istakli značaj multifaktorijalnog modela u

predikciji kancer specifičnog mortaliteta (CSS) (129). Motzer i sar. 1999. uočili su pet prediktora za procenu mortaliteta kod metastatskog karcinoma bubrega, dok su za procenu rizika koristili skor. Ova skala imala je više modifikacija, a poslednja iz 2004.god kao glavne faktore za procenu rizika izdvojila je samo tri: Karnofsky performan status, vrednost hemoglobina i nivo kalcijuma. (130,131) Mekhail i sar. 2005.god izmenili su ovu Motzer-ovu skalu dodavši joj još dva faktora rizika: nivo laktat-dehidrogenaze (LDH) kao i vreme od potvrđivanja metastatskih promena do trenutka otpočinjanja terapije. (132) Escudier i sar. 2007. su ovim prediktorima kod metastatskog karcinoma dodali i broj metastatskih lezija. (133)

1.6. Terapija kacinoma bubrežnih ćelija

1.6.1. Lečenje lokalizovanog (nemetastaskog) karcinoma bubrežnih ćelija

Osnovu lečenja karcinoma bubrežnih ćelija čini hirurški pristup kako za lokalnu tako i za lokalno uznapređovalu bolest. Hirurško uklanjanje tumorski izmenjenog bubrega, radikalna nefrektomija koja je uključivala i en block uklanjanje Gerota fascije, separatan ligiranje arterijskih, odnosno venskih krvnih sudova kao i uklanjanje istostrane nadbubrežne žlezde i okolnih limfnih čvorova dugo godina je predstavljala zlatni standard i praktično prvi i neizostavni korak u lečenju. Poslednje dve decenije donele su ne samo preispitivanje same radikalne nefrektomije kao jedinog vida lečenja već i njenog opsega kao i samog načina njenog izvodjenja. Na promenu pristupa samom hirurškom lečenju svakako ključan uticaj imao je razvoj kao i dostupnost savremenih dijagnostičkih procedura, pre svega ultrasonografije što je za posledicu imalo otkrivanje velikog broja slučajno otkrivenih karcinoma koji su po pravilu asimptomatski i manjih dimenzija. Prema studiji Hollingsworta i saradnika iz 2006. godine taj procenat se kretao između 48 i 66% (134). Danas smo svedoci da je parcijalna nefrektomija kao hirurška opcija prešla put od izuzetka do procedure koja se široko primenjuje kod pacijenata sa lokalizovanim tumorom. Može se reći da je u slučajevima lokalizovanog RCC-a (stadijum T1, tumor < 7cm, ograničen na bubreg) parcijalna nefrektomija danas uzela primat radikalnoj nefrektomiji osim u slučajevima kada se radi o lokalno uznapređovalom rastu tumora, lokaciji koja isključuje pošteđni pristup (blizina hilusa i kontakt sa kanalikularnim sistemom) odnosno narušenom opštem stanju pacijenta. Takodje ukoliko preoperativno dijagnostičko ispitivanje i intraoperativni nalaz govore u prilog urednog nalaza rutinsko uklanjanje istostrane nadbubrežne žlezde više nije indikovano. Limfadenektomija je danas restriktivna i sprovodi se u cilju određivanja adekvatnog stadijuma bolesti s obzirom da korist proširene limfadenektomije kod pacijenata sa lokalizovanim karcinomom bubrega nije potvrđena. Odabir hirurškog pristupa, klasični (otvoreni) ili laparoskopski nema uticaj na onkološku kontrolu bolesti, preživljavanje i kvalitet života s tim da laparoskopski pristup svakako nosi manji intraoperativni gubitak krvi, manje postoperativne bolove i kraći boravak u bolnici. Velika EORTC 30904 studija sprovedena je kao prospektivno, randomizovano istraživanje i poredila je otvorenu parcijalnu i otvorenu radikalnu nefrektomiju kod pacijenata sa funkcionalnim kontralateralnim bubregom i solitarnom tumorskom promenom na bubregu < 5cm u dijamteru. (135) Ova studija pokazala je da parcijalna nefrektomija ima veću stopu komplikacija (gubitak krvi, curenje urina, re-operacija usled komplikacija) u odnosu na

radikalnu nefrektomiju. Sa druge strane parcijalna nefrektomija nosi manji rizik za hroničnu bubrežnu insuficijenciju. Procenat pozitivnih hirurških margina je viši kod parcijale nefrektomiji (2-3% naspram 1%) (136). Sto se specifičnog kancerskog preživljavanja tiče ono je slično kod oba pristupa za T1 stadijum bolesti, s tim da je lokalni recidiv češći nakon parcilane nefrektomije (3% - 1%) (135,137).

Poslednjih godina posebna pažnja poklonjena je dilemi da li nakon radikalne nefrektomije kod pacijenata koji imaju nemetastasku bolest ali visok rizik za vraćanje bolesti na osnovu sledećih parametara, (1) stadijum bolesti T4, (2) tumorski izmenjeni regionalni limfni nodusi ili kombinacija stadijuma T3N0 + Fuhrman grade ≥ 2 + ECOG performans status ≥ 1 treba uvesti adjuvantnu terapiju. Takva studija S-TRAC sprovedena je uz davanje Sunitiniba 50mg na dnevnom nivou u trajanju od po četiri nedelje uz 2 nedelje pauze tokom godinu dana uz prekid terapije ukoliko se unutar godinu dana uoči recidiv bolesti. Ovo veliko istraživanje pokazalo je značajno duže specifično preživljavanje od oko 1,2 godine kod pacijenata koji su primali Sunitinib u odnosu na one koji adjuvantnu terapiju nisu dobijali (138). Takodje u grupi pacijenata koji su primali Sunitinib neželjena dejstva su bila češća. Nakon ovako dobijenih rezultata Američka agencija za lekove (FDA) uvrstila je Sunitinib kao standardni adjuvantni vid lečenja kod pacijenata sa velikim rizikom za vraćanje bolesti nakon radikalne nefrektomije. Sa druge strane Evropsko udruženje urologa (EAU) u svojim preporukama iz 2021. godine a oslanjajući se na ASSURE randomizovano ispitivanje nije preporučilo upotrebu Sunitiniba kao adjuvantne terapije nakon radikalne nefrektomije (139).

1.6.2. Lečenje metastatskog karcinoma bubrežnih ćelija

Oligometastatski karcinom bubrežnih ćelija podrazumeva prisustvo nekoliko meta promena, obično do 3 i kod ovih pacijenata dugoročno preživljavanje se postiže tretiranjem kako primarnih tako i metastatskih lezija. Postojanje oligometastaza u momentu postavljanja dijagnoze primarnog RCC-a predstavlja indicaciju za eksciziju primarnog tumora kao i hirurški tretman dostupnih lezija ili sprovedenje zračne terapije u slučaju promena na mozgu ili kostima. Kada se oligometastatske promene jave nakon primarnog hirurškog zbrinjavanja bilo u loži odstranjenog bubrega ili drugim organima pored hirurške i zračne terapije u obzir dolazi i sistemska terapija. Uspešnost lečenja nakon resekcije metastatskih promena je bolja ukoliko su one locirane u plućima ili ukoliko ih inicijalno pri operaciji nije bilo, inicijalni M1 stadijum bolesti.

Sa druge strane kada govorimo o metastatskoj bolesti koja je rasprostranjena u organizmu značajnije nego u oligometastaskoj bolesti neophodno je prvo pacijente stratifikovati u različite rizične kategorije te ih prema tome dalje lečiti. Takve kriterijume, odnosno prognostički model danas propisuje Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC), The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium Criteria (IMDC) (140). Na osnovu ovih modela pacijenti sa metastatskim karcinomom bubrega se dodatno procenju kao oni sa niskim, srednjim ili visokim rizikom. Citoreduktivna nefrektomija se definiše kao radikalna nefrektomija u inicijalnom M1 stadijumu bolesti s ciljem da smanji tumorsku masu i širenje. Ovakvo hirurško lečenje danas je preporučljivo kod pacijenata sa metastatskim RCC niskog rizika (pacijenata sa

dobrim ECOG performans statusom, bez moždanih metastaza i metastatskim promenama na plućima) i njega u daljem lečenju prati sistemska terapija. Kod pacijenata sa intermedijernim ili visokim rizikom citoreduktivna nefrektomija pre sistemske terapije ne daje značajan efekat. Poslednjih godina primena sistemske terapije za metastatski RCC predstavlja nužan i pre svega značajan korak kako u produženju života tako i u poboljšanju kvaliteta života pacijenata. Danas svoje značajno mesto u lečenju imaju inhibitori tirozin kinaze (TKI), mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitori, imuno "check point" inhibitori, interleukin 2, kao i rekombinantna monoklonska antitela.

Inhibitori tirozin kinaze (TKI) redukuju angiogenezu i ćelijsku proliferaciju. Inhibiraju različite tirozin kinaze medju kojima i receptor za vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). U ovu grupu spadaju sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, cabozantinib. Pazopanib i Sunitinib su terapija prvog izbora kod metastatskog svetloćelijskog RCC, niskog rizika (141,142).

Mammalian target of rapamycin (mTOR) je protein koji reguliše hipoksija inducibilni factor (HIF) i VEGF. Kada je mTOR inhibiran, VEGF pada, što smanjuje angiogenezu a pad HIF-a snižava ćelijsku proliferaciju. Predstavnici ove grupe su Temsirolimus i Everolimus i njihova uloga je u inhibiciji mTOR-a. Temsirolimus svoje mesto nalazi u terapiji uznapreovalog RCC-a kod pacijenata sa predvidjenim kratkim preživljavanjem (143) dok Everolimus ima svoje mesto kod pacijenata sa uznapreovalim RCC kod kojih prethodna terapija sorafenibom ili sunitinibom nije dala efekat. (144).

Imuno "check point" inhibitori su lekovi koji blokiraju važan regulatorni korak u imunom sistemu. Oni smanjuju mogućnost tumora da izbegne imuni sistem što njemu omogućava da se efikasnije suprotstavi tumoru. PD-1/PD-L1 inhibitori uključuju pembrolizumab, nivolumab i avelumab. PD-1 (receptor programirane smrti) nalazi se na limfocitima. PD-L1 (ligand programirane smrti) je protein koji se vezuje za PD-1 receptor. Vezivanjem liganda smanjuje se mogućnost imunog sistema da napada maligno tkivo.

Uloga interleukina IL-2 danas je značajno smanjena zbog toksičnosti i limitirane efikasnosti. Rekombinantno monoklonsko antitelo (Bevacizumab) inhibira angiogenezu i tumorski rast vezujući se i neutrališući VEGF factor A. Obično se primenju zajedno sa interferinom alfa-2a zbog bolje efikasnosti u lečenju metastatskog RCC-a (145).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Analizirati ekspresiju proteina angiogeneze i proliferativnih markera u karcinomu bubrežnih ćelija i utvrditi njihov međusobni stepen korelacije.
2. Analizirati ekspresiju gena i proteina uključenih u proces apoptoze i autofagije u peritumorskom i tumorskom tkivu karcinoma bubrenih ćelija
3. Definirati kriterijume za precizniju klasifikaciju karcinoma bubrežnih ćelija na osnovu dobijenih rezultata o ekspresiji proteina angiogeneze i ekspresiji proliferativnih markera
4. Procena značaja ekspresije pojedinih gena i proteina uključenih u kontrolu procesa apoptoze i autofagije za prognozu toka bolesti tj. preživljavanje

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitivana populacija

Istraživanje je koncipirano kao studija preseka koja je obuhvatila 90 pacijenata sa dijagnozom karcinoma bubrežnih ćelija koji su hirurški lečeni na Klinici na urologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije u periodu od novembra 2010. do jula 2013. godine a zatim dijagnoze patohistološki potvrđenje na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kao kriterijumi za uključivanje u istraživanje uzeti su prisustvo maligne lezije bubrega prethodno potvrđene nekom od dijagnostičkih procedura (ultrazvučni pregled, MDCT pregled ili NMR pregled), potvrđena patohistološka dijagnoza RCC (uključujući podtip, stagijum, gradus, prisustvo sarkomatoidne komponente, vaskularne invazije, tumorske nekroze) i sprovedena hirurška intervencija (radikalna ili parcijalna nefrektomija. U studiju su uključivani punoletni pacijenti, oba pola. Svaki pacijent upoznat je prethodno sa ciljem i tokom istraživanja i dao saglasnost na učestvovanje u njemu. U istraživanje nisu uključeni pacijenti sa dokazanim metastatskim karcinomom bubrega u momentu započinjanja lečenja, pacijenti kod kojih je postavljena dijagnoza von Hippel-Lindau sindroma odnosno sindroma tuberozne skleroze, pacijenti sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, metaboličkim sindromom i/ili diabetesom tip 2, kao i pacijenti kod kojih je sprovedena zračna ili hemioterapija odnosno sistemska terapija lekovima sa poznatim efektima na autofagiju i apoptozu unutar tri meseca pre sprovođenja radikalnog operativnog lečenja karcinoma bubrega. Za svakog pacijenta prikupljeni su podaci o polu, starosti, lokalizaciji tumora, dimenzijama, patohistološkom stadijumu, histološkom gradusu i podtipu, eventualnoj pojavi recidiva bolesti ili diseminaciji, ishodu bolesti, tj. statusu pacijenta u trenutku zaključenja studije. Kao izvor potrebnih podataka korišćene su uputnice za patohistološku analizu, istorije bolesti obolelih i kartoni kontrolnih ambulantnih pregleda obolelih. U sklopu preoperativnog kliničkog ispitivanja svim bolesnicima je urađena abdominalna ultrazvučna dijagnostika, MDCT pregled abdomena i male karlice / NMR pregled i RTG pluća. Ovi postupci su imali za cilj procenjivane veličine tumorske lezije i njene lokalizacije, postojanje uvećanih limfnih čvorova i metastaza u drugim organima. Svim pacijentima obuhvaćenim studijom bubrežna funkcija pre operacije je procenjivana je praćenjem standardnih biohemijskih pokazatelja, koji uključuju koncentraciju uree i kreatinina u serumu. Nakon hirurškog lečenja, uzorci tumorskog i peritumorskog, neizmenjenog tkiva upućeni su na dalje analize. Svi tumori dalje su klasifikovani prema stadijumu bolesti na osnovu aktuelne revizije TNM klasifikacije iz 2017.godine i histopatološki gradirani prema Fuhrmanovom sistemu gradiranja. Radi lakše statističke obrade tumori stadijuma I i II i oni stadijuma III i IV grupisani su zajedno. Postoperativno pacijenti su redovno praćeni u skladu sa preporukama Evropskog udruženja urologa kako ultrazvučno tako i MDCT pregledima prvo na šestomesečnom a nakon toga i na godišnjem odnosno dvogodišnjem nivou do zaključenja istraživanja.

3.2. Imunohemijska analiza

U cilju postavljanja patohistološke dijagnoze i dodatne analize uzoraka za potrebe ove studije, uzorci tumorskih tkiva su obrađeni u laboratoriji Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Postavljanje patohistološke dijagnoze je podrazumevalo kalupljenje, sečenje i bojenje preparata hematoskilin-eozin metodom. Pri tome je takođe izvršena i procena kvaliteta uzorka i izabrano je polje za dalju obradu primenom metode tkivnog mikroniza (engl, tissue microarray - TMA). Ova metoda podrazumeva serijsku obradu uzorka tkiva koji je pripremljen kao parafinski kalup. Iz polja najhomogenijeg tumorskog tkiva parafinskog kalupa jednog pacijenta, upotrebom 0,6mm punkcione igle su uzeta 3 cilindra tkiva. Ovako dobijeni cilindri su dalje umetnuti u novi parafinski blok (TMA kalup), gde su, za potrebe naše analize, postavljane serije od 27 slučajeva po 3 cilindra. U cilju izvođenja imunohistohemijske analize, sa svakog TMA kalupa su isečeni preseki debljine 5 μ m koji su procedurom deparafinizacije i antigenskog demaskiranja obeležavani antitelima po predviđenom protokolu. Za antitela koja daju citoplazmatsko bojenje izvršena je semikvantitativna analiza imunohistohemijskog bojenja koja je opisivana na sledeći način: odsutno bojenje u svim ćelijama (negativan nalaz, -), fokalna ekspresija (manje od 10% pozitivnih ćelija, +), umerena ekspresija (10-50% pozitivnih ćelija, ++) i difuzna ekspresija (preko 50% pozitivnih ćelija, +++). Za antitela koja boje jedra ekspresija je ocenjivana kvantitativno brojanjem svih ćelija koje su pozitivne na jedarno bojenje (nezavisno od intenziteta bojenja), na ukupno 300 izbrojanih tumorskih ćelija na polju velikog uveličanja (x400).

Za potrebe imunohistohemijske analize, su korišćena primarna antitela specifična za: VEGF, p53, beta katenin i survivin uz odgovarajuću pozitivnu i negativnu kontrolu za svako antitelo. Vizuelizacija pozitivnog bojenja je izvršena primenom streptavidin-biotin tehnike (DAKO LSAB+ kit).

3.3. Određivanje nivoa ekspresije iRNK

3.3.1. RNK izolacija

U cilju izolacije RNK, uzorci tkiva homogenizovani su komercijalnim TRIzol reagensom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) na ledu u prisustvu hloroforma. Ukratko, na talog homogenata koji sadrži ćelije tumora odnosno peritumorskog tkiva (zavisno od korišćenog uzorka) je dodat komercijalni reagens za izolaciju RNK u cilju liziranja ćelija i izdvajanja RNK. Izdvajanje RNK je omogućeno centrifugiranjem (12000 g, +4°C, 15 minuta) uzoraka koji su sa reagensom za izolaciju inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min i u koje je naknadno sipan hloroform. Po centrifugiranju se u svakoj epruveti razdvajaju 3 faze pri čemu gornja, vodena faza, sadrži RNK. Zbog potencijalne kontaminacije sa DNK koja se nalazi u srednjoj fazi ili proteinima i lipidima koji se nalaze u donjoj fazi, gornja faza sa RNK je pažljivo odvojena i pomešana sa jednaom zapreminom izopropanola koji ima za cilj da istaloži izolovanu RNK. Posle inkubacije na sobnoj temperaturi (30 min), uzorci su centrifugirani (12000g na +4°C, 15 minuta) i talog RNK je opran u etil-alkoholu (70%). Po uklanjanju etil-alkohola (aspiracija i isparavanje) izolovana RNK je rastvorena sa 20 μ l destilovane vode.

3.3.2. Reverzna transkripcija

U cilju analize ekspresije gena uključenih u kontrolu apoptoze i autofagije, izolovana RNK je dalje uvedena u proces reverzne transkripcije u cilju dobijanja komplementarne cDNK (engl. complementary DNA). Za potrebe reverzne transkripcije potrebno je odrediti koncentraciju izolovane RNK kako bi jednaka koncentracija RNK iz svakog uzorka bila uneta u reakciju. Nakon merenja koncentracije RNK (Gene Quant kolorimetar), 1 µg RNK svakog uzorka (tumorsko i peritumorsko tkivo istog pacijenta) je rastvoren sa 15 µl vode i dodati su komercijalni prajmeri i deoksinukleotidi (dNTPs; engl. deoxynucleotide triphosphates) u koncentraciji 1mM. Da bi se isključila kontaminacija tokom eksperimentalnog rada, umesto uzorka sa RNK je korišćena voda (negativna kontrola). Reakcija reverzne transkripcije je izvršena kroz nekoliko ciklusa:

+ 25°C, 10 minuta

+ 40°C, 60 minuta

+ 70°C , 10 minuta

Osvo sintetisana komplementarna DNK (cDNK) je čuvana na temperaturi + 4 °C do korišćenja za reakciju lančanog umnožavanja (PCR; engl. polymerase chain reaction). Svi korišćeni reagensi su bili od Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.

3.3.3. RT-qPCR analiza ekspresije gena uključenih u kontrolu apoptoze i autofagije

Kvantitativni PCR (RT-PCR; engl. reverse transcription polymerase chain reaction) je metoda koja omogućava praćenje ekspresije gena od interesa u realnom vremenu. Kao supstrat je korišćena cDNK dobijena reverznom transkripcijom. Metoda je izvedena na PCR aparatu Realplex2 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Analiza je urađena po Qiagen-ovom protokolu za SYBR Green RT-PCR, u ploči sa 96 bunara sa komercijalnim PCR Master Mix-om i TaqMan prajmerima (svi od Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) za sledeće gene: CDKN1A (Hs00355782_m1), CDK1B (Hs00153277_m1), BBC3 (Hs00248075_m1), PTEN (Hs02621230_s1), Pmaip1 (Hs00560402_m1), Bax (Hs00180269_m1), Bad (Hs00188930_m1), BECN1 (Hs00186838_m1), Bak1 (Hs00940249_m1), Bcl2 (Hs00608023_m1), Bcl2L1 (Hs00236329_m1), Bcl2L11 (Hs00197982_m1), Birc5 (Hs00978503_m1), TP53 (Hs01034249_m1), Atg4B (Hs00367088_m1), Gabarap (Hs00925899_g1), XAIP (Hs01597783_m1), UVRag (Hs00163433_m1), SQSTM (Hs00177654_m1) i 18s rRNA (RN18S; Hs03928985_g1) kao "house-keeping" gen koji se kontinuirano eksprimira. Vremenski intervali, temperature i broj ciklusa bili su sledeći:

1. + 50°C, 2 minuta- jedan ciklus

2. + 95°C , 10 minuta- jedan ciklus

3. + 95°C, 15s faza topljenja

4. +60°C, 1 minut faza vezivanja prajmera i sinteze DNK

Faze 3 i 4 se smenjuju 40 ciklusa

5. + 60°C, 1 minut - poslednji ciklus.

Za dalju analizu podataka uzet je prag ciklusa (eng, 1cycle of threshold, Ct) 0.1 jedinica (relativna vrednost). ΔCt je dobijena oduzimanjem Ct vrednosti triplikata konstitutivnog gena RN18S od aritmetičke srednje Ct vrednosti triplikata svakog gena od interesa, pojedinačno. Relativna ekspresija gena u uzorku tumora je određena kao $2^{-\Delta Ct}$ a rezultati su prikazani kao relativna veličina promene ekspresije gena u odnosu na ekspresiju istoga gena u peritumorskom tkivu istog pacijenta.

3.3.4. Imunoblot analiza ekspresije proteina uključenih u kontrolu autofagije

U cilju analize ekspresije proteina koji su uključeni u kontrolu apoptoze i autofagije, uzorci tkiva tumora i peritumora su lizirani u puferu za liziranje (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40 i proteaza/fofosfataza inhibitori koktel; svi od Merck, Darmstadt, Germany). Liziranje je izvedeno na ledu u trajanju od 30 minuta. Po centrifugiranju lizata (14000 g, 15 minuta, 4°C) izolovani su supernatanti i čuvani na -80°C do analize. Pre elektroforeze proteina, u svakom uzorku je određena koncentracija ukupnih proteina metodom po Bradfordu (146), kako bi u dalji postupak elektroforeze za svaki uzorak bila uneta jednaka količina proteina.

Imunoblot metoda podrazumeva nekoliko faza: elektroforezu proteina na osnovu njihove molekulske mase na poliakrilamidnom gelu, transfer razdvojenih proteina na nitroceluloznu membranu, inkubaciju sa primarnim antitelom specifičnim na protein od interesa, vizuelizaciju proteina od interesa po inkubaciji sa sekundarnim antitelom i denzitometrijsko određivanje nivoa ekspresije proteina od interesa.

Kako bi se obezbedilo da se elektroforezom proteini razdvajaju na osnovu svoje molekulske mase, izvršena je denaturacija proteina termičkom obradom uzoraka na tački ključanja tokom 3-5 minuta u prisustvu odgovarajućeg pufera (10% glicerola, 2% SDS, 0,002% bromfenol plavog, 2,5 mM merkaptotetanol, 62,5 mM Tris, pH rastvora 6,8). Merkaptotetanol i SDS (engl, sodium dodecil sulphate) prisutni u puferu onemogućavaju ponovni nastanak disulfidnih odnosno neutrališu naelektrisanje proteina pa se denaturisani proteini elektroforezom razdvajaju isključivo na osnovu svoje molekulske mase. Elektroforeza (SDS-PAGE, SDS-polyakrilamid gel electrophoresis) proteina je izvršena na poliakrilamidnom graduisanom gelu (4% i 10%). Polimerizaciju gela ubrzavaju 0,033% TEMED i 0,05% amonijumsulfat dok je za elektroforezu korišćen pufer sledećeg sastava: 0,1% SDS, 190 mM glicina i 25 mM Tris, pH pufera je 8,3. Uz uzorke je paralelno izvršena i elektroforeza markera (Dual Color Standards; BioRad) koji su omogućili identifikaciju proteina od interesa, i praćenje elektroforeze. Transfer elektroforezom razdvojenih proteina nitroceluloznu membranu (Hybond Nitrocellulose membranes; GE Healthcare Amersham™ Protran™), je izvršen korišćenjem sistema za polusubi transfer (TE 70, Amersham Biosciences). Transfer pufer sadrži 20% metil-alkohola, 190 mM glicina i 25 mM Tris (pH pufera 8,3). Nakon transfera, membrane su inkubirane sa primarnim antitelima koja su specifična za proteine od interesa u 5% rastvoru mleka u Tris puferu sa 0,05% Tween deterdženta. Korišćena su sledeća primarna antitela: LC3II (#2775), p62/SQSTM1 (#NBP1-48320), pAMPK α (Thr127; #2535), pULKs317 (#12753), p4EBP (#9644), p70S6 kinaze, pAkt473 (Ser473; #9271) i PARP (PARP1; #9542) ili aktin (#4967). Inkubacija sa primarnim antitelom je trajala tokom noći na

temperaturi od 4°C. Membrane su ispirane u Tween detedžentu potom inkubirane sa sekundarnim antitelom (peroksidaza konjugovano goveđe anti-zečije IgG, #7074) 75 min na sobnoj temperaturi. Sva antitela su bila od Cell Signaling Technology (Beverly, MA) osim p62/SQSTM1 (Novus Biologicals, Littleton, CO), i korišćena su u skladu sa preporukama proizvođača. Amersham ELC reagens (GE Healthcare, Pollards Wood, UK) i ChemiDoc sistem za vizuelizaciju (Bio-Rad, Hercules, CA) su korišćeni za vizuelizaciju specifičnih proteinskih traka a primenom denzitometrije (Lab software) je izvršena njihova kvantifikacija (nivo ekspresije). Ekspresija proteina je izračunavana u odnosu na ekspresiju aktina kao kontrole. Ekspresija proteina u uzorcima tkiva tumora je izražena kao kvantitativni nivo promene u odnosu na ekspresiju proteina u peritumorskom tkivu istog pacijenta.

3.4. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci pohranjeni su u bazu podataka u –SPSS 18.0, koja je korišćena za kasniju statističku obradu podataka. Obrada podataka je obuhvatila metode deskriptivne i analitičke (inferencijalne) statistike.

Pri analizi imunohistohemijske ekspresije p53, VEGF, survivina i beta katenina u tkivu RCC, sva atributivna obeležja posmatranja opisana su apsolutnim i relativnim brojevima. Numerički oblici posmatranja opisani su korišćenjem mera centralne tendencije i aritmetičke sredine i medijane i mere varijabiliteta (standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti). Za poređenje atributivnih obeležja posmatranja korišćen je Hi-kvadrat test.

Rezultati dobijeni RT-qPCR i imunoblot metodom su prikazani kao kvantitativni nivo promene ekspresije gen/proteina u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo i ove vrednosti su korišćene u analizi povezanosti sa kliniko-patološkim parametrima primenom Mann-Whitney U testa. Poređenje učestalosti je izvršeno primenom Fisher- ovog testa tačne verovatnoće.

Vrednosti statističke značajnosti manje od 0,05 su se smatrale statistički značajnom razlikom.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje ekspresije patohistoloških markera RCC

U prvi deo studije koji je obuhvatio ispitivanje morfoloških osobina i patohistoloških markera značajnih za prognozu karcinoma, uključeno je 90 pacijenata koji su hirurški lečeni na Klinici na urologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije u periodu od novembra 2012. do novembra 2014. godine. Demografske karakteristike ovih ispitanika su prikazane u tabeli 1.

Karakteristike ispitanika	N (%) ili Mean (SD)
Rod	
Muški	56 (62,2%)
Ženski	34 (37,8%)
Godine	62.88 ±8.89
Pušenje	48/90 (53,3%)

Tabela 1. Demografske karakteristike ispitanika

Patohistološkom analizom dobijena je sledeća distribucija RCC podtipova koja je prikazana u tabeli 2.

Tip karcinoma		
	Broj	%
svetloćelijski	58	64,4
papilarni	25	27,8
hromofobni	7	7,8
UKUPNO	90	100.0

Tabela 2. Distribucija podtipova RCC

Detaljnija analiza učestalosti različitih formi RCC je prikazana u tabelama 3,4 i 5.

Svetloćelijski RCC (ccRCC)		
	Broj	%
nije ccRCC	32	35,6
čisto ccRCC	35	38,9
ccRCC sa eozinofilnom komponentom	17	18,9
ccRCC sa sarkomatoidnom komponentom	6	6,7
Ukupno	90	100.00

Tabela 3. Učestalost različitih formi ccRCC-a

Papilarni RCC (pRCC)		
	Broj	%
nije papilarni	65	72,2
Tip 1	10	11,1
Tip 2	15	16,7
Ukupno	90	100.0

Tabela 4. Učestalost različitih formi pRCC-a

Hromofobni RCC (chRCC)		
	Broj	%
nije hromofobni	83	92,2
čist hromofobni	2	2,2
hromofobni sa eozinofilnom komponentom	5	5,6
Ukupno	90	100.0

Tabela 5. Učestalost različitih formi chRCC-a

Za procenu stepena ćelijske anaplazije kod svih tipova RCC-a primenjivan je Fuhrman-ov gradusni sistem (FGS). Ovaj sistem gradiranja bazira se na četiri stepena maligniteta. Tumori gradusa I imaju mala hiperhromatična jedra sa neuočljivim jedarcima, dok tumori gradusa II poseduju fino granulirani hromatin sa teže uočljivim jedarcima. Kod tumora nuklearnog gradusa III jedarca jasno dominira pri mikroskopskom uvećanju, a nuklearni gradus IV karakteriše ćelijiski pleomorfizam i hiperhromazija sa pojedinačnim ili multiplim makronukleolima. (60)

Uprošćeni model definisanja gradusa tumorske bolesti uveli su Ficarra i saradnici tako što su grupisali zajedno Fuhrmanov gradus (FGS) I i II kao tumore nižeg gradusa I FGS III i IV kao tumore višeg gradusa (62). Ovaj princip primenjen je i u nekim delovima našeg istraživanja prvenstveno zbog preciznije vrednosti rezultata iz razloga dovoljnog broja ispitanika u svakoj od poredjenih grupa. (tabela 6,7).

Gradiranje po Fuhrmanu		
	Broj	%
Gradus I i II	49	54,4
Gradus III i IV	41	45,6
Ukupno	90	100.0

Tabela 6. Distribucija prema Fuhrmanovom gradusu

Gradiranje po Fuhrmanu		
	broj	%
Gradus I	4	4,4
Gradus II	45	50,0
Gradus III	37	41,2
Gradus IV	4	4,4
Ukupno	90	100.0

Tabela 7. Distribucija prema Fuhrmanovom gradusu

Stadijum tumorske bolesti u našem istraživanju određivan je prema TNM klasifikaciji iz 2017.godine. Ovom klasifikacijom posebno se analiziraju karakteristike primarnog tumora, stanje limfnih čvorova kao i prisustvo udaljenih metastatskih promena i prognostički gledano ona predstavlja do sada najbolji pokazatelj preživljavanja pacijenata sa RCC-om. Kao i u slučaju gradiranja tumora zbog dobijanja sto kvalitetnijeg uzorka za poredjenje u pojedinim delovima istraživanja stadijumi bolesti I i II odnosno stadijumi III i IV tretirani su zajedno kao tumori nižeg odnosno višeg stadijuma (tabela 8,9).

Stadijumi RCC		
	Broj	%
Stadijum I i II	50	55,6
Stadijum III i IV	40	44,4
	90	100.0

Tabela 8. Distribucija prema TNM klasifikaciji stadijuma tumorske bolesti

Stadijumi RCC		
	broj	%
Stadijum I	33	36,7
Stadijum II	17	18,9
Stadijum III	37	41,1
Stadijum IV	3	3,3
Ukupno	90	100.0

Tabela 9. Distribucija prema TNM klasifikaciji stadijuma tumorske bolesti

U cilju ispitivanja ekspresija proteina angiogeneze i proliferativnih markera u karcinomu bubrežnih ćelija određena je ekspresije p53, survivina, VEGF i beta katenina. Kliničko-patološki parametri i ekspresija ovih markera prikazani su tabelama 10, 11, 12 i 13.

Tabela 10. Kliničko-patološki parametri i ekspresija p53

Varijable	Ukupno	p53-pozitivne	p53-negativne	p-vrednost
Ukupno	90	33 (36.7%)	57 (63.3%)	
Pol				
Muški	56	17 (30.4%)	39(69.6%)	0.11
Ženski	34	16 (47.1%)	18(52.9%)	
Stadijum				
pT1	33	4 (12.1%)	29(87.9%)	<0.001
pT2	17	7 (41.2%)	10(58.8%)	
pT3	37	19(51.4%)	18(48.6%)	
pT4	3	3(100.0%)	0 (0.0%)	
Gradus				
1	4	0(0.0%)	4 (100.0%)	0.04
2	45	13 (28.9%)	32(71.1%)	
3	37	16(43.2%)	21(56.8%)	
4	4	4 (100.0%)	0(0.0%)	
Invazija krvnih sudova				
da	38	17(44.7%)	21(55.3%)	0.174
ne	52	16(30.8%)	36(69.2%)	
Nekroza tumora				
da	57	24(42.1%)	33(57.9%)	0.159
ne	33	9 (27.3%)	24(72.7%)	
Histološki tip				
svetloćelijski RCC	58	18(31.0%)	40(69.0%)	0.041
papilarni RCC	25	14(56.0%)	11(44.0%)	
hromofobni RCC	7	1 (14.3%)	6 (85.7%)	

Pozitivno bojenje na p53 registrovano je u 36,7% slučajeva. Ekspresija p53 detektovana je u 31% slučajeva ccRCC, 56% slučajeva pRCC, i 14.3% slučajeva chRCC. Primećena je statistički značajna korelacija između ekspresije p53 i histološkog podtipa tumora. Pojačana ekspresija p53 je detektovana kod 56 % papilarnih RCC, 31% ccRCC i 14.3% chRCC. ($p=0.041$). P53 imunoreakcija registrovana je u 22.9% čistog ccRCC, 29.4% ccRCC sa eozinofilnom komponentom i 83.3% ccRCC sa sarkomatoidnom komponentom. Razlika u ekspresiji p53 između podtipova svetloćelijskog RCC (ccRCC) bila je statistički značajna ($p=0.015$). Kada govorimo o papilarnom RCC, kod tipa I u 100% slučajeva bojenje na p53 bilo je pozitivno dok je u slučaju tipa II ono bilo pozitivno u 26.7% slučajeva. Samim tim postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji p53 između tipa I i tipa II papilarnog RCC ($p<0.0001$). Takodje dokazana je i statistički značajna korelacija između

ekspresije p53 i stadijuma i gradusa tumora ($p < 0.0001$, $p = 0.04$). Takođe utvrđeno je i da tumori dimenzija većih od 7cm imaju statistički značajno veću ekspresiju p53 ($p = 0.001$).

Tabela 11. Kliničko-patološki parametri i ekspresija Survivina

Varijabla	Ukupno	survivin-pozitivni	survivin-negativni	p-vrednost
Ukupno	90	22 (24.4%)	68 (75.6%)	
Rod				
Muški	56	12 (21.4%)	44(78.6%)	0.39
Ženski	34	16 (47.1%)	18(52.9%)	
Stadijum				
pT1	33	6 (18.2%)	27(81.5%)	0.172
pT2	17	3 (17.6%)	14(82.4%)	
pT3	37	13(35.1%)	24(64.9%)	
pT4	3	0 (0.0%)	3 (100.0%)	
Gradus				
1	4	1 (25.0%)	3(75.0%)	0.79
2	45	9 (20.0%)	36(80.0%)	
3	37	11(29.7%)	26(70.1%)	
4	4	1 (25.0%)	3(75.0%)	
Invazija krvnih sudova				
da	38	17(44.7%)	21(55.3%)	0.174
ne	52	16(30.8%)	36(69.2%)	
Nekroza tumora				
da	57	16(28.1%)	41(71.9%)	0.293
ne	33	6 (18.2%)	27(81.8%)	
Histološki tip				
svetloćelijski RCC	58	10(17.2%)	48(82.8%)	0.03
papilarni RCC	25	12(48.0%)	13(52.0%)	
hromofobni RCC	7	0 (0.0%)	7 (100.0%)	

Pozitivno bojenje na survivin registrovano je u 22 od 90 tumorskih uzoraka (24.4%). Pojačana ekspresija survivina detektovana je u 17,2% ccRCC, 48,0% pRCC i 0.0% slučajeva chRCC. Primećena je statistički značajna korelacija izmedju ekspresije survivina i histološkog podtipa tumora ($p = 0.03$). Takođe utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji survivina izmedju podtipova papilarnog RCC, pacijenti sa pRCC tip II imali su veću ekspresiju survivina od pacijenata

sa pRCC tip I (53.3% prema 40.0 %, $p=0.006$). Statistički značajne korelacije između ekspresije survivina i drugih kliničko-patoloških parametara nisu pronađene.

Tabela 12. Kliničko-patološki parametri i ekspresija VEGF-a

Varijabla	Ukupno	VEGF-pozitivni	VEGF-negativni	p-vrednost
Ukupno	90	31 (34,4%)	59 (65,6%)	
Pol				
Muški	56	21 (37,5%)	35(62,5%)	0,434
Ženski	34	10 (29,4%)	24(70,6%)	
Stadijum				
pT1 +pT2	50	9 (18,0%)	41(82,0%)	0,000
pT3+ pT4	40	22(55,0%)	18(45,0%)	
Gradus				
1+2	49	13 (26,5%)	36(73,5%)	0,084
3+4	41	18 (43,9%)	23 (56,1%)	
Invazija krvnih sudova				
da	38	17(44.7%)	21(55.3%)	0,079
ne	52	14(26,9%)	38(73,1%)	
Nekroza tumora				
da	57	21(36,8%)	36(63,2%)	0,539
ne	33	10 (30,3%)	23(69,7%)	
Histološki tip				
svetloćelijski RCC	58	17 (29,3%)	41(70,7%)	0,253
papilarni RCC	25	12 (48,0%)	13(52,0%)	
hromofobni RCC	7	2 (28,6%)	5 (71,4%)	

Pozitivno bojenje na VEGF registrovano je u 31 od 90 tumorskih uzoraka (34.4%). Ekspresija VEGF detektovana je u 29,3% ccRCC, 48,0% pRCC i 28,6% slučajeva chRCC, s tim da statistički značajna korelacija između ekspresije VEGF i histološkog podtipa tumora nije pronađena ($p=0,253$). Daljom analizom ispitivana je razlika u ekspresiji VEGF u okviru samih podtipova RCC ali statistički značajna razlika u ekspresiji nije registrovana ni kod podtipova svetloćelijskog (ccRCC) ($p=0,063$) ni kod različitih podtipova papilarnog RCC ($p=0.241$). Nije primećena statistički značajno veća ekspresija VEGF kod tumorskih promena većih od 7cm ($p=0,17$). Utvrđeno je statistički značajno povećanje ekspresije VEGF u tumorima visokog stadijuma u odnosu na tumore nižeg stadijuma

(55% prema 18%, $p=0.0002$). Statistički značajne korelacije između ekspresije VEGF i drugih kliničko-patoloških parametara nisu pronađene.

Tabela 13. Kliničko-patološki parametri i ekspresija beta katenina

Varijabla	Ukupno	beta katenin-pozitivni	beta katenin-negativni	p-vrednost
Ukupno	90	55 (61,1%)	35 (38,9%)	
Pol				
Muški	56	35 (62,5%)	21(37,5%)	0,729
Ženski	34	20 (58,8%)	14(41,2%)	
Stadijum				
pT1 +pT2	50	35 (70,0%)	15(30,0%)	0,053
pT3+ pT4	40	20 (50,0%)	20(50,0%)	
Gradus				
1+2	49	38 (77,6%)	11(22,4%)	0,000
3+4	41	17 (41,5%)	24 (58,5%)	
Invazija krvnih sudova				
da	38	24(63,2%)	14(36,8%)	0,733
ne	52	31(59,6%)	21(40,4%)	
Nekroza tumora				
da	57	32(56,1%)	25(43,9%)	0,204
ne	33	23 (69,7%)	10(30,3%)	
Histološki tip				
svetloćelijski RCC	58	39 (67,2%)	19(32,8%)	0,023
papilarni RCC	25	10 (40,0%)	15(60,0%)	
hromofobni RCC	7	6 (85,7%)	1(14,3%)	

Pozitivno bojenje na beta katenin registrovano je u 55 od 90 tumorskih uzoraka (61,1%). Ekspresija beta katenina detektovana je u 67,2% ccRCC, 40,0% pRCC i 86,7% slučajeva chRCC. Primećena je statistički značajna korelacija između ekspresije beta katenina i histološkog podtipa RCC ($p=0,023$). Analizirana je zatim ekspresija beta katenina u odnosu na podtip svetloćelijskog RCC, pri tome je čisto svetloćelijski imao pojačanu ekspresiju u 85,7%, svetloćelijski sa eozinofilnom komponentom u 29,4% a sa sarkomatoidnom komponentom u 66,7% slučajeva, i između njih je potvrđena visoko statistički značajna razlika u ekspresiji ($p<0,0001$). Takođe i kod analize podtipova papilarnog RCC registrovana je značajna razlika u ekspresiji, kod tipa I u 20% uzoraka a tipa II u 53,3% ($p=0,01$). Nije primećena korelacija ekspresije beta katenina i veličine tumorske promene ($p=0,08$). Utvrđeno je statistički značajno povećanje ekspresije beta katenina u tumorima nižeg gradusa (I i II) u odnosu na tumore višeg gradusa (III i IV), (77,6% prema 41,5%,

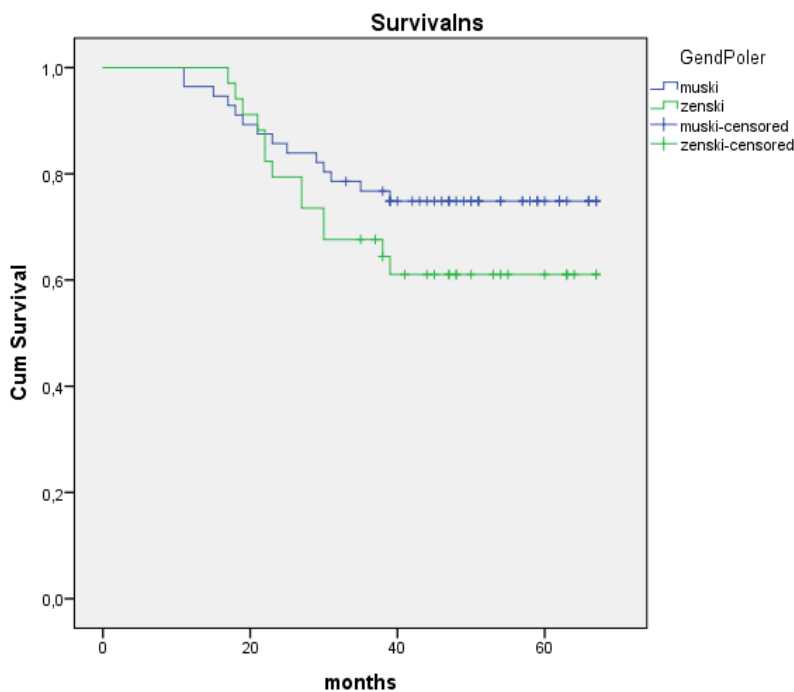
$p < 0,0001$). Statistički značajna korelacija između ekspresije beta katenina i stadijuma bolesti nisu utvrđene ($p = 0,053$).

Daljom statističkom analizom izvršeno je ispitivanje značajnosti istovremene povišene ekspresije ispitivanih prognostičkih markera. U slučaju udružene povišene ekspresije VEGF i survivina nije nadjena statistički značajna povezanost $p = 0,077$, ona nije utvrđena ni u slučaju zajedničke povišene ekspresije VEGF i p53 ($p = 0,225$) odnosno VEGF i beta katenina ($p = 0,326$).

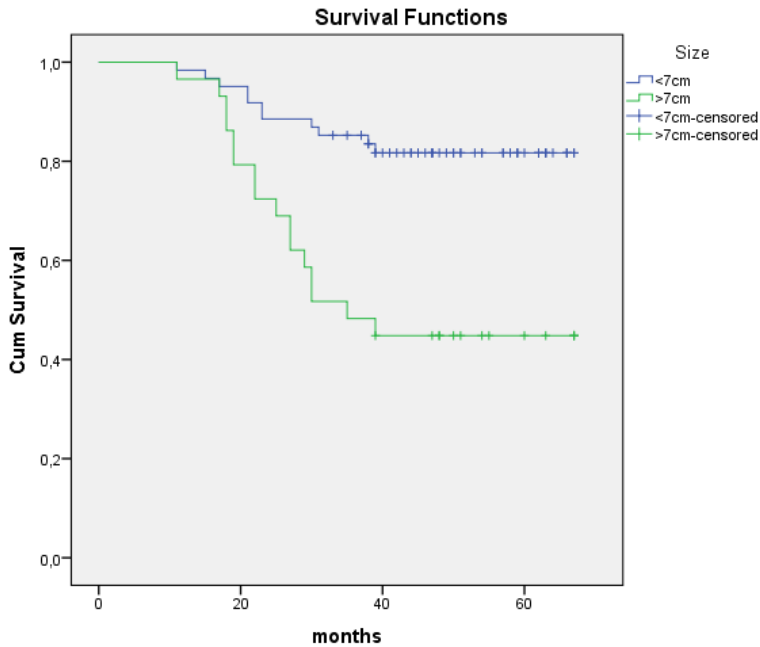
Nije registrovana statistički značajna povezanost između istovremene povišene ekspresije survivina i p53 ($p = 0,325$), odnosno survivina i beta katenina ($p = 0,780$). Povezanost istovremene povišene ekspresije nije bila visoko statistički značajna ni u slučaju p53 i beta katenina ($p = 0,062$).

4.2. Preživljavanje

U istraživanje je uključeno 90 ispitanika koji su nakon operativnog lečenja na Klinici za urologiju UKCS-a dalje praćeni na redovnim kontrolama od strane urologa uz ultrazvučne i MDCT kontrolne preglede. Period praćenja bio je između 11 i 67 meseci (prosečno 43,6). U momentu zatvaranja istraživanja ukupno preživljavanje je bilo 70% (75,0% za muškarce i 61,8% za žene), odnosno preminulo je 27 osoba. Prosečno vreme preživljavanja bilo je 54,128 meseci (95% CI 49.982-58.274). Nije nadjena statistički značajna razlika u preživljavanju među polovima ($p = 0,208$). Utvrđeno je da pacijenti sa tumorima čije su dimenzije veće od 7cm imaju statistički značajno kraće preživljavanje od pacijenta sa tumorima čije su dimenzije iznad 7cm ($p < 0,0001$). (Grafikon 1,2)

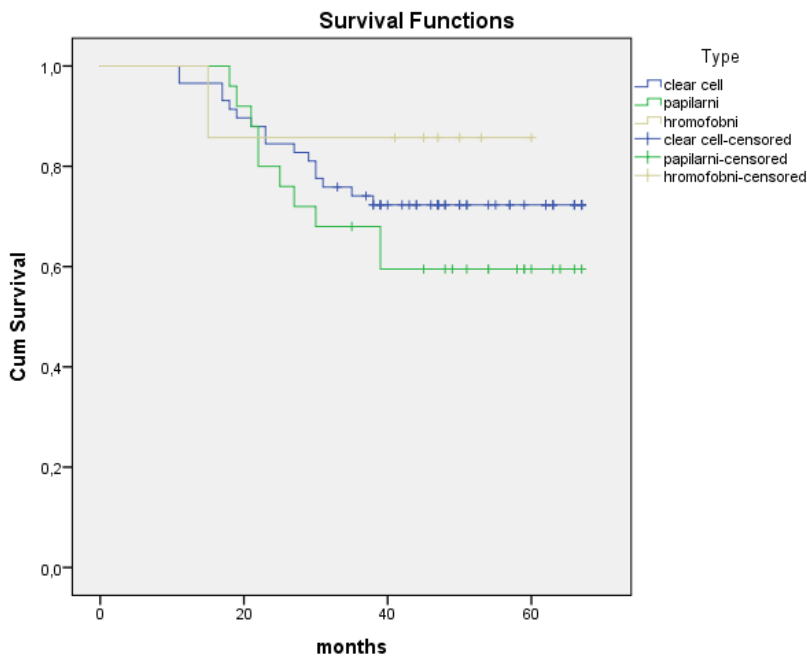


Grafikon 1. Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na pol



Grafikon 2. Kaplan-Meier kriva preživljanja u odnosu na veličinu tumorske promene

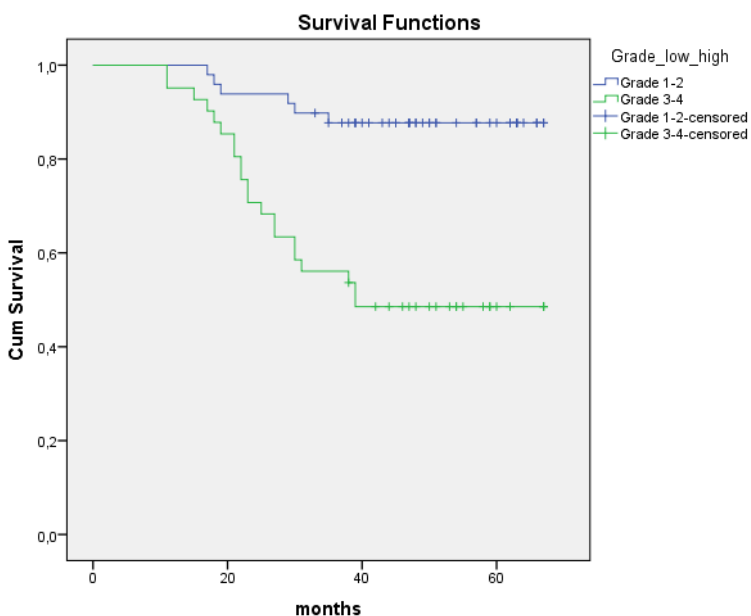
Ne postoji statistički značajna razlika u preživljanju u odnosu na histološki podtip RCC-a ($p=0.412$). Za ccRCC, 55.032 meseci (95% CI 49.937-60.127), za pRCC 50.540 meseci (95% CI 42.473-58.607) i chRCC 53.571 (95% CI 41.906-65.237). (Grafikon 3.)



Grafikon 3. Kaplan-Meier kriva preživljanja u odnosu na histološki podtip RCC-a

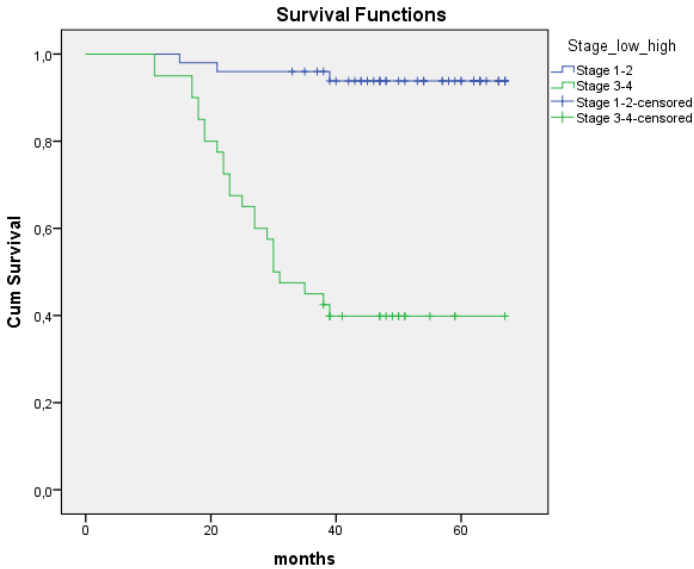
Pacijenti sa tumorima nižeg gradusa imaju statistički značajno duže preživljavanje u odnosu na pacijente sa tumorima višeg gradusa (61.801 - 45.033 meseci) uz $p < 0.001$.

Utvrđeno je da pacijenti kod kojih je identifikovana invazija krvnih sudova u preparatu tumora imaju statistički značajno kraće preživljavanje u odnosu na grupu pacijenata bez tumorske invazije krvnih sudova, $p=0.044$. Prisustvo tumorske nekroze nije statistički značajno uticalo na preživljavanje $p=0,080$. (Grafikon 4.)



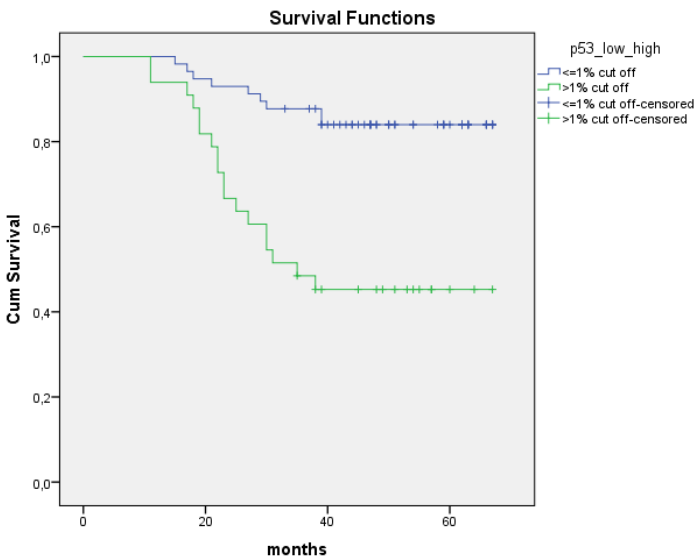
Grafikon 4. Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na gradus tumora

Pacijenti lečeni od karcinoma bubrežnih ćelija nižeg stadijuma imali su statistički značajno duže preživljavanje nego oni sa višim stadijumom bolesti, (64.429 - 41.306 meseci) uz $p < 0.001$. (Grafikon 5)



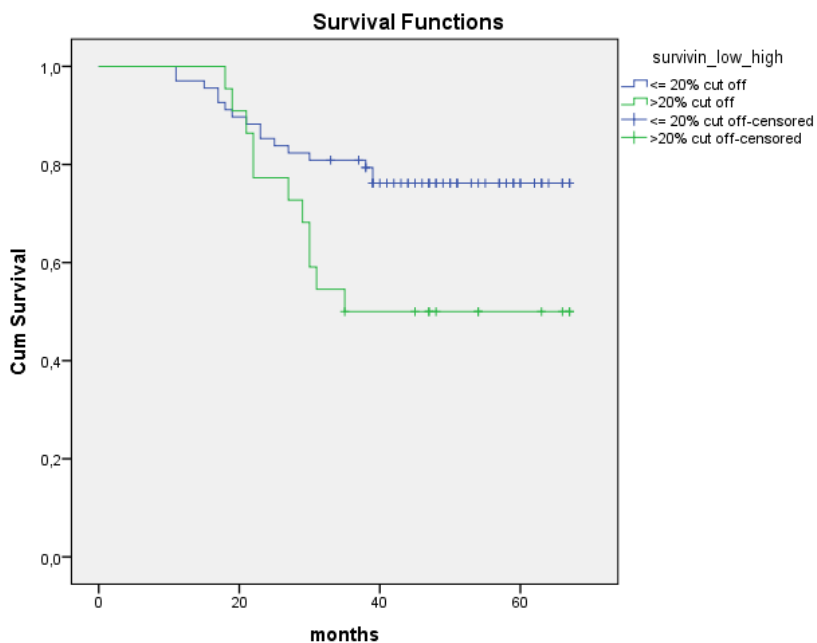
Grafikon 5. Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na stadijum tumorske bolesti

Nakon toga utvrđivana je statistički značajna povezanost između određivanih patohistoloških markera i preživljavanja korišćenjem Log Rank (Mantel-Cox) testa. Utvrđeno je da pacijenti sa pojačanom ekspresijom p53 imaju statistički značajno kraće preživljavanje ($p < 0.001$). Prosečno preživljavanje pacijenata sa pojačanom ekspresijom p53 bilo je 43.184 meseci (95% CI 35.560 - 50.808). U grupi pacijenata kod kojih nije bilo ekspresije p53 prosečno preživljavanje je iznosilo 60.481 meseci (95% CI 56.489-64.474). (Grafikon 6).



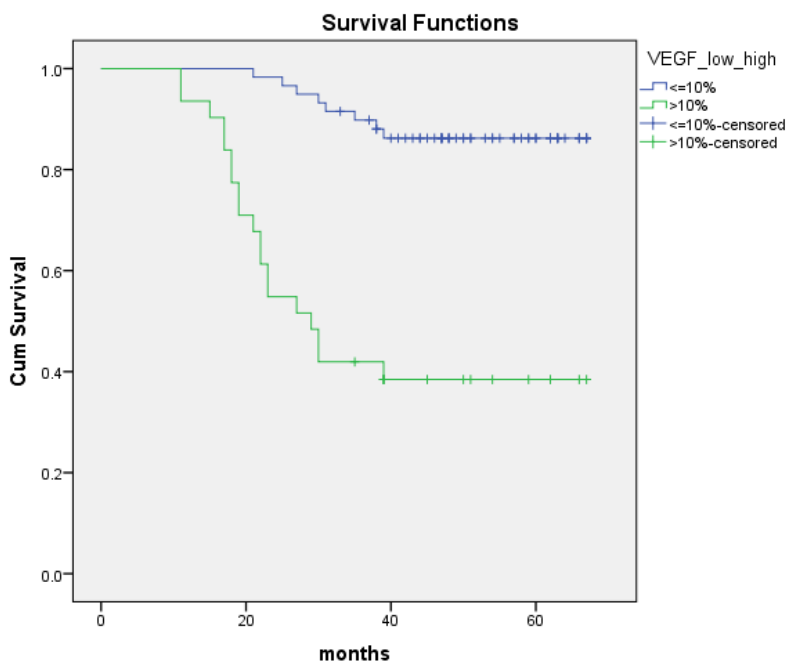
Grafikon 6. Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na ekspresiju p53

Takodje, pacijenti sa pojačanom ekspresijom survivina imaju statistički značajno kraće preživljavanje ($p=0.023$). Prosečno preživljavanje pacijenata sa pojačanom ekspresijom survivina bilo je 46.409 months (95% CI 37.659-55.159), značajno niže nego kod pacijenata bez povišene ekspresije survivina, 56.639 months, (95% CI 52.098-61.181). (Grafikon 7)



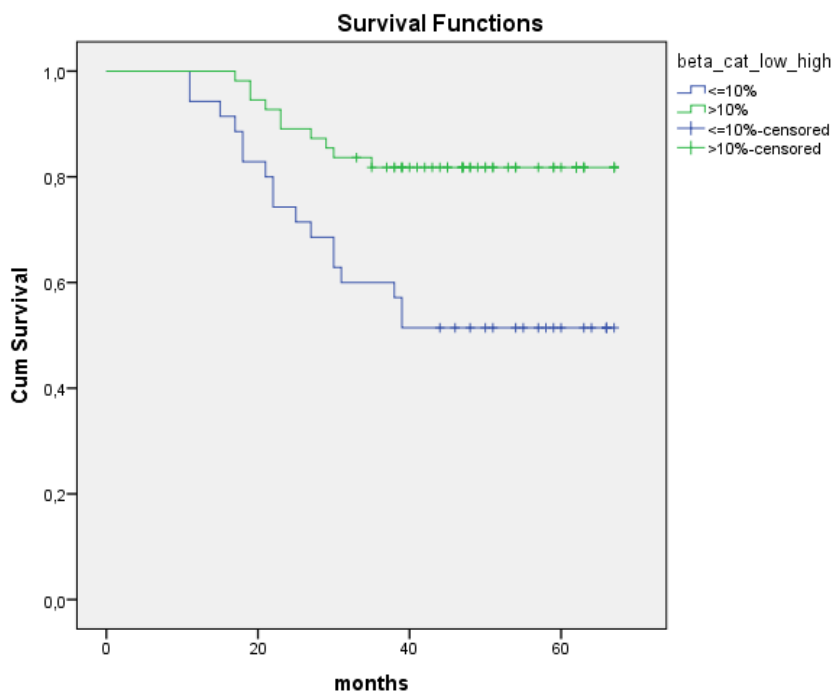
Grafikon 7. Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na ekspresiju survivina

Utvrđeno je da pacijenti sa pojačanom ekspresijom VEGF-a imaju statistički značajno kraće preživljavanje ($p<0.001$). U grupi pacijenata sa pojačanom ekspresijom VEGF prosečno preživljavanje je bilo 39.118 meseci (95% CI 31.116 - 47.121), dok je kod pacijenata bez pojačane ekspresije VEGF iznosilo prosečno 62.016 meseci (95%CI 58.768 - 65.265). (Grafikon 8)



Grafikon 8. Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na ekspresiju VEGF-a

Nasuprot tome, kod pacijenata kod kojih je utvrđena pojačana ekspresija beta katenina utvrđeno je statistički značajno duže preživljavanje ($p=0.002$), (Grafikon 9). Rezultati su prikazani korišćenjem Kaplan Meier-ovih grafika.



Grafikon 9. Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na ekspresiju beta katenina

4.3. Ispitivanje molekularnih markera apoptoze i autofagije u ccRCC

Drugi deo našeg istraživanja bazirao se na daljem ispitivanju najčešćeg podtipa karcinoma bubrežnih ćelija odnosno svetloćelijskog podtipa (ccRCC) sa ciljem ispitivanja uloge apoptoze i autofagije u kancerogenezi ccRCC. Poredili smo uzorke tumorskog i okolnog peritumorskog neizmenjenog tkiva dobijene nakon radikalne nefrektomije. Pacijenti uključeni u ovaj deo istraživanja nasumično su odabrani iz šire grupe pacijenata uključenih u studiju s tim da je uz prethodne kriterijume uključivanja i isključivanja u obzir uzet još jedan kriterijum, patohistološka verifikacija svetloćelijskog podtipa RCC. Na ovaj način selektovano je 20 slučajeva koji su dalje ispitivani. Demografske i kliničkopatološke karakteristike ispitanika prikazane su u tabeli 14. Uprkos relativno malom uzorku, u kome je prosečna starost pacijenata u momentu postavljanja dijagnoze bila 61 godinu (45-85), uz distribuciju po polu muškarci:žene – 1,9:1 i petogodišnje preživljavanje od 60%, možemo reći da su ove karakteristike bile u skladu sa drugim većim epidemiološkim istraživanjima. (26). Nije pronađena statistički značajna povezanost u petogodišnjem bolest-specifičnom preživljavanju između pacijenata prema polu ($p=1,000$), godinama starosti ($p=0,642$), pušačkom status ($p=0,650$), veličini tumora ($p=0,374$) i gradusu tumora ($p=0,670$). Statistički značajna korelacija je pokazana u odnosu na TNM stadijum bolesti i to tako da je niži stadijum bolesti korelirao sa dužim preživljavanjem ($p=0,005$). Plućne ili koštane metastaze otkrivene su praćenjem kod 10 pacijenata od kojih je u 8 slučajeva došlo do smrtnog ishoda tokom petogodišnjeg praćenja. Lokalni recidiv tumora nije registrovan u našoj ispitivanoj grupi.

Tabela 14. Demografske i kliničkopatološke karakteristike pacijenata sa ccRCC

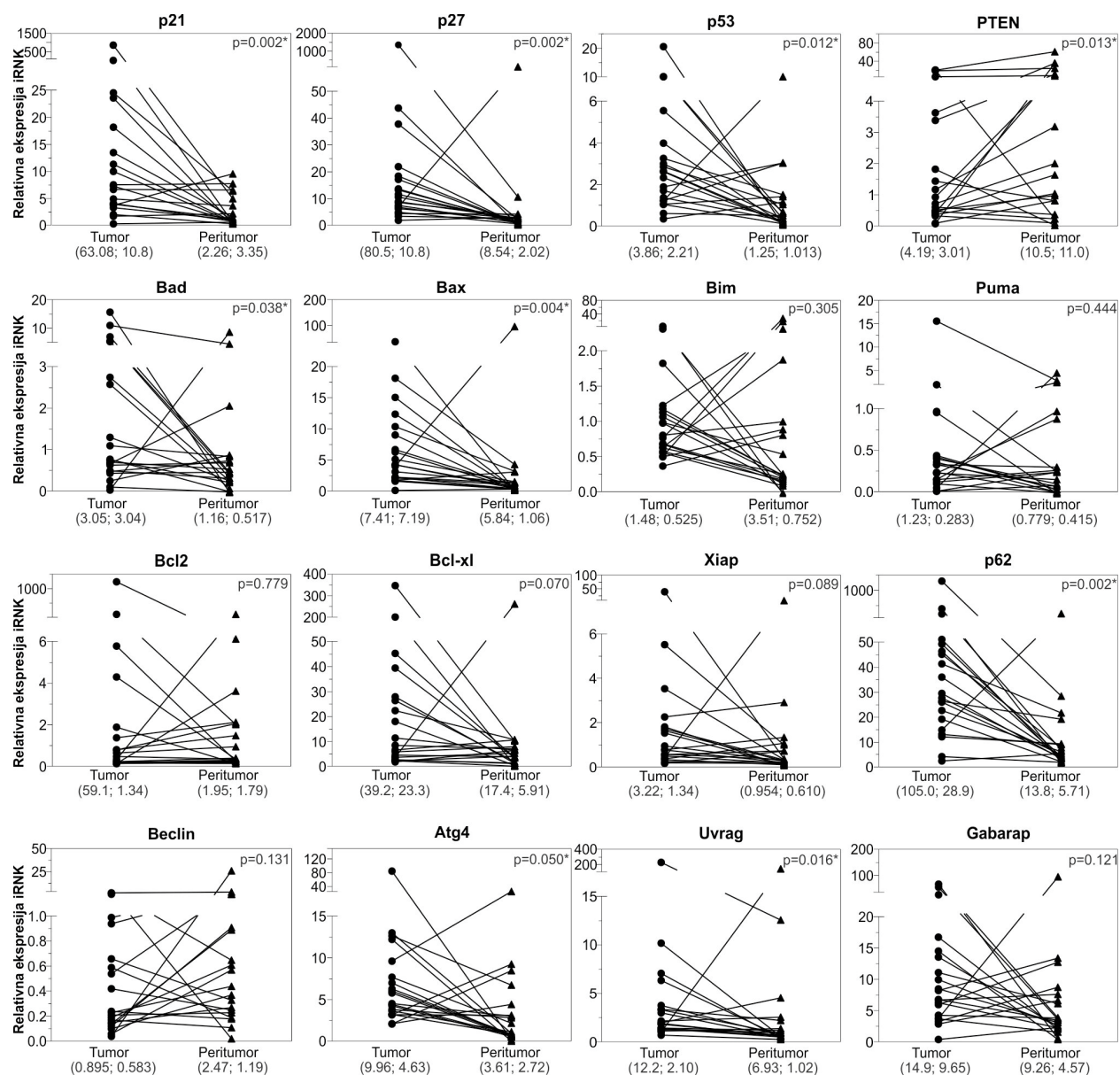
	n (%)	5-to godišnje preživljavanje		<i>p</i> vrednost ^a
		Da 12 (60%)	ne 8 (40%)	
pol				
muški	13 (65%)	8 (40%)	5 (25%)	1.000
ženski	7 (35%)	4 (20%)	3 (15%)	
pušenje				
da	10 (50%)	5 (25%)	5 (25%)	0.650
ne	10 (50%)	7 (35%)	3 (15%)	
uzrast (godine)				
< 60	7 (35%)	5 (25%)	2 (10%)	0.642
> 60	13 (65%)	7 (35%)	6 (30%)	
veličina tumora (cm)				
≤ 5	8 (40%)	6 (30%)	2 (10%)	0.373
> 5	12 (60%)	6 (30%)	6 (30%)	
gradus tumora				
1 i 2	11 (55%)	6 (30%)	5 (25%)	0.670
3 i 4	9 (45%)	6 (30%)	3 (15%)	
TNM stadijum				
1 i 2	8 (40%)	8 (40%)	0 (0%)	0.005*
3 i 4	12 (60%)	4 (20%)	8 (40%)	
metastaze				
da	10 (50%)	2 (10%)	8 (40%)	0.001*
ne	10 (50%)	10 (50%)	0 (0%)	

Procenjeno za 5-to godišnje preživljavanje; Fisher-ov test tačne verovatnoće

4.4. Ekspresija gena za apoptozu i autofagiju kod ccRCC-a

U cilju ispitivanja ekspresije iRNK gena uključenih u regulaciju apoptoze i autofagije koristili smo RT-qPCR. Ekspresija iRNK u tumorskom ccRCC i peritumorskom tkivu je praćena za šest članova BCL2 familije regulatora apoptoze (BAX, BAD, BAK1, BCL2, BIM, i BCLXL), četiri tumor supesor gena (CDKN1A, CDKN1B, PTEN, TP53), inhibitor apoptoze XIAP, aktivator apoptoze PMAIP1 i pet proautofagnih medijatora (ATG4B, BECN1, GABARAP, SQSTM1, i UVRAG). Analizom ekspresije iRNK za pomenute gene dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 10.

Grafikon 10- Ekspresije iRNK u ccRCC tumorskom i peritumorskom tkivu



Analizirajući ekspresiju iRNK gena uključenih u regulaciju apoptoze, uočava se da su nivoi iRNK za tumor supresor gene p21, p27, p53 i proapoptotske molekule BAX, BAD, su bili veći u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo. Pri tome je ovaj porast statistički bio značajan za p21, p27, p53, PTEN, BAD i BAX ($p < 0,05$). Istovremeno je ekspresija iRNK za tumor supresor PTEN bila značajno niža u tumorskom tkivu ($p < 0,05$). Za ostale ispitivane gene nije pokazana značajna razlika u ekspresiji ($p > 0,05$).

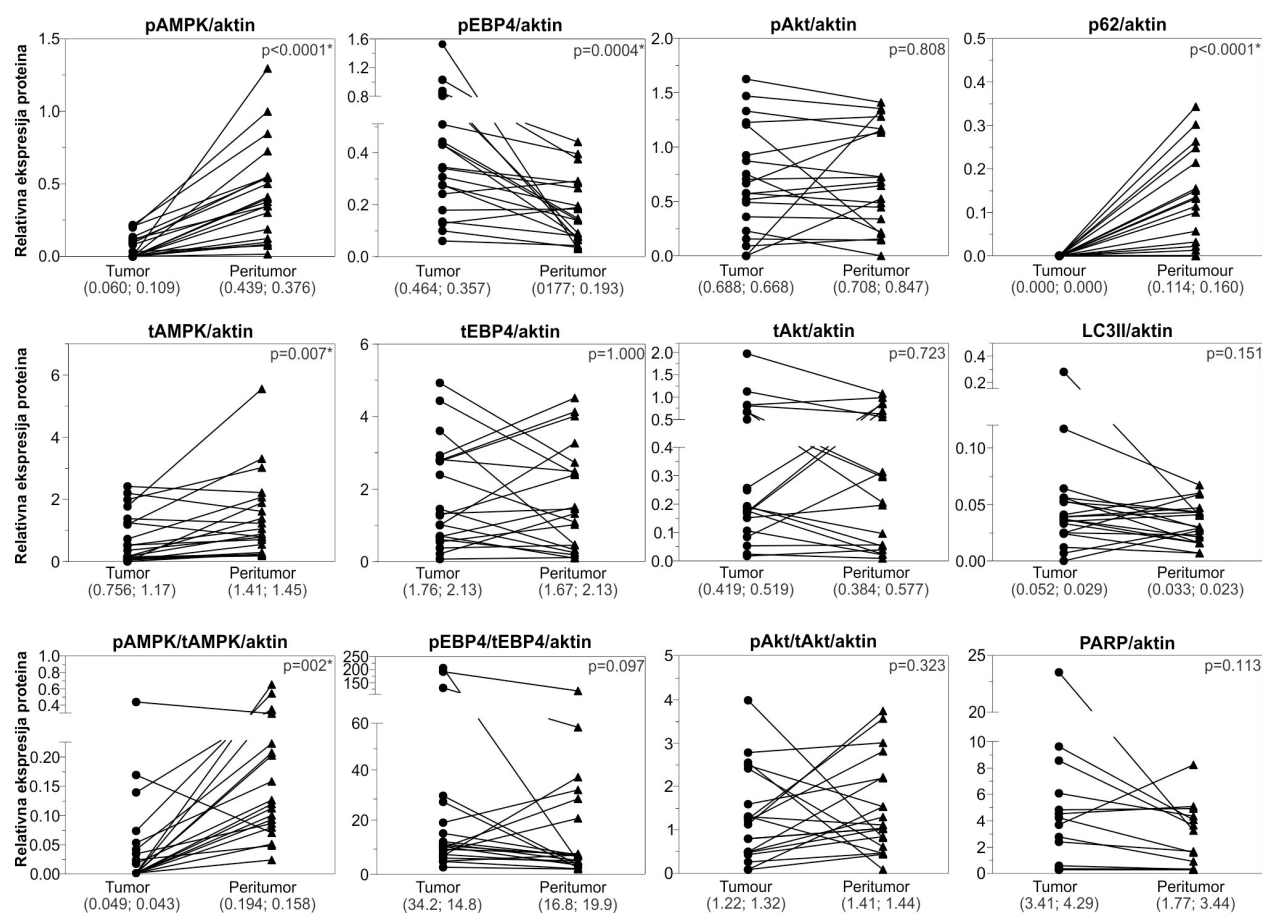
Nivoi ekspresije iRNK aktivatora autofagije ATG4, p62 i UVRAG bili su statistički značajno viši u tkivu ccRCC ($p < 0,05$) dok u slučaju BECN1 i GABARAP ekspresije iRNK statistički značajna

povezanost nije registrovana, (Grafikon 10). Rezultati koji su dobijeni ukazuju na transkripcionu aktivaciju regulatora apoptoze i autofagije kod svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija.

4.5. Aktivacioni status autofagije, apoptoze i AMPK/mTORC1 puta u ccRCC

Aktivacioni status autofagije, apoptoze u ccRCC-u analiziran je imunoblotom. (Grafikon 11). Ekspresija analiziranih proteina je prikazana na grafikonu 11.

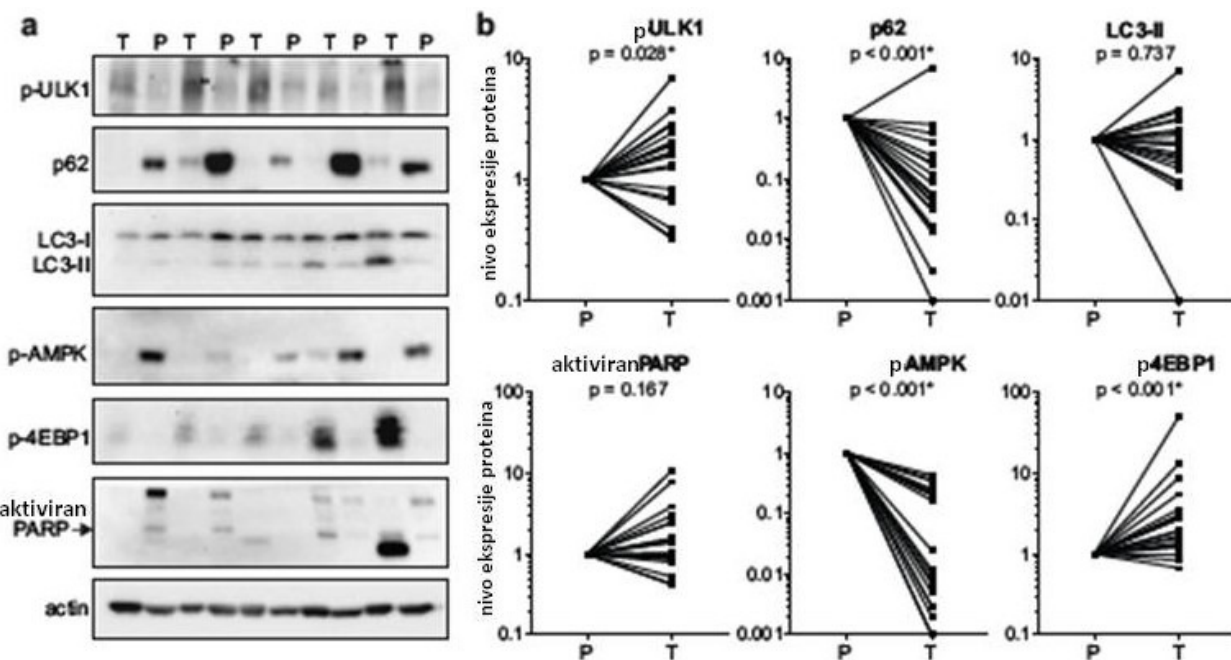
Grafikon 11- Ekspresija proteina uključenih u inicijaciju i regulaciju apoptoze i autofagije određena imunoblotom



Iz prikazanih vrednosti zapaža se da je ekspresija pAMPK, p62 statistički značajno niža u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo dok je ekspresija pEBP4 statistički značajno viša u tumorskom u odnosu na perotumorsko tkivo.

Aktivacioni status AMPK/mTORC1 signalnog puta, kao osnovnog signalnog puta uključenog u regulaciju autofagije u ccRCC kao i proteina uključenih u regulaciju apoptoze prikazan je na grafikonu 12.

Grafikon 12 - Aktivacioni status AMPK/mTORC1 signalnog puta i proteina uključenih u regulaciju apoptoze i autofagije. Reprezentativni imunoblottovi su prikazani na slici A dok je odgovarajuća denzitometrijska analiza prikazana na slici B.



Fosforilacija ULK1 na Ser317, koja inicira kaskadu autofagije, bila je značajno povišena, dok su nivoi p62, autofagnog prenosnog receptora u autofagolizozomima, bili sniženi u ccRCC u odnosu na peritumorsko tkivo (Grafikon 12). Nivoi autofagozom vezujućeg LC3B-II kao i vezujućeg PARP kao apoptotskog markera nisu se statistički značajno razlikovali izmedju tumorskog i peritumorskog tkiva. Uprkos očiglednoj indukciji autofagije, nivoi fosforilisane, aktivne forme AMP zavisne protein kinaze (AMPK), unutarćelijskog energetskog senzora i induktora autofagije bili su značajno sniženi u ccRCC (Grafikon 11, 12). Prema tome, fosforilacija 4EBP1, represora transkripcije koji se nalazi pod kontrolom AMPK i mTORC1, bila je značajno viša u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo (Grafikon 11, 12). Dakle, transkripciona indukcija autofagije kod ccRCC udružena je sa AMPK/mTORC1- nezavisnom ULK1 aktivacijom i povećanjem autofagnog fluksa ali ne i apoptozom, obzirom da nije pokazana značajna razlika u ekspresiji PARP izmedju tumorskog i peritumorskog tkiva.

4.6. Povezanost regulatora apoptoze i autofagije sa kliničkopatološkim karakteristikama ccRCC

U daljem toku istraživanja smo ispitivali moguću povezanost regulatora apoptoze i autofagije u ccRCC u odnosu na gradus, stadijum i veličinu tumora, kao i pojavu metastatskih promena i preživljavanje. Primenom Mann-Whitney U testa, nisu uočene statistički značajne razlike u ekspresiji gena za apoptozu odnosno aktivacije PARP koje su analizirane nakon što su pacijenti grupisani prema tumorskom gradusu, stadijumu i veličini tumora. (Tabela 15)

Tabela 15. Povezanost medijatora apoptoze i kliničkopatoloških karakteristika ccRCC

	<i>BAD^a</i>	<i>BAX^a</i>	<i>BIM^a</i>	<i>BCL2^a</i>	<i>BCLXL^a</i>	<i>PARP^b</i>
TNM stadijum						
1 i 2	7.1 (13) ^c	9.0 (31)	3.9 (6.3)	1.7 (20)	6.6 (22)	2.0 (1.8)
3 i 4	1.1 (14)	3.7 (4.0)	1.3 (6.6)	0.50 (4.0)	2.0 (34)	0.93 (0.60)
<i>p</i> vrednost ^d	0.115	0.115	0.208	0.384	0.678	0.082
Gradus tumora						
1 i 2	3.2 (14)	4.2 (12)	3.3 (4.6)	0.50 (11)	1.9 (11)	1.4 (1.5)
3 i 4	2.9 (19)	5.8 (48)	3.1 (5.1)	0.63 (12)	2.4 (76)	0.88 (2.7)
<i>p</i> vrednost	0.941	0.710	0.882	0.552	0.331	0.456
veličina tumora						
≤5 cm	14 (21)	9.0 (37)	4.4 (7.0)	5.7 (40)	13 (30)	0.90 (1.7)
>5 cm	1.3 (5.3)	3.3 (4.5)	1.3 (4.1)	0.37 (2.4)	1.5 (8.5)	1.4 (2.6)
<i>p</i> vrednost	0.069	0.082	0.181	0.115	0.181	0.157
metastaze						
da	1.9 (19)	3.7 (13)	0.70 (19)	0.63 (79)	2.2 (54)	0.93 (1.0)
ne	3.9 (12)	7.3 (18)	3.6 (3.2)	0.48 (4.7)	1.8 (12)	1.5 (2.2)
<i>p</i> vrednost	0.481	0.315	0.353	0.579	0.684	0.143
5-to godišnje preživljavanje						
da	3.9 (13)	7.3 (31)	4.1 (3.8)	0.57 (8.6)	2.1 (13)	1.5 (1.9)
ne	1.9 (14)	2.8 (3.2)	0.53 (3.6)	0.50 (36)	1.6 (31)	0.93 (0.5)
<i>p</i> vrednost	0.427	0.057	0.057	0.910	0.734	0.238

Sa druge strane, u slučaju proautofagnih gena ekspresije iRNK za ATG4, GABARAP i p62 udružene su sa nižim stadijumom tumorske bolesti dok je ekspresija iRNK u slučaju ATG4 i p62 u korelaciji

sa manjim dimenzijama tumora i boljim specifičnim 5-to godišnjim preživljavanjem. (tabela 16). Niži nivoi ekspresije p62 proteina u tumorskom tkivu, koji govore u prilog njegove razgradnje kroz povišeni autofagni fluks, bile su povezane sa nižim stadijumom tumora, sniženom stopom razvoja postoperativnih metastaza i dužim 5-to godišnjim preživljavanjem (tabela 16). Dobijeni rezultati ukazuju da su indukcija autofagije i povišeni autofagni fluks, ali ne i apoptoza, udruženi sa nižim stadijumom bolesti, veličinom tumora i metastatskim potencijalom, kao i dužim preživljavanjem pacijenata sa ccRCC.

Tabela 16. Povezanost medijatora autofagije i kliničkopatoloških karakteristika ccRCC

	<i>ATG4^a</i>	<i>BECN1^a</i>	<i>GBRP^a</i>	<i>p62^a</i>	<i>UVRAG^a</i>	<i>LC3-II^b</i>	<i>p62^b</i>	<i>p-ULK^b</i>
TNM stadijum								
1 i 2	7.5 (9.1) ^c	1.3 (5.2)	5.2 (8.4)	9.0 (17)	4.5 (22)	1.1 (1.1)	0.037 (0.073)	1.5 (1.8)
3 i 4	1.6 (6.4)	0.43 (0.94)	0.74 (2.7)	5.6 (18)	2.2 (14)	0.64 (1.6)	0.15 (0.50)	1.9 (0.81)
<i>p</i> vrednost ^d	0.031*	0.270	0.039*	0.343	0.270	0.571	0.047*	0.734
Gadus tumora								
1 i 2	3.6 (7.0)	0.85 (1.7)	3.1 (10)	6.5 (23)	1.6 (15)	0.67 (1.5)	0.12 (0.049)	1.7 (1.6)
3 i 4	7.6 (9.9)	0.56 (1.4)	1.1 (5.9)	13 (17)	4.9 (14)	0.85 (0.89)	0.010 (0.23)	1.7 (2.2)
<i>p</i> vrednost	0.412	0.824	0.201	0.503	0.456	0.941	0.261	0.882
Veličina tumora								
≤ 5 cm	8.5 (7.1)	1.2 (2.2)	6.3 (15)	18 (23)	7.6 (16)	0.84 (1.3)	0.038 (0.088)	1.5 (1.0)
> 5 cm	1.7 (3.0)	0.31 (1.0)	1.4 (3.5)	2.8 (7.4)	1.5 (6.5)	0.79 (1.1)	0.13 (0.47)	2.2 (2.4)
<i>p</i> vrednost	0.020*	0.082	0.181	0.010*	0.157	0.792	0.238	0.305
Metastaze								
Da	1.6 (108)	0.31 (1.1)	1.4 (104)	7.5 (39)	7.6 (20)	0.72 (0.93)	0.15 (0.47)	2.0 (1.5)
Ne	6.7 (6.2)	1.1 (1.3)	3.1 (6.1)	8.2 (13)	3.3 (4.2)	1.0 (1.4)	0.031 (0.01)	1.3 (1.3)
<i>p</i> vrednost	0.218	0.315	0.631	0.796	0.796	0.739	0.043*	0.123
5.to god. Preživljav.								
Da	7.5 (8.8)	1.1 (0.67)	3.1 (5.8)	10 (8.6)	3.8 (5.9)	0.88 (1.1)	0.038 (0.65)	1.3 (1.6)
Ne	0 .91 (2.5)	0.29 (0.53)	0.66 (14)	1.7 (30)	2.9 (18)	0.58 (1.6)	0.21 (0.002)	2.0 (1.1)
<i>p</i> vrednost	0.012*	0.082	0.238	0.238	0.473	0.678	0.016*	0.181

Primenjen Mann-Whitney U test

5. DISKUSIJA

Karcinom bubrežnih ćelija (RCC) je veoma heterogena i složena bolest sa veoma različitom prognozom. Klinički ishod RCC se može poboljšati usmeravanjem terapije na molekularne mehanizme koji su odgovorni za rast i progresiju tumora u okviru individualnog pristupa pacijentu. Trenutno se prognoza procenjuje na osnovu histološkog podtipa bolesti, gradusa bolesti, stadijuma bolesti uz procenu statusa limfnih čvorova odnosno postojanja metastatskih promena. Ipak nedvosmisleno je pokazano da i druge karakteristike bilo pacijenta bilo tumora utiču na ishod bolesti. Tako da dodavanje drugih varijabli uz već postojeće parametre može poboljšati predviđanje ishoda bolesti. Karcinom svetlih ćelija (clear cell type) predstavlja najčešći histološki tip karcinoma bubrežnih ćelija i javlja se u više od 70% slučajeva. Radi se malignoj neoplazmi sačinjenoj od ćelija sa svetlom i/ili eozinofilnom citoplazmom, obično dobro vaskularizovanom. Makroskopski ovaj tip tumora je zlatno-žute boje i čvrsto ovičen fibroznom kapsulom. Ultrastrukturne i imunohistohemijske karakteristike tumorskih ćelija ukazuju da nastaje malignom transformacijom epitela proksimalnih tubula. Gubitak dela hromozoma 3p i mutacija von Hippel-Lindau (VHL) gena na hromozomu 3p25 se često javljaju. Gubitak funkcije von Hippel-Lindau proteina u korelaciji je sa nastankom i progresijom tumora kao i pojavom metastaza (32). Svetloćelijski tip RCC (ccRCC) generalno ima lošiju prognozu u poredjenju sa papilarnim RCC (pRCC) i hromofobnim (chRCC), ali prognoza prvenstveno zavisi od stadijuma i gradusa bolesti.

Translaciona istraživanja u poslednjih 10 godina pružila su bolji uvid u biološke mehanizme koji su odgovorni za razvoj i progresiju bolesti. Nove tehnologije su omogućile profilisanje ekspresije gena i proteina a time i sveobuhvatnu identifikaciju i razumevanje molekularnih puteva uključenih u nastanak i razvoj RCC koji se dalje mogu koristiti i kao dijagnostičke ali i terapijske mete za ovaj tumor.

Postoji nekoliko molekularnih markera za koje je, do sada, pokazan potencijalni prognostički značaj. (147,148,149,150). Prognostički značaj VHL i HIF-1a su kontroverzne (151,152). Ekspresija VEGF je povezana sa agresivnijim tumorskim fenotipom pa se upravo očekivano VEGF pokazao i kao značajan prediktor ishoda u nekoliko studija (153,154). Pokazano je da su Ki-67 kao i povišena aktivnost matriksne metaloproteinaze 2 i 9 nezavisni negativni prediktorni faktori RCC. Studije sa tkivnim markerima su veoma obećavajuće, ali su skoro sve zasnovane na retrospektivnim serijama sa malom veličinom uzorka i relativno kratkim vremenom praćenja pacijenata. Pored toga, pouzdanost testa koji se koristi za detekciju markera predstavlja još jedno ograničenje ovih studija jer postoji veliki broj varijabli (izbor antitela, koncentracija antitela, tehnike fiksiranja, varijabilnost u kriterijumu tumačenja i stratifikacije...) koje mogu da doprinesu različitim rezultatima. Sa druge strane, u literature ima malo dostupnih podataka o prognostičkim molekularnim markerima kao što su mTOR, ribozomalni protein S6 i fosfataza PTEN. Takodje u literature postoje nekonzistentni podaci o prediktivnoj vrednosti pozitivnog p53 bojenja u RCC, koja, u većini dostupnih studija ukazuje na lošiji ishod bolesti (153).

Značaj molekularnih markera je višestruk. Oni mogu da se koriste za skrining, dijagnozu ili praćenje RCC. Medjutim za sada nema dovoljno podataka kojima bi mogla da se dokaže njihova opravdana rutinska klinička primena. Imajući u vidu postojeće probleme u ranoj dijagnostici i praćenju pacijenata kao i u proceni ishoda bolesti, cilj ovog istraživanja je bio da na većem uzorku pacijenata uz duže vreme praćenja pacijenata ispita i ukaže na potencijalni značaj imunohistohemijskog ispitivanja ekspresije p53, survivina, VEGF i beta katenina kao kliničko-patološki relevantnih markera u praćenju i prognozi toka bolesti. Takodje, imajući u vidu da su markeri apoptoze i autofagije do sada malo ispitivani na nivou ekspresije gena i proteina, želeli smo da ispitamo aktivacioni status apoptoze i autofagije kao I AMPK/mTOR signalnog puta za koji je poznato da predstavlja glavni signalni put u kontroli autofagije ccRCC.

Prvi deo ovog istraživanje je obuhvatio ispitivanje ekspresije p53, VEGF, survivina i beta katenina imunohistohemijskom analizom tkiva RCC i ispitivanje njihove povezanosti sa različitim stadijumom/gradusom i ishodom bolesti.

P53 je ključni regulator ćelijskog ciklusa, činilac genetske stabilnosti i faktor koji indukuje prekid ćelijskog ciklusa ili apoptozu u slučaju oštećenja DNK (155). Mutacije p53 su odgovorne za nekontrolisanu proliferaciju tumorskih ćelija i progresiju maligniteta. Uprkos tome što je je jedan od najproučavanijih molekula u nauci prvenstveno onkologiji, uticaj p53 na razvoj i prognozu RCC-a još uvek nije potpuno jasan. Imunohistohemijska detekcija p53 proteina mogla bi se dovesti u vezu sa mutacijom p53 (156).

Nivo ekspresije p53, odnosno njegova pojačana ekspresija kod pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija (RCC) veoma se razlikuje u do sada sprovedenim istraživanjima, i kreće se izmedju 5.98% i 42% (157-160). Molekularna i ispitivanja tumorskog genoma registrovala su p53 mutacije u <10% slučajeva papilarne (pRCC) i svetloćelijske forme RCC-a (ccRCC), i u više od 30% slučajeva hromofobnog tipa RCC-a (chRCC) (161,162). Zigeuner i saradnici registrovali su u svom istraživanju povišenu ekspresiju p53 kod 11.9% ccRCC, 70% pRCC i 27.3% chRCC slučajeva, što je statistički značajno (160). Sa druge strane, studija Baytekin-a i saradnika, nije pokazala statistički značajnu razliku izmedju ekspresije p53 i histološkog tipa RCC. (159). U našem istraživanju, pozitivno bojenje na p53 registrovano je u 36.7% tumorskih isečaka. Povišena ekspresija p53 registrovana je 31% slučajeva ccRCC, 56% slučajeva pRCC, i 14.3% slučajeva chRCC, uz utvrdjenu statističku značajnost ($p=0.041$). Različiti putevi kancerogeneze mogli bi da objasne ovu razliku u ekspresiji p53 u odnosu na različite podtipove RCC-a. U našem istraživanju registrovana je statistički značajna povezanost hiperekspresije p53 i postojanja sarkomatoidne dediferencijacije svetloćelijskog tipa RCC (ccRCC) što odgovara rezultatima studije Oda i saradnika, koji su ukazali na to da je hiperekspresije p53 od kritičnog značaja za sarkomatoidnu transformaciju RCC-a (163).

U našem istraživanju konstatovali smo povezanost povišene ekspresije p53 i nekoliko kliničkopatoloških parametara, kao što su veličina tumorske promene, >7 cm, visok stadijum, visok gradus bolesti i ukupno preživljavanje. Rezultati naše studije su saglasni sa rezultatima više

autora, čija su istraživanja takodje istakla značajan uticaj povišene ekspresije p53 i njenu povezanost sa ukupnim, kancer specifičnim preživljavanjem kao i pojavom odnosno odsustvom recidiva bolesti (160,164-167). Meta analiza koja je učinjena 2017. godine, a koja je uključila ukupno 2013 pacijenta iz 22 studije, pokazala je da je povišena ekspresija p53 udružena sa kraćim ukupnim preživljavanjem, kraćim kancer-specifičnim preživljavanjem, višim TNM stadijumom i višim Fuhrmanovim gradusom bolesti (168). Sa druge strane postoje i brojna istraživanja koja nisu ustanovila značajnu vezu p53 imunoreaktivnosti i kliničkopatoloških parametara ispitivanih RCC karcinoma (157,159, 169).

Survivin igra važnu ulogu u inhibiciji apoptoze i regulaciji ćelijske deobe. Inhibicija apoptoze vezana je za karcinogenezu, tumorsku progresiju ali i rezistenciju tumorskih ćelija na hemioterapiju (170). U normalnim uslovima, surviving pokazuje ekspresiju samo tokom embrionalnog razvoja. Prisustvo ekspresije survivina kod tkiva odraslih bilo je predmet istraživanja različitih maligniteta kao što karcinomi pluća, ovarijuma, kolona, mokraćne bešike i prostate (171).

Nivo ekspresije survivina kod pacijenata sa RCC-om prema literaturnim podacima varira između 24% i 79% (159, 172-174). U našoj studiji on je iznosio 24.4%. Prethodno sprovedena istraživanja nisu pronašla korelaciju između ekspresije survivina i histološkog podtipa RCC-a (159,172). U našem istraživanju rezultati govore u prilog statistički značajne razlike u hiperekspresiji survivina u odnosu na podtip RCC-a, uz predominantnu ekspresiju u papilarnom tipu (pRCC). Iako smo pronašli statistički značajnu razliku u ekspresiji survivina između papilarnog tipa I i tipa II RCC tumora, ove rezultate moramo posmatrati sa rezervom obzirom na relativno mali broj ispitanika. Veći broj studija kao i dve sprovedene meta-analize pokazale su povezanost ekspresije survivina i višeg stadijuma i gradusa bolesti (172-177). Statističkom obradom podataka dobijenih našim istraživanjem konstatovali smo da je ekspresija survivina povišena kod viših stadijuma (stadijum III i IV) i gradusa bolesti (Gr III i IV) u odnosu na niže stadijume i graduse ali značajna statistička razlika nije nadjena. Rezultati našeg istraživanja obradjeni Kaplan-Meier analizom pokazali su da je ukupno preživljavanje pacijenata, kod kojih je postojala pojačana ekspresija survivina, bilo statistički značajno kraće nego u grupi pacijenata bez ekspresije što je u saglasju sa dostupnom literaturom (172-177).

Postoji hipoteza da poremećena regulacija p53 može biti udružena sa ekspresijom survivina kod različitih maligniteta kao što je to slučaj u hepatocelularnom i karcinomu pluća (178,179). Sah i saradnici smatraju da je funkcionalni gubitak "wild" tipa p53 često udružen sa pojačanom regulacijom survivina (180). Izmenjena forma p53 ne suprimira anti-apoptotsku funkciju survivina, već stimuliše disregulaciju ćelijskog ciklusa i moguću proliferaciju tumorskih ćelija. U našoj studiji, pozitivna korelacija između akumulacije p53 i pojačane ekspresije survivina u uzorcima tumorskog tkiva RCC-a nije pronađena.

Svedoci smo činjenice da su konvencionalni klinički i patohistološki parametri često nedovoljne prognostičke vrednosti kod pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija, te je stoga veći broj

različitih studija ispitivao p53 i survivin kao potencijalne molekularne prediktore ishoda bolesti. Imunohistohemijska procena ovih proteina pri postavljanju primarne dijagnoze RCC-a može pomoći u uspostavljanju postoperativnog praćenja baziranog na molekularnom nivou sa ciljem da se prepoznaju pacijenti sa lošijom prognozom bolesti. U našem istraživanju konstatovali smo da je povećana ekspresija p53 bila statistički značajno u korelaciji sa stadijumom bolesti, nuklearnim gradusom, sarkomatoidnom dediferencijacijom i kraćim ukupnim preživljavanjem. Ekspresija survivina takodje je povezana sa lošijom prognozom bolesti. Ovakvi nalazi ukazuju da su pojačana ekspresija p53 i survivina prediktori nepovoljne prognoze RCC-a. Ipak prognostični značaj ovih proteina za karcinom bubrežnih ćelija i dalje je kontroverzan obzirom na nekonzistentnost i kontradiktornost podataka iz literature. Nedostatak standardizovanih tehnika u imunohistohemijskim analizama, reflektuje se u korišćenju različitih monoklonalnih antitela kao i različitim "cut-off" vrednostima bojenja u istraživanjima a često i nedovoljno veliki broj ispitanika u studijama, su verovatno faktori koji vode u nekonzistentnost zaključaka.

Beta katenin je multifunkcionalni glikoprotein uključen u različite ćelijske funkcije. Ima svoju ulogu u ćelijskoj adheziji, ćelijskom signalnom putu kao i regulaciji transkripcije gena, važnim događajima kako u normalnom razvoju ćelije tako i u kancerogenezi. Istraživanja su pokazala da je primarna uloga beta katenina u ćelijskoj adheziji gde vezujući citoplazmatski domen katherina za alfa katenin, praktično učvršćuje adhezioni kompleks za citoskelet. Beta katenin učestvuje kao medijator u interakciji između katherina i drugih transmembranskih receptorskih proteina uključujući i receptor za epidermalni faktor rasta. Studije koje su sprovedjene poslednjih dvadeset godina dale su u najmanju ruku kontroverzne rezultate kada je u pitanju korelacija ekspresije beta katenina i stadijuma, gradusa odnosno prognoze bolesti i preživljavanja. Tako je studija Kima i saradnika iz 2000. godine pokazala da je do povišene ekspresije beta katenina došlo samo u grupi svetloćelijskog podtipa RCC i to u 22,7% slučajeva, dok u druge dve podgrupe RCC, papilarnom i hromofobnom nije zabeležena povišena ekspresija. Pored toga ova studija je pokazala da ne postoji statistički značajna povezanost hiperekspresije beta katenina i stadijuma i gradusa bolesti (181). Rezultati istraživanja Shimazui-a i saradnika govorili su u prilog tome da je pojačana ekspresija beta katenina u korelaciji sa lošijim specifičnim preživljavanjem i pojavom metastaza nakon nefrektomije (182). Nasuprot tome u studiji Bilima i saradnika iz 2000.godine snižena ekspresija beta katenina dovedena je u korelaciju sa višim tumorskim stadijumom correlated ($P < 0.05$) i pojavom metastaza u limfnim čvorovima ($p < 0.05$). A takodje statistički značajna je bila i povezanost ekspresije beta katenina i tumora niskog gradusa (gradus I) ($P = 0.005$) (183). U našem istraživanju pozitivno bojenje na beta katenin registrovano je u 55 od 90 tumorskih uzoraka (61,1%). Ekspresija beta katenina detektovana je u 67,2% ccRCC, 40,0% pRCC i 86,7% slučajeva chRCC. Primećena je statistički značajna korelacija između ekspresije beta katenina i histološkog podtipa RCC ($p=0,023$). Utvrđeno je statistički značajno povećanje ekspresije beta katenina u tumorima nižeg gradusa (I i II) u odnosu na tumore višeg gradusa (III i

IV), (77,6% prema 41,5%, $p < 0,0001$). Statistički značajna korelacija između ekspresije beta katenina i stadijuma bolesti nisu utvrđene ($p = 0,053$). Nasuprot tome, kod pacijenata kod kojih je utvrđena pojačana ekspresija beta katenina utvrđeno je statistički značajno duže preživljavanje ($p = 0,002$).

Vaskularni endotelni factor rasta (VEGF) ima značajnu ulogu u indukciji tumorske angiogeneze i predstavlja ključni faktor u patogenezi karcinoma bubrežnih ćelija, naročito njegove najčešće forme, svetloćelijskog RCC. U studiji koju su sprovedi Minardi i saradnici 2015. godine utvrđena je značajna statistička povezanost ekspresije VEGF i stadijuma bolesti ($p < 0,001$) kao i ekspresije VEGF i Fuhrmanovog gradusa bolesti ($p < 0,001$) koja je govorila tome da je pojačana ekspresija VEGF u jasnoj korelaciji sa lošijim specifičnim preživljavanjem ($p < 0,001$). (184). U istraživanju Jacobsena i saradnika nije pronađena statistički značajna korelacija ekspresije VEGF i histološkog podtipa RCC, konstatovana je značajna korelacija pojačane ekspresije i veličine tumorske promene odnosno stadijuma. Korelacija sa ukupnim preživljavanjem nije pronađena. (185). U našem istraživanju pozitivno bojenje na VEGF registrovano je u 31 od 90 tumorskih uzoraka (34.4%). Statistički značajna korelacija između ekspresije VEGF i histološkog podtipa tumora nije pronađena ($p = 0,253$). Daljom analizom ispitivana je razlika u ekspresiji VEGF u okviru samih podtipova RCC ali statistički značajna razlika u ekspresiji nije registrovana ni kod podtipova svetloćelijskog (ccRCC) ($p = 0,063$) ni kod različitih podtipova papilarnog RCC ($p = 0,241$). Nije primećena statistički značajno veća ekspresija VEGF kod tumorskih promena većih od 7cm ($p = 0,17$). Utvrđeno je statistički značajno povećanje ekspresije VEGF u tumorima visokog stadijuma u odnosu na tumore nižeg stadijuma (55% prema 18%, $p = 0,0002$). Utvrđeno je da pacijenti sa pojačanom ekspresijom VEGF-a imaju statistički značajno kraće preživljavanje ($p < 0,001$). Statistički značajne korelacije između ekspresije VEGF i drugih kliničko-patoloških parametara nisu pronađene.

Apoptoza i autofagija su genetski regulisane i evolucijski očuvane, imaju važnu ulogu u regulaciji života i smrti ćelija. (186) Autofagija može biti mehanizam koji ćeliji omogućava da preživi ali i mehanizam koji ćeliju može da ubije tako da je manipulacija autofagije predložena kao novi potencijalni terapijski pristup u nekim malignim stanjima. (187) U skladu sa ovim nalazom, smatra se da inhibicija autofagije u ccRCC može pokazati pozitivan terapijski efekat čak i sama po sebi ili deluje sinergistički sa uspostavljenom terapijom za lečenje RCC (188).

Već smo istakli da je jedan od najvećih problema u dijagnostici i terapiji karcinoma bubrega nedostatak pouzdanih biomarkera. S druge strane, svedoci smo problema hemorezistencije, što čini terapiju ove maligne bolesti još komplikovanije. Od načina regulacije i aktivacionog statusa apoptoze i autofagije može upravo da zavisi i kvalitet odgovora tumora na terapiju. Upravo zbog toga smo bili zainteresovani da ispitamo ekspresiju različitih gena uključenih u regulaciju apoptoze i autofagije u ccRCC, kao najčešćim oblikom RCC.

Apoptoza i geni uključeni u njenu regulaciju su značajni u kontroli karcinogeneze (189). Postoje brojni dokazi koji govore u prilog tome da poremećaj ravnoteže između ćelijske proliferacije i

ćelijske smrti dovode do nastanka tumora i da apoptoza korelira sa proliferacijom tumorskih ćelija (190). Do sada je kod RCC pokazana tesna povezanost između povišene progresije i proliferacije i apoptoze (191).

Kako programirana ćelijska smrt najčešće predstavlja molekularni mehanizam koji može da insukuje i sama antitumorska terapija, apoptoza upravo može biti i odgovorna za kvalitet odgovora tumorskih ćelija na terapiju. Zbog toga je izuzetno značajno ispitivanje ekspresije različitih gena koji su uključeni u njenu kontrolu. Kako je većina do sada publikovanih podataka zasnovana na rezultatima dobijenim u in vitro istraživanjima ili primenom imunohistohemije, ispitivanje genske ekspresije može dati značajan doprinos u boljem razumevanju i rešavanju problema koji obuhvata definisanje novih biomarkera i bolje razumevanje i prevazilaženje mehanizama hemorezistencije.

U cilju ispitivanja aktivacionog statusa apoptoze u ccRCC, istraživali smo ekspresiju iRNK u tumorskom ccRCC i peritumorskom tkivu za šest članova BCL2 familije regulatora apoptoze (BAX, BAD, BAK1, BCL2, Bim, i BCL-x1L), četiri tumor supresor gena (CDKN1A, CDKN1B, PTEN, TP53), inhibitor apoptoze XIAP i aktivator apoptoze PMAIP1. Pri tome si nivoi iRNK za tumor supresor gene p21, p27, p53 i proapoptotske molekule BAX, BAD bili veći u tumorskom u odnosu na peritumorsko tkivo. Pri tome je ovaj porast statistički bio značajan za p21, p27, p53, BAD i BAX ($p < 0,05$). Istovremeno je ekspresija iRNK za tumor supresor PTEN bila značajno niža u tumorskom tkivu ($p < 0,05$). Za ostale ispitivane gene nije pokazana značajna razlika u ekspresiji ($p > 0,05$).

Kao ciklin zavisne kinaze p21 i p27 su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa. (192,193) tako da gubitak njihove ekspresije može dovesti do nastanka različitih tumora. S tim u vezi, možemo da pretpostavimo da njihova povišena ekspresija u tumorskom tkivu ccRCC svakako nije u skladu sa malignim potencijalom ccRCC. Ali, takodje je pokazano da povećana ekspresija p21 i p27 upravo može da promoviše nastanak tumora. (194) I ove onkogene aktivnosti p21 se mogu pripisati njegovoj ulozi u inhibiciji apoptoze (195). Ovakvi kontraverzni podaci vezani za različit stepen ekspresije p21 i p27 This controversial finding of p21 and p27 su pokazane u mnogim malignim stanjima uključujući i RCC gde je povećana ekspresija ovog proteina p21 dokazana imunohistohemijskim bojenjem (196). Takodje je pokazano da povišena ekspresija p21/waf1/ cip1 ima prognostički značaj kako u lokalizovanom tako i u metastatskom tumoru RCC (197) ali ovakva povezanost nije dokazana za p27 (198). Sa druge strane, akumulacija p27 može imati negativne posledice u ishodu lečenja obzirom da efekat hemoterapije, između ostalog, zavisi i od broja ćelija koje su uključene u ćelijski ciklus. (199). Imajući u vidu primarnu fiziološku ulogu p21 i p27 verujemo da njihova povišena ekspresija, barem delimično, može biti odgovorna za hemorezistenciju ccRCC.

Ali, suprotno prethodnim nalazima da povišena ekspresija p21 i p27 u tkivu tumora doprinosi malignom potencijalu samog tumora, što je pokazano i u našem istraživanju, izgleda da akumulacija p27 i p21 u RCC može biti odgovorna i za nove pozitivne hemioterapijske efekte koji se zasnivaju na inhibiciji proliferacije i migracije ccRCC (200).

Pored povišene ekspresije p21 u tkivu ccRCC, naši rezultati su ukazali i na povišenu ekspresiju tumor supresornog gena p53, koji je regulator ekspresije p21. (201). Uzimajući u obzir kritičnu ulogu p53 u evoluciji tumora, više od 30 studija koje su se bazirale na primeni imunohistohemijskog bojenja su ispitivale značaj ekspresije p53 u proceni prognoze RCC (202) pri čemu se zaključilo da pozitivan status p53 pozitivno korelira sa pojavom recidiva i kraćim preživljavanjem. Takođe se p53 može koristiti kao prognostički marker procene histoloških podtipova RCC jer je njegova povećana ekspresija pokazana u primarnom i metastatskom RCC (203) što smo pokazali i u našoj studiji. Uzimajući dosadašnja saznanja u obzir, naš nalaz povišene ekspresije p53 na genskom nivou u ccRCC ukazuje na lošiju prognozu i ishod kod ovih pacijenata. Sa druge strane, p53 promovira apoptozu, (204) čime može doprineti boljoj senzitivnosti tumora na hemioterapiju koja deluje pokretanjem apoptoze.

Bax i Bad su proapoptotski molekuli koji su u našem istraživanju pokazali višu ekspresiju u ccRCC u odnosu na peritumorsko tkivo. Sa druge strane, u tkivu ccRCC, ekspresija Noxa je bila značajno niža. Dok Bax i Bad održavaju stabilnost mitohondrijalne membrane i sprečavaju oslobađanje citohroma c iz mitohondrija (205) uloga Noxa u procesu kancerogeneze se i dalje ispituje (206). U našoj studiji, Bax i Bad su imali veću ekspresiju u tumorskom tkivu ukazujući na značaj apoptoze u razvoju RCC, ali za razliku od drugih studija, mi nismo pokazali povezanost apoptoze i gradusa tumora (207).

Kako je Noxa jedan od p53 zavisnih gena koji posreduje u p53- indukovanoj apoptozi. Studije su pokazale da proizvod ovog gena može da se lokalizuje u mitohondrijama i da stupi u interakciju sa anti-apoptotičnim članovima porodice Bcl-2, što rezultira aktivacijom kaspaze-9 (208). Pošto je Noxa indukovana sa p53, ona može posredovati u apoptozi koja je izazvana genotoksičnim oštećenjem ili aktivacijom onkogenom. Zbog svega navedenog bismo očekivali da i Noxa pokazuje višu ekspresiju u tumorskom tkivu. Ali, suprotno tome, njena ekspresija u tumorskom tkivu ccRCC je niža u odnosu na peritumorsko tkivo. To se može objasniti mogućnošću da nivo ekspresije Noxa pored p53 zavisne regulacije takođe može biti regulisan p53 nezavisnim mehanizmima. (209). Do sada postoji vrlo malo podataka o povezanosti ekspresije Noxa i razvoja tumora u humanoj populaciji. Sa druge strane, Noxa se vrlo intenzivno ispituje kao meta delovanja različitih hemioterapijskih pristupa. Naime, kako proapoptotski molekuli mogu da promoviraju efekte hemioterapeutika, aktivacija Noxa može biti ključna u ćelijskom odgovoru na određene antitumorske protokole (210). S tim u vezi, snižena ekspresija Noxa u našem istraživanju može doprineti hemorezistenciji ccRCC.

Noxa je takođe kandidat za posrednika p53-indukovane apoptoze. Studije pokazuju da ovaj protein može da se lokalizuje u mitohondrije i da stupi u interakciju sa anti-apoptotičnim članovima porodice Bcl-2, što rezultira aktivacijom kaspaze-9 (203). Pošto su i Puma i Noka indukovani p53, oni mogu posredovati u apoptozi koja je izazvana genotoksičnim oštećenjem ili aktivacijom onkogenom

PTEN (engl. phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10) kodira protein koji ispoljava aktivnost fosfolipid fosfataze i koji je uključen u kontrolu različitih unutarćelijskih signalnih puteva. Upravo mehanizam kojim se objašnjava tumor supresorski efekat PTEN jeste inhibicija Ras/MAPkinaznog puta koji on kontroliše (211). Imunohistohemijske studije su pokazale da tokom karcinogeneze ccRCC dolazi do skoro potpunog gubitka ekspresije PTEN i da je ovo rani događaj u karcinogenezi ovog tumora. (212). Takodje je pokazano da gubitak ekspresije PTEN ukazuje na lošiji odgovor na hemoterapiju (213). Na osnovu dosadašnjih saznanja potrebna su dalja ispitivanja snižene ekspresije PTEN u tumorskom tkivu kao prognostičkog faktora za RCC.

Naša studija nadovezuje se na ranija saznanja o regulaciji autofagije ccRCC i proširuje ih tako što ukazuje na to da je transkripciona indukcija autofagije kod ovog tipa maligniteta povezana sa aktivacijom AMPK/mTORC1-nezavisnog ULK1 signalnog puta kao i sa povećanjem autofagnog fluksa. Indukcija autofagije nije u korelaciji sa apoptozom, nižim stadijumom tumorske bolesti, veličinom tumora i dužim preživljavanjem bez metastatske bolesti, što ukazuje na ulogu autofagije u usporavanju progresije i pojave metastatskih promena ccRCC.

Analiza iRNK koja je sadržana u 238 široko definisanih regulatora autofagije pokazala je da je čak 31 aktivator autofagije (uključujući ATG9B, ATG12, ATG16L2, i BNIP3) bio transkripciono obogaćen. Nasuprot tome samo 7 aktivatora (uključujući GABARAPL1), bilo je ispod nivoa ekspresije u zdravom bubrežnom tkivu. (214,215). Lista transkripciono aktiviranih proautofagijskih medijatora ccRCC je nedavno proširena sa BECN1, LC3, and ULK1 (216,217), kao i sa ATG4B, p62 i UVRAG koje smo i mi proučavali. Primećeno je povećanje proteinskih nivoa BECN1, LC3 i ULK1 u tumorskom tkivu (218,219). Medjutim druge studije su pokazale slabiju ekspresiju ATG7, BNIP3, BECN1 i LC3 kod ccRCC-a. (218-221). Prema tome, dok podaci o iRNK ukazuju na transkripcionu indukciju autofagije kod ccRCC, promenljivost rezultata dobijenih u pogledu proteinskih nivoa onemogućava izvodjenje zaključaka o opštem statusu autofagije kod ovog tipa bubrežnih maligniteta. Da bismo razjasnili ovo pitanje kombinovali smo iRNK i proteinska merenja kargo receptora p62 kako bismo utvrdili stepen njegove degradacije kao markera autofagijskog fluksa. Naši rezultati pokazuju da je povećana iRNK ekspresija p62 povezana sa opadanjem u njegovim proteinskim nivoima što ukazuje na efikasnu proteolizu p62 kao rezultat povećanja autofagijskog fluksa. Proteinski nivoi NBR1, koji je još jedan kargo receptor čija je ekspresija opadala tokom autofagije, takodje su bili smanjeni u tkivima ccRCC (222), ali zbog istovremenog opadanja transkripcije NBR1, ove rezultate je bilo teško protumačiti u kontekstu autofagijskog fluksa. Nismo uočili značajniju promenu u nivoima LC3-II, protein koji predstavlja marker autofagozoma. Ovo je najverovatnije stoga što su njegova sinteza i degradacija u autofagozomima uglavnom izjednačene (223). Povećana ekspresija autofagijskih gena u našem istraživanju može se povezati sa povećanjem iRNK koja u tumorskom tkivu kodira BAX, proapoptotskog člana porodice BCL2, što je u skladu sa ranijim nalazima (224). Medjutim, iRNK nivoi anti-apoptotskog BCLXL su takodje bili povišeno eksprimirani, što bi moglo makar

delimično da objasni odsustvo povećane aktivacije PARP, a što sve zajedno ukazuje na ograničenje apoptoze u tkivu ccRCC. Povećana ekspresija anti-apoptotskih članova porodice BCL2, uključujući BCLXL, mogla bi da doprinese razvoju otpornosti na apoptozu kod tumora bubrega (225,226).

Ključni akt za otpočinjanje autofagije je aktivacija ULK1, koji deluje kao čvorište u kojem se brojni signali pretvaraju u formaciju autofagozoma (227). Dok su i iRNK i proteinski nivoi ULK1 bili povećani kod ccRCC u odnosu na zdravo bubrežno tkivo (217), fosforilacija ULK1 kao mera njegove aktivacije nije bila ispitivana. Mi smo dokazali da je povećanje autofagijskog fluksa kod ccRCC praćeno povećanom fosforilacijom ULK1 na mestu aktivacije Ser317. ULK1 je fosforilisan na Ser317 uglavnom pomoću energetske senzora AMPK, koji takođe indirektno aktivira autofagiju inaktivacijom zavisnog kompleksa tuberozne skleroze mTORC1 i kasnijim oslobađanjem ULK1 iz supresije posredstvom mTORC1 (228). Ipak, opadanje nivoa aktivnog (fosforilisanog) AMPK i pridruženo povećanje fosforilacije mTORC usmerenog ka 4EBP1 govore protiv uključivanja AMPK/mTORC1 veze u aktivaciju ULK1 kod ccRCC. Jedan od kandidata za aktivaciju ULK1 nezavisno od AMPK je protein kinaza α (PKC α), koji može direktno da veže i fosforiluje ULK1 na AMPK mestu Ser317 (229). Premda se u studijama ukazuje i na sniženu ekspresiju PKC α u tkivima ccRCC (230) i na korelaciju između aktivacije PKC α i agresivnosti ćelijskih linija ccRCC (231), moguća uloga PKC α u aktivaciji ULK1 kod ccRCC treba da bude dodatno istražena. Što se tiče mogućeg uključivanja različitih molekula ATG u progresiju i ishod ccRCC, zapazili smo i povoljne i nepovoljne oblike udruživanja. Prema podacima iz Human Protein Atlas-a (232), visoki nivoi tumorske iRNK pro-autofagijskih AMBRA1, ATG4D, ATG7, ATG14, ATG18, ATG24A/B, GABARAPL1/L2, LC3B, NBR1 i VPS34 bili su prediktori dužeg ukupnog preživljavanja pacijenata sa ccRCC (tabela 17). Slično tome, grupisanjem pacijenata ccRCC prema nivou ekspresije sedam gena uključenih u nukleaciju autofagije, uključujući BECN1 i UVRAG, Liu i saradnici su uspeli da pokažu da je povećana ekspresija autofagijskih gena u tumorskom tkivu bila prediktor dužeg preživljavanja (220). Na proteinskom nivou postojala je korelacija između tumorske količine LC3-II i bolje prognoze (221). U skladu sa napred navedenim podacima, ekspresija nekoliko autofagijskih gena u našem istraživanju pokazala je korelaciju sa nižim stadijumom tumorske bolesti (ATG4B, GABARAP i p62), kao i sa manjom veličinom tumora i boljim izgledima za petogodišnje preživljavanje (ATG4B i p62). Štaviše, povezivanje niskih proteinskih nivoa p62 sa nižim stadijumom tumorske bolesti i boljim izgledima za petogodišnje preživljavanje ukazuje na to da je autofagijski fluks prediktor povoljnog ishoda bolesti, što se slaže sa prethodno iznetim podacima o korelaciji između nivoa p62 i višeg gradusa tumorske bolesti (233). Dokazano je da autofagija može da podstakne apoptozu tumorskih ćelija pod određenim uslovima (234).

Međutim, ekspresija gena apoptoze i rascepa PARP, nasuprot nivoima autofagije, nije bila u korelaciji sa kliničko-patološkim parametrima ccRCC, što ukazuje na to da autofagija utiče na progresiju ccRCC nezavisno od apoptoze. Alternativni mehanizmi obuhvataju inhibiciju

proliferacije tumorskih ćelija posredstvom autofagije i/ili izazivanje autofagijske ćelijske smrti. I jedan i drugi mehanizam su već uočeni kod mnogih drugih tipova tumorskih ćelija (235, 236). Takođe je na metastatskom modelu miša pokazano da autofagija ograničava migraciju i metastaze ćelija ccRCC na pluća (237), što je u skladu sa našim nalazima da je povećani autofagijski fluks, koji se ogleda u nižim nivoima p62, povezan sa smanjenom incidencijom postoperativnih metastaza.

Tabela 17 ATG nivoi iRNK kao prognostički markeri kod ccRCC (Human Protein Atlas data)

mRNA	proгноза	Hyperlink
<i>AMBRA1</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110497-AMBRA1/pathology/renal+cancer
<i>ATG4D</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130734-ATG4D/pathology/renal+cancer
<i>ATG7</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000197548-ATG7/pathology/renal+cancer
<i>ATG14</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000126775-ATG14/pathology/renal+cancer
<i>ATG18B</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157954-WIPI2/pathology/renal+cancer
<i>ATG24A</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000148158-SNX30/pathology/renal+cancer
<i>ATG24B</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000114520-SNX4/pathology/renal+cancer
<i>GABARAPL1</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139112-GABARAPL1/pathology/renal+cancer
<i>GABARAPL2</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000034713-GABARAPL2/pathology/renal+cancer
<i>LC3B</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140941-MAP1LC3B/pathology/renal+cancer
<i>NBR1</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188554-NBR1/pathology/renal+cancer
<i>VPS34</i>	+	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000078142-PIK3C3/pathology/renal+cancer
<i>ATG4B</i>	–	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168397-ATG4B/pathology/renal+cancer
<i>ATG5</i>	–	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000057663-ATG5/pathology/renal+cancer
<i>ATG12</i>	–	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000145782-ATG12/pathology/renal+cancer
<i>ATG16L1</i>	–	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000085978-ATG16L1/pathology/renal+cancer
<i>ATG16L2</i>	–	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168010-ATG16L2/pathology/renal+cancer
<i>BNIP3</i>	–	https://www.proteinatlas.org/ENSG00000176171-BNIP3/pathology/renal+cancer

+, visoka ekspresija iRNK kao povoljan prognostički marker; – visoka ekspresija iRNK kao nepovoljan prognostički marker

Nasuprot ovom i prethodnim istraživanjima, postoje dokazi koji potvrđuju ulogu autofagije kao faktora podsticanja razvoja tumora kod ccRCC. Prema podacima iz Human Protein Atlas-a, visoka ekspresija iRNK ATG4B, ATG5, ATG12, ATG16L1/L2 i BNIP3 je povezana sa smanjenim ukupnim izgledima za preživljavanje kod pacijenata sa ccRCC (tabela 17). Nepovoljna povezanost sa preživljavanjem pacijenata je takođe zabeležena i kod ULK1 iRNK ili proteinskih nivoa BNIP3 i BECN1 (238, 217). Iako ove uočene razlike nisu nužno vezane za uticaj ATG proteina na progresiju bolesti nezavisno od autofagije i/ili razlike u metodologiji istraživanja (npr proteinsko nasuprot iRNK merenja, RT-PCR nasuprot sekvencirane RNK, imunoblot nasuprot imunohistohemiji), one dodatno ističu sve nejasnoće u vezi sa ulogom autofagije kod ccRCC. Nejasnoće su potvrđene i u studijama ksenograftova ccRCC kod miševa, koje su pokazale i antitumorska i protumorska dejstva na autofagiju u različitim eksperimentalnim okruženjima (237, 239). Konačno, moguće je da funkcija autofagije zavisi od konkretnog konteksta, određenog gradusom i stadijumom tumorske bolesti, dubinom tumora (240). Moguće je i da njegov aktivacijski status i uloga u ponovnom javljanju, odnosno progresiji ccRCC zavise od tipa postoperativne terapije.

Očigledna slabost ovog istraživanja je relativno mali broj uzoraka. Ovo je iz razloga strogih kriterijuma odabira pacijenata koji su definisani tako da se izbegne mešanje efekata bolesti koje menjaju autofagiju i/ili različitih terapija. Kako bi se smanjio rizik izostanka pravih efekata (greška tipa II), nismo pravili nikakve korekcije kod višestrukih poređenja. Iako mu neki istraživači daju prednost (241, 242), ovaj pristup povećava rizik od uočavanja efekata koji zapravo nisu prisutni (greška tipa I). Svakako je da će u budućnosti biti neophodne dodatne studije sa većim brojem uzoraka, kako bi se bolje opisala uloga, kao i prognostički i terapijski značaj autofagije kod ccRCC.

6. ZAKLJUČCI

1. U tkivu RCC je prisutna ekspresije p53, VEGF, survivina i beta katenina. Ekspresija ovih proliferativnih markera korelira pozitivno sa stadijumom, gradusom bolesti osim beta katenina koji je pokazao negativnu korelaciju. Između analiziranih markera nije pokazana međusobna korelacija.
2. Ekspresija p53, VEGF, survivina pokazuje negativnu korelaciju sa dužim preživljavanjem dok ekspresija beta katenina pokazuje pozitivnu korelaciju. Indukcija autofagije i povišeni autofagni fluks, ali ne i apoptoza su udruženi sa dužim preživljavanjem pacijenatasa ccRCC.
3. U tkivu ccRCC pokazana je povećana ekspresija iRNK za p21, p27, p53 tumorsupresor gene, Bax i Bad antiapoptotskih gena dok je ekspresija tumor supresora PTEN bila viša u peritumorskom tkivu. Ekspresija iRNK za markere autofagije p62, Atg4 i Uvrag je bila viša u tumorskom tkivu ccRCC.
4. Analizom ekspresije proteina uključenih u inicijaciju i kontrolu apoptoze i autofagije je pokazano da je transkripciona indukcija autofagije kod ccRCC udružena sa AMPK/mTORC1- nezavisnom ULK1 aktivacijom i povećanjem autofagnog fluksa ali ne i apoptozom
5. Indukcija autofagije i povišeni autofagni fluks, ali ne i apoptoza, udruženi su sa nižim stadijumom bolesti, veličinom tumora i metastatskim potencijalom, kao i sa ccRCC

Kako u najnoviju klasifikaciju RCC nije uključen niti jedan od analiziranih proliferativnih markera, i markera apoptoze i autofagije, uzimajući u obzir dobijene rezultate koji su nedvosmisleno pokazali korelaciju njihove ekspresije sa stadijumom, gradusom i dužinom preživljavanja ali i ograničenje ove studije zbog relativno malog broja uzoraka, neophodna su dalja israživanja u cilju uvođenja nekog od analiziranih parametara kao prognostičkog markera u kliničku praksu.

7. LITERATURA:

1. Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*, 2018; 103: 356.
2. Capitanio U, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*, 2019; 75: 74.
3. Moch H, et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*, 2016; 70: 93.
4. Tahbaz R, et al. Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: lifestyle, medication and nutrition. *Curr Opin Urol*, 2018; 28: 62.
5. McLaughlin JK, Lipworth L, Tarone RE. Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2006; 33:527-533.
6. Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin J. The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *J Urol* 2006; 176:2353-2358.
7. Chow WH, Devesa SS. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. *Cancer J* 2008; 14:288-301.
8. Clague J, Lin J, Cassidy A et al. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(3):801-7.
9. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemenev LA. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2011;60(4):615-21
10. Pascral D, Borque A. Epidemiology of Kidney Cancer. *Adv Urol* 2008; 2008: 782381.
11. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2477-2490.
12. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer* 83, 1–1438.
13. Hunt, J.D., van der Hel, O.L., McMillan, G.P., Boffetta, P., Brennan, P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int. J. Cancer* 2005; 114, 101–108.
14. Bergstrom A, Hsieh CC, Lindblad P et al. Obesity and renal cell cancer – a quantitative review. *Br J Cancer* 2001; 85:984-990
15. Bergstrom A, Pisani P, Tenet V et al. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 2001; 91:421-430

16. Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M. et al, Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008; 371:569.
17. Callahan C, Hofmann N.J. et al. Obesity and renal cell carcinoma risk by histologic subtype: A nested case-control study and meta-analysis. *Cancer Epidemiology* 2018; 56:31-37
18. Chow WH, Gridley G, Fraumeni Jr JF, Jarvholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* 2000; 343:1305–11
19. Weikert S, Boeing H, Pischon T, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* 2008; 167:438–46.
20. Alexander DD, Cushing CA. Quantitative assessment of red meat or processed meat consumption and kidney cancer. *Cancer Detect Prev* 2009; 32:340-351
21. Lee JE, Spiegelman D, Hunter DJ et al. Fat, protein and meat consumption and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:1695-1706
22. Lee JE, Mannisto S, Spiegelman D, et al. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18: 1730–9.
23. Whang YE, Godley PA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2003; 15:213–6.
24. Enterline PE, Hartley J, Henderson V. Asbestos and cancer: a cohort follow-up to death. *Br J Ind Med* 1987; 44:396–401.
25. Kelsh MA, Alexander DD, Mink PJ, Mandel JH. Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer: a meta-analysis. *Epidemiology* 2010; 21:95–102.
26. Moore LE, Boffetta P et al. Occupational trichloroethylene exposure and renal carcinoma risk: evidence of genetic susceptibility by reductive metabolism gene variants. *Cancer Res*. 2010; 70(16): 6527–6536.
27. Srigley, J.R., Delahunt, B., Eble, J.N., Egevad, L., Epstein, J.I., Grignon, D., Hes, O., Moch, H., Montironi, R., Tickoo, S.K., Zhou, M., Argani, P., ISUP Renal Tumor Panel, 2013. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 1469–1489.
28. Eble, J.N., Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on Cancer (Eds.), 2006. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs: [... GSTA1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 polymorphisms in RCC editorial and consensus conference in Lyon, France, December 14 - 18, 2002], Reprint. ed, World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon

29. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Pathology and genetics. Tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2004.
30. Cheville JC, Blute ML, Zincke H, Lohse CM, Weaver AL. Stage pT1 conventional (clear cell) renal cell carcinoma: pathological features associated with cancer specific survival. *J Urol* 2001; 166:453–6
31. Algaba F, Trias I, Scarpelli M, Boccon-Gibod L, Kirkali Z, Van Poppel H. Handling and pathology reporting of renal tumor specimens. *Eur Urol* 2004; 45:437–43
32. Moch H, et al. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, ed. WHO. 2016, IARC, Lyon.
33. Linehan, W.M., et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2016; 374: 135.
34. Cinolo L, et al: Chromophobe renal cell carcinoma: comprehensive analysis of 104 cases from multicenter European database. *Urology* 2005; 65:681
35. Suzigan S, Lopez-Beltran A, Montironi R, et al. Multilocular cystic renal cell carcinoma: a report of 45 cases of a kidney tumor of low malignant potential. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:217–22.
36. Rumpelt HJ, Storkel S, Moll R, et al. Bellini duct carcinoma: further evidence for this rare variant of renal cell carcinoma. *Histopathology* 1991; 18:115–22.
37. Chao D, Zisman A, Pantuck AJ, Gitlitz BJ, Freedland SJ, Said JW, et al. Collecting duct renal cell carcinoma: clinical study of a rare tumor. *J Urol* 2002; 167:71–4.
38. Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, Kim HJ, Wieder JA, Figlin RA, et al. Unclassified renal cell carcinoma: clinical features and prognostic impact of a new histological subtype. *J Urol* 2002;168:950–5.
39. Patard, J.J., et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2003; 44: 226.
40. Novara, G., et al. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Eur Urol*, 2010; 58: 588.
41. Sacco, E., et al. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol Int*, 2009. 83: 1.
42. Kim, H.L., et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol*, 2003; 170: 1742.

43. Magera, J.S., Jr., et al. Association of abnormal preoperative laboratory values with survival after radical nephrectomy for clinically confined clear cell renal cell carcinoma. *Urology*, 2008; 71: 278.
44. Helenon O, Correas JM, Balleyguier C, et al. Ultrasound of renal tumors. *Eur Radiol* 2001; 11:1890–901.
45. Jayson, M., et al. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*, 1998; 51: 203.
46. Kang SK, Kim D, Chandarana H. Contemporary imaging of the renal mass. *Curr Urol Rep* 2011; 12:11–7.
47. Heidenreich A, Ravery V, European Society of Oncological Urology. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World JUrol* 2004; 22:307–15.
48. American College of Radiology. Practice guideline: CT abdomen and pelvis. Reston, VA: ACR; 2011.
49. Sheir KZ, El-Azab M, Mosbah A, El-Baz M, Shaaban AA. Differentiation of renal cell carcinoma subtypes by multislice computerized tomography. *J Urol* 2005; 174:451–5.
50. Vikram R, Ng CS, Tamboli P, et al. Papillary renal cell carcinoma: radiologicpathologic correlation and spectrum of disease. *Radiographics* 2009; 29:741–54.
51. Kang SK, Chandarana H. Contemporary imaging of the renal mass. *Urol Clin North Am* 2012; 39:161–70.
52. Israel, G.M., et al. Pitfalls in renal mass evaluation and how to avoid them. *Radiographics*, 2008; 28: 1325.
53. Pedrosa, I., et al. MR imaging of renal masses: correlation with findings at surgery and pathologic analysis. *Radiographics*, 2008; 28: 985.
54. Alle N, et al. Percutaneous image guided core biopsy of solid renal masses: analysis of safety, efficacy, pathologic interpretation and clinical significance. *Adbom Radiol (NY)* 2018; 43(7):1813
55. Harmer M. TNM classification of malignant tumors. ed. 3. Geneva: International Union Against Cancer; 1974.
56. Gospodarowicz, M.K., et al. The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer*, 2004; 100: 1.
57. Sun, M., et al. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol*, 2011; 60: 644.
58. Amin, M.B., et al., *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. 2017.

59. Méjean, A., Oudard, S., Thiounn, N. Prognostic factors of renal cell carcinoma. *J. Urol.* 2003; 169:821–827
60. Fuhrman, S.A., et al. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1982; 6: 655.
61. Dagher, J., et al. Clear cell renal cell carcinoma: validation of World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading. *Histopathology*, 2017; 71: 918.
62. Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, et al. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103:68–75.
63. Leibovich, B.C., et al. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. *J Urol*, 2010; 183: 1309.
64. de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *AmJ Surg Pathol* 2001; 25:275–84.
65. Lang, H., Lindner, V., Saussine, C., Havel, D., Faure, F., Jacqmin, D. Microscopic venous invasion: a prognostic factor in renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 2000; 38:600–605.
66. Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, et al. Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically non-metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1997; 158:45–9
67. Lockshin RA, Zakerib Z. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004; Volume 36, Issue 12, Pages 2405-2419
68. Oppenheim, R. W., Prevette, D., Tytell, M., Homma, S. Naturally occurring and induced cell death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: Evidence for the role of cell death genes. *Dev. Biol.* 1990; 138: 104-1369.
69. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S et al. Programmed Cell Death of Developing Mammalian Neurons after Genetic Deletion of Caspases. *J Neurosci.* 2001; 21(13): 4752–4760.
70. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(4):277-88
71. Saelens X, Festjens N et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 2004; 23(16):2861-74
72. Cai J, Yang J and Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1366(1-2):139-49.

73. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000; Vol. 102, 33–42
74. Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ and Vandenberghe P. *Cell Death Differ*. 2002; 9,1031–104
75. Hill MM, Adrain C et al. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*. 2004; 23(10):2134-45.
76. Schimmer A. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Research* 2004; 64:7183–7190
77. Li J and Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008; 27: 6194–6206
78. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391(6662):43-50.
79. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(9):647-56.
80. Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev E, et al. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol*. 2004 ; 173(5):2976-84
81. Xie Z, Klionsky DJ 2007. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9: 1102–1109
82. Kaushik S, Massey AC, Mizushima N, Cuervo A. Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. *Mol Biol Cell*. 2008; 19(5): 2179 – 2192.
83. Kim Y, Kim YS, Kim DE, Lee JS, Song JH, Kim HG, et al. BIX-01294 induces autophagy-associated cell death via EHMT2/G9a dysfunction and intracellular reactive oxygen species production. *Autophagy*. 2013; 9:2126– 39.
84. Rosenfeldt MT, Ryan KM 2009. The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 11: e36
85. Rosenfeldt MT, Ryan KM 2011. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 32: 955–963
86. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069–1075
87. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P 2010. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* 20: 748–762

88. Ding W., Ni H., Gao W., et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 2007; 282:4702 – 10
89. Reef S., Zalckvar E., Shifman O., et al. A short mitochondrial form of p10ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell* 2006; 22:463 – 75
90. Scherz-Shouval R., Snvets E., Fass E., Shorer H., Gil L., Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26:1749 – 60.
91. Cao Q, Bai P. Role of Autophagy in Renal Cancer. *Journal of Cancer*. 2019;10(11):2501-9
92. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*. 2008,11(1-2): 32-50
93. Guo H, German P, Bai S, Barnes S, Guo W, et al. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J Genet Genomics*. 2015; 42(7): 343–353
94. Creighton C.J, Morgan M, Gunaratne P.H, Wheeler D.A, Gibbs R.A, Robertson G et al. Comprehensive molecular characterizati-on of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013; 499:43–9.30
95. Duran, I.; Lambea, J.; Maroto, P.; González-Larriba, J.L.; Flores, L.; Granados-Principal, S.; Graupera, M.; Sáez, B.; Vivancos, A.; Casanovas, O. Resistance to Targeted Therapies in Renal Cancer: The Importance of Changing the Mechanism of Action. *Target. Oncol*. 2017, 12, 19–35.
96. Fan D, Liu Q, Wu F, Liu N, Qu H, Yuan Y et al. Prognostic signi-ficance of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway members in clear cell renal cell carcinoma. *PeerJ*. 2020; 8:9261.
97. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in can-cer. *Annual review of pathology*. 2009; 4:127-50.35.
98. Shin Lee J, Seok Kim H, Bok Kim Y, Cheol Lee M, Soo Park C. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *Journal of surgical oncology*. 2003; 84(3):166-72.
99. Brenner W, Farber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thuroff JW. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carci-nogenesis. *International journal of cancer*. 2002; 99(1):53-7.37.
100. Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene*. 2008; 27(41):5477-85.
101. Seo SU, Woo SM, Lee HS, et al. MTORC1/2 inhibitor and curcumin induce apoptosis through lysosomal membrane permeabilization-mediated autophagy. *Oncogene*. 2018; 37(38): 5205-5220

102. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, et al. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 2007;67(7): 3043-3053.
103. Haitel A, Wiener HG, Baethge U, et al. Mdm2 expression as a prognostic indicator in clear cell renal cell carcinoma: Comparison with p53 overexpression and clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(5): 1840-1844
104. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, et al. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: A systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology.* 2004; 63(4): 651-655
105. Warburton HE, Brady M, Vlatkovic N, et al. P53 regulation and function in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65(15): 6498-6503
106. Noon AP, Vlatkovic N, Polanski R, Maguire M, Shawki H, Parsons K et al. p53 and MDM2 in renal cell carcinoma: biomarkers for disease progression and future therapeutic targets? *Cancer.* 2010; 116(4):780-90.43.
107. Guo Y, Zhang HC, Xue S, Zheng JH. Receptors for advanced glycation end products is associated with autophagy in the clear cell renal cell carcinoma. *J. Canc. Res. Therapeut.* 2019; 15(2): 317–23.
108. Levi D, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Declining mortality from kidney cancer in Europe. *Ann Oncol* 2004; 15:1130-1135.
109. Prasad SR, Humphrey PA, Catena JR, Narra VR, Srigley JR, Cortez AD, Dalrymple NC, Chintapalli KN. Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation. *Radiographics* 2006; 26:1795-1810.
110. Bracarda S. Metastatic Renal Cell Carcinoma: Pathogenesis and the Current Medical Landscape. *Eur Urol Suppl* 2009; 8:787-792.
111. Rink M, Chun FK, Robinson B, Sun M, Karakiewicz PI, Bensalah K, Fisch M, Scherr DS, Lee RK, Margulis V, Shariat SF. Tissue-based molecular markers for renal cell carcinoma. *Minerva Urol Nefrol.* 2011; 63(4): 293-308
112. Ng CS, Wood CG, Silverman PM, Tannir NM, Tamboli P, Sandler CM. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging and Surveillance. *AJR* 2008; 191:1220-1232.
113. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353(23):2477-90
114. Motzer RJ, Hutson TE, Tomezak P, et al. Sunitinib versus interferon-alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:115-124.

115. Escudier B, Bellmunt J, Négrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S, Ravaud A, Golding S, Jethwa S, Sneller V. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol*. 2010; 28(13):2144-50
116. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:125-134.
117. Hudes G, Carducci M, Tomczak P et al. Temsirolimus, interferon-a, or both for advanced renal cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007; 356(22):2271-81
118. Yousaf N, Larkin J. Axitinib in advanced renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2013; 14(13):1245-6.
119. Yang F, Jove V, Xin H, Hedvat M, Van Meter TE, Yu H. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways. *Mol Cancer Res*. 2010;8(1):35-45
120. Zang T, Zhuang L, Zhang Z, Xin D, Guo Y. Expression of beta-catenin in renal cell carcinoma. *Chinese Medical Journal*. 2001; 114(2):152-154
121. Von Schulz-Hausmann SA et al. Targeting the Wnt/Beta-Catenin Pathway in Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Research* 2014; 34 (8) 4101-4108
122. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, et al. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2002; 100(1):30-6.
123. Zamparese R, Pannone G, Santoro A, et al. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest*. 2008; 26(9):929-35.
124. Kuerbitz S, Plunkett B, Walsh W, Kastan M. Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:7491.
125. Lane DP, Beach D. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev*. 1990; 4(1):1-8.
126. Shariat S, Tokunaga H, Zhou J, et al. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22(6):1014-24.
127. Xu Y, Zhang Y, et al. Prognostic value of performance status in metastatic renal cell carcinoma patients receiving tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019; 19:168
128. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ, Figlin RA: Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol* 2003; 170:1742–1746

129. Elson P, Witte R, Trump DL. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1988; 48:7310–3.
130. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:2530–40.
131. Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, et al. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:454–63.
132. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:832–41.
133. Escudier B, Choueiri TK, Oudard S, et al. Prognostic factors of metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: new paradigm from a large phase III trial with shark cartilage extract AE 941. *J Urol* 2007; 178:1901–5
134. Hollingsworth JM, Miller DC, et al. Rising incidence of small renal mass: a need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1331-1334.
135. Scosyrev E, Messing EM, Sylvester R, Campbell S, Van Poppel H. Renal function after nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: results from EORTC randomized trial 30904. *Eur Urol*. 2014; 65(2):372-7.
136. Van Poppel H, et al. A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the complications of elective nephron sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2007; 51(6):1606-15.
137. Van Poppel H, et al. A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2011; 59(4):543-52.
138. Ravaud A, et al. Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *N Engl J Med*. 2016; 375(23):2246-2254.
139. Haas NB, Manola J et al. Adjuvant Treatment for High-Risk Clear Cell Renal Cancer: Updated Results of a High-Risk Subset of the ASSURE Randomized Trial. *JAMA Oncol* . 2017; 3(9):1249-1252.
140. Ko JJ , Xie W, Kroeger N. The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2015; 16(3):293-300

141. Mejean A, et al. Sunitinib alone or after nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2018; 379:417-427
142. Mejean A, et al. Sunitinib Alone or After Nephrectomy for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Is There Still a Role for Cytoreductive Nephrectomy? *Eur Urol*. 2021; 80(4):417-424.
143. Hudes G ,et al.Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007; 356(22):2271-81.
144. Motzer RJ, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer*. 2010; 116(18):4256-65
145. Rini BI, et al. Phase III trial bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALBG 90206. *J Clin Oncol*. 2008; 26(33):5422-8.
146. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.
147. Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Beldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol* 2005; 173:1853–1862
148. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2006; 49:633–643
149. Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol* 2009; 55:851–863.
150. Di Napoli A, Signoretti S. Tissue biomarkers in renal cell carcinoma: issues and solutions. *Cancer* 2009; 115:2290–2297
151. Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, Miura T, Moriyama M, Nagashima Y, Nakatani Y et al. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1569–1575
152. Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 2002; 196:186–193
153. Na X, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA, Messing EM. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *J Urol* 2003; 170:588–592

154. Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Landberg G, Ljungberg B. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004; 93:297–302
155. Dizman N, Philip EJ, Pal SK. Genomic profiling in renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol*. 2020; 16(8):435-451.
156. Warburton HE, Brady M, Vlatković N, Linehan WM, Parsons K, Boyd MT. p53 regulation and function in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2005; 65(15):6498-503.
157. Kankaya D, Kiremitci S, Tulunay O, Baltaci S. Gelsolin, NF- κ B, and p53 expression in clear cell renal cell carcinoma: Impact on outcome. *Pathol Res Pract*. 2015; 211(7):505-12.
158. Uhlman DL, Nguyen PL, Manivel JC, Aeppli D, Resnick JM, Fraley EE, Zhang G, Niehans GA. Association of immunohistochemical staining for p53 with metastatic progression and poor survival in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86(19):1470-5.
159. Baytekin F, Tuna B, Mungan U, Aslan G, Yorukoglu K. Significance of P-glycoprotein, p53, and survivin expression in renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2011; 29(5):502-7.
160. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology*. 2004; 63(4):651-5.
161. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2016; 374(2):135-45.
162. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013 Jul 4;499(7456):43-9.
163. Oda H, Nakatsuru Y, Ishikawa T. Mutations of the p53 gene and p53 protein overexpression are associated with sarcomatoid transformation in renal cell carcinomas. *Cancer Res*. 1995; 55(3):658-62.
164. Girgin C, Tarhan H, Hekimgil M, Sezer A, Gürel G. P53 mutations and other prognostic factors of renal cell carcinoma. *Urol Int*. 2001; 66(2):78-83.
165. Weber T, Meinhardt M, Zastrow S, Wienke A, Erdmann K, Hofmann J, Fuessel S, Wirth MP. Stage-dependent prognostic impact of molecular signatures in clear cell renal cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2014; 7:645-54.
166. Morshaeuser L, May M, Burger M, Otto W, Hutterer GC, Pichler M, Klatter T, Wild P, Buser L, Brookman-May S. p53-expression in patients with renal cell carcinoma correlates with a higher probability of disease progression and increased cancer-specific mortality after surgery but does

not enhance the predictive accuracy of robust outcome models. *Urol Oncol*. 2018; 36(3): 94.e15-94.e21.

167. Shvarts O, Seligson D, Lam J, Shi T, Horvath S, Figlin R, Belldegrun A, Pantuck AJ. p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. *J Urol*. 2005; 173(3):725-8.

168. Wang Z, Peng S, Jiang N, Wang A, Liu S, Xie H, Guo L, Cai Q, Niu Y. Prognostic and clinicopathological value of p53 expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(60):102361-102370.

169. Hodorova I, Solar P, Mihalik J, Vecanova J, Adamkov M, Rybarova S. Investigation of tumour suppressor protein p53 in renal cell carcinoma patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014; 158(1):44-9.

170. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med*. 1997; 48:267-81.

171. Gąsowska-Bajger B, Gąsowska-Bodnar A, Knapp P, Bodnar L. Prognostic Significance of Survivin Expression in Patients with Ovarian Carcinoma: A Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2021; 10(4):879.

172. Byun SS, Yeo WG, Lee SE, Lee E. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology*. 2007; 69(1):34-7.

173. Shi ZG, Li SQ, Li ZJ, Zhu XJ, Xu P, Liu G. Expression of vimentin and survivin in clear cell renal cell carcinoma and correlation with p53. *Clin Transl Oncol*. 2015; 17(1):65-73.

174. Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, Kuntz SM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Sebo TJ, Chevillie JC, Parker AS, Kwon ED. Survivin and b7-h1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(6):1749-56.

175. Zamparese R, Pannone G, Santoro A, Lo Muzio L, Corsi F, Pedicillo MC, Scillitani EL, Tortorella S, Staibano S, Piscuoglio S, Lo Russo L, Bufo P. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest*. 2008 ; 26(9):929-35.

176. Pu Z, Wang Q, Xie H, Wang G, Hao H. Clinicopathological and prognostic significance of survivin expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(12):19825-19833.

177. Xie Y, Ma X, Gu L, Li H, Chen L, Li X, Gao Y, Fan Y, Zhang Y, Yao Y, Zhang X. Prognostic and Clinicopathological Significance of Survivin Expression in Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2016; 6:29794.

178. Kannangai R, Wang J, Liu QZ, Sahin F, Torbenson M. Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation. *Int J Gastrointest Cancer*. 2005;35(1):53-60.
179. Nakano J, Huang CL, Liu D, Ueno M, Sumitomo S, Yokomise H. Survivin gene expression is negatively regulated by the p53 tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2005; 27(5):1215-21.
180. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett*. 2006; 244(2):164-71.
181. Kim YS, et al. Beta-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas. *Pathol Int*. 2000; 50(9):725-30.
182. Shimazui T, Bringuier PP, van Berkel H, Ruijter E, Akaza H, Debruyne F. M., Oosterwijk E., Schalken J. A. Decreased expression of α -catenin is associated with poor prognosis of patients with localized renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 1997;74: 523-528
183. Bilim V, Takashi K, et al. Altered Expression of β -Catenin in Renal Cell Cancer and Transitional Cell Cancer with the Absence of β -catenin Gene Mutations. *Molecular Oncology, Markers, Clinical Correlates* 2000; (6), 460–466
184. Minardi D, Santoni M, Lucarini G, et al. Tumor VEGF expression correlates with tumor stage. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2015; (33), 113.e1-113.e7
185. Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2004; 93(3):297-302.
186. Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*. 2008; 13(1):1-9
187. Mulcahy Levy JM, Towers GC and 3, Thorburn T. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(9):528-542
188. Lotze M.T., Jodi M., Appleman, Leonard. Inhibiting Autophagy- Novel Approach for the Treatment of Renal Cell Carcinoma. *The Cancer Journal*: 2013; 19 (4): 341-347.
189. Scott W. Lowe and Athena W. Lin. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 485-495
190. Aotake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin. Cancer Res*. 1999; 5: 135–42
191. Todd D, Yang G, Brown RW et al. Apoptosis in renal cell carcinoma: detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other prognostic factors. *Hum. Pathol*. 1996; 27: 1012–7

192. Tarek Abbas and Anindya Dutta p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(6): 400–414;
193. Stacy W. Blain, Howard I. Scher, Carlos Cordon-Cardo, and Andrew Koff. p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer cell* 2003; 3: 111-115
194. Abde M. Abukhdeir and Ben Ho Park p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 2008; 10: e19.
195. Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 2002; 179:1–14
196. Robert H. Weiss, Alexander D. Borowsky, David Seligson, Pei-Yin Lin, Lisa Dillard-Telm, Arie S. Belldegrun, Robert A. Figlin and Allan D. Pantuck. p21 is a Prognostic Marker for Renal Cell Carcinoma: Implications for Novel Therapeutic Approaches. *The Journal of Urology* 2007; 177 (1): A1-A48, 1-416
197. Weiss RH, Borowsky AD, Seligson D, et al. p21 is a prognostic marker for renal cell carcinoma. Implications for novel therapeutic approaches. *J Urol* 2007; 177: 63–9
198. Migita T, Oda Y, Naito S, Tsuneyoshi M. Low-expression of p27Kip1 is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 973–9.
199. Stacy W. Blain, Howard I. Scher, Carlos Cordon-Cardo, and Andrew Koff. p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer cell* 2003; 3: 111-115
200. Tong S, Si Y, Yu H, Zhang L, Xie P, Jiang W. MLN4924 (Pevonedistat), a protein neddylation inhibitor, suppresses proliferation and migration of human clear cell renal cell carcinoma. *Sci Rep*. 2017;7(1):5599
201. Abbas T and Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(6): 400–414).
202. Aidan P. Noon, Nikolina Vlatković, Radosław Polański, Maria Maguire, Howida Shawki, Keith Parsons, and Mark T. Boys. P53 and MDM2 in Renal Cell Carcinoma: Biomarkers for Disease Progression and Future Therapeutic Targets? *Cancer*. 2010; 116(4): 780–790
203. Richard Zigeuner, Manfred Ratschek, Peter Rehak, Luigi Schips, and Cord Langner Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology* 2004; 63 (4): 651-655
204. Scott W. Lowe and Athena W. Lin. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 485-495

205. Henry Zall, Arnim Weber, Robert Besch, Niko Zantl and Georg Häcker. Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Molecular Cancer* 2010; 9:164-172
206. Marie-Christine Albert, Kerstin Brinkmann, and Hamid Kashkar. Noxa and cancer therapy Tuning up the mitochondrial death machinery in response to chemotherapy. *Molecular and Cellular Oncology* 2014; 1: e29906- 1- e29906-8
207. Toshiro Oda, Atsushi Takahashi, Noriomi Miyao, Masahiro Yanase, Naoya Masumori, Naoki Itoh, Masa-Aki sato, Shin-Ichiro Kon and Taiji Tsukamoto. Cell proliferation, apoptosis, angiogenesis and growth rate of incidentally found renal cell carcinoma. *International Journal of Urology* 2003;10:13-18
208. Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288 (5468): 1053-1058
209. C Ploner, R Kofler, and A Villunger. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene*. 2008; 27(1): S84–S92
210. Henry Zall, Arnim Weber, Robert Besch, Niko Zantl and Georg Häcker. Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Molecular Cancer* 2010; 9:164-172
211. Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 1998; 143: 1375–83
212. Walburgis Brenner, Gloria F Arber, Thomas Herget, Hans-Anton Lehr, Jan G. Hengstler and Joachim W. Thuroff. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 2002; 99: 53–57
213. M Keniry and R Parsons. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 2008; 27: 5477–5485
214. Wan B, Liu B, Yu G, Huang Y, Lv C. Differentially expressed autophagy-related genes are potential prognostic and diagnostic biomarkers in clear-cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY)* 2019; 11 (20):9025-9042.
215. Lebovitz CB, Robertson AG, Goya R, Jones SJ, Morin RD, Marra MA, Gorski SM (2015) Cross-cancer profiling of molecular alterations within the human autophagy interaction network. *Autophagy* 11 (9):1668-1687.

216. Guo Y, Zhang HC, Xue S, Zheng JH. Receptors for advanced glycation end products is associated with autophagy in the clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer Res Ther* 2019; 15 (2):317-323.
217. Lu J, Zhu L, Zheng LP, Cui Q, Zhu HH, Zhao H, Shen ZJ, Dong HY, Chen SS, Wu WZ, Tan JM. Overexpression of ULK1 Represents a Potential Diagnostic Marker for Clear Cell Renal Carcinoma and the Antitumor Effects of SBI-0206965. *EBioMedicine* 2018; 34:85-93.
218. Wohlrab C, Vissers MCM, Phillips E, Morrin H, Robinson BA, Dachs GU. The Association Between Ascorbate and the Hypoxia-Inducible Factors in Human Renal Cell Carcinoma Requires a Functional Von Hippel-Lindau Protein. *Front Oncol* 2018; 8:574.
219. Shao Y, Liu Z, Liu J, Wang H, Huang L, Lin T, Liu J, Wei Q, Zeng H, He G, Li X. Expression and epigenetic regulatory mechanism of BNIP3 in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2019; 54 (1):348-360.
220. Liu XD, Yao J, Tripathi DN, Ding Z, Xu Y, Sun M, Zhang J, Bai S, German P, Hoang A, Zhou L, Jonasch D, Zhang X, Conti CJ, Efstathiou E, Tannir NM, Eissa NT, Mills GB, Walker CL, Jonasch E. Autophagy mediates HIF2alpha degradation and suppresses renal tumorigenesis. *Oncogene* 2015; 34 (19):2450-2460.
221. Deng Q, Wang Z, Wang L, Zhang L, Xiang X, Wang Z, Chong T. Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43 (12):1261-1268.
222. Xiao W, Xiong Z, Yuan C, Bao L, Liu D, Yang X, Li W, Tong J, Qu Y, Liu L, Xiao H, Yang H, Zhang X, Chen K. Low neighbor of Brca1 gene expression predicts poor clinical outcome and resistance of sunitinib in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8 (55):94819-94833.
223. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 2015; 1 (2):84-91.
224. Godlewski J, Krazinski BE, Kowalczyk AE, Kiewisz J, Kiezun J, Kwiatkowski P, Sliwiska-Jewsiewicka A, Wierzbicki PW, Kmiec Z. Expression and Prognostic Significance of EP300, TP53 and BAX in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2017; 37 (6):2927-2937.
225. Gobe G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest* 2002; 20 (3):324-332.
226. Stoyanoff TR, Rodriguez JP, Todaro JS, Espada JD, Colavita JP, Brandan NC, Torres AM, Aguirre MV. Tumor biology of non-metastatic stages of clear cell renal cell carcinoma; overexpression of stearoyl desaturase-1, EPO/EPO-R system and hypoxia-related proteins. *Tumour Biol* 2016; 37 (10):13581-13593.

227. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem* 2017; 61 (6):585-596.
228. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13 (2):132-141.
229. Miao H, Qiu F, Huang B, Liu X, Zhang H, Liu Z, Yuan Y, Zhao Q, Zhang H, Dong H, Zhang Z. PKC α replaces AMPK to regulate mitophagy: Another PEDF role on ischaemic cardioprotection. *J Cell Mol Med* 2018; 22 (11):5732-5742.
230. von Brandenstein M, Pandarakalam JJ, Kroon L, Loeser H, Herden J, Braun G, Wendland K, Dienes HP, Engelmann U, Fries JW. MicroRNA 15a, inversely correlated to PKC α , is a potential marker to differentiate between benign and malignant renal tumors in biopsy and urine samples. *Am J Pathol* 2012; 180 (5):1787-1797.
231. Engers R, Mrzyk S, Springer E, Fabbro D, Weissgerber G, Gernharz CD, Gabbert HE. Protein kinase C in human renal cell carcinomas: role in invasion and differential isoenzyme expression. *Br J Cancer* 2000; 82 (5):1063-1069.
232. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjostedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Schwenk JM, Brunnstrom H, Glimelius B, Sjoblom T, Edqvist PH, Djureinovic D, Micke P, Lindskog C, Mardinoglu A, Ponten F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* 2017; 357 (6352).
233. Li L, Shen C, Nakamura E, Ando K, Signoretti S, Beroukhi R, Cowley GS, Lizotte P, Liberzon E, Bair S, Root DE, Tamayo P, Tsherniak A, Cheng SC, Tabak B, Jacobsen A, Hakimi AA, Schultz N, Ciriello G, Sander C, Hsieh JJ, Kaelin WG, Jr. SQSTM1 is a pathogenic target of 5q copy number gains in kidney cancer. *Cancer Cell* 2013; 24 (6):738-750.
234. Ojha R, Ishaq M, Singh SK. Caspase-mediated crosstalk between autophagy and apoptosis: Mutual adjustment or matter of dominance. *J Cancer Res Ther* 2015; 11 (3):514-524.
235. Zheng K, He Z, Kitazato K, Wang Y. Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. *Theranostics* 2019; 9 (1):104-125.
236. Linder B, Kogel D. Autophagy in Cancer Cell Death. *Biology* 2019; (Basel) 8 (4).
237. Kuei CH, Lin HY, Lee HH, Lin CH, Zheng JQ, Chen KC, Lin YF. IMPA2 Downregulation Enhances mTORC1 Activity and Restrains Autophagy Initiation in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Med* 2020; 9 (4).
238. Macher-Goeppinger S, Keith M, Hatiboglu G, Hohenfellner M, Schirmacher P, Roth W, Tagscherer KE. Expression and Functional Characterization of the BNIP3 Protein in Renal Cell Carcinomas. *Transl Oncol* 2017; 10 (6):869-875.

239. Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, Kellner E, Ehmer B, Drew AF, Gallo CA, Plas DR, Biesiada J, Meller J, Czyzyk-Krzeska MF. VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. *Cancer Cell* 2012; 21 (4):532-546.
240. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12 (6):401-410.
241. Feise RJ. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC Med Res Methodol* 2002; 2:8.
242. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology*. 1990; 1(1):43-6

BIOGRAFIJA AUTORA

Milan Radovanović je rođen 1983. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju završio je u rodnom gradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2002.godine, a diplomirao je 2008.godine sa prosečnom ocenom 9,26.

Nakon završenog obaveznog lekarskog staža započeo je volonterski rad na Klinici za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije gde je od 15.11.2010. stalno zaposlen. Specijalistički ispit iz urologije položio je s odličnom ocenom u oktobru 2017.godine.

Specijalističke akademske studije iz oblasti Urologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisao je 2009. godine. Završni specijalistički akademski rad pod nazivom „Zbrinjavanje i korekcija urinarnih fistula uroginekološke etiologije“ pod mentorstvom Prof. dr Zorana Džamića odbranio je u maju 2011.godine.

Doktorske studije iz oblasti Epidemiologije upisao je 2017. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Za kliničkog asistenta za predmet urologija na Katedri za hirurgiju Medicinskog fakulteta u Beogradu izabran je 2018. godine, a reizabran 2021. godine.

Autor je i koautor većeg broja naučnih i stručnih radova iz oblasti urologije kao i poglavlja u udžbeniku hirurgije za studente medicine. Član je nacionalnih i međunarodnih strukovnih udruženja. Govori engleski jezik.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милан Радовановић

Број индекса 5054 / 2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИСПИТИВАЊЕ БИОХЕМИЈСКИХ И ПАТОХИСТОЛОШКИХ МАРКЕРА
ЗНАЧАЈНИХ ЗА ПРОГНОЗУ КАРЦИНОМА БУБРЕЖНИХ ТЕЛИЈА

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

Потпис аутора

У Београду, 30.03.2022

Милан Радовановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милан Радовановић
Број индекса 5054/2018
Студијски програм ЕПИДЕМИОЛОГИЈА
Наслов рада ИСПИТИВАЊЕ БИОХЕМИЈСКИХ И ПАТОХИСТОЛОШКИХ МАРКЕРА
МАРКЕРА ЗА ПРОГНОЗУ КАРЦИНОМА БУБРЕЖНИХ ТЕЛИЈА
Ментор 1. Проф. Др Зоран Чанић
МЕНТОР 2. Проф. Др Сања Радојевић Шкодрић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

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

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

Потпис аутора

У Београду, 30.03.2022.

Милан Радовановић

Изјава о коришћењу

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

ИСПИТИВАЊЕ БИОХЕМИЈСКИХ И ПАТОХИСТОЛОШКИХ МАРКЕРА
ЗНАЧАЈНИХ ЗА ПРОГНОЗУ КАРЦИНОМА БУБРЕЖНИХ ПЕЛЈУСА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 30.03.2022.

Мирна Бјелобобит