

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jovanka A. Trifunović

**Značaj ispitivanja proliferativnih  
markera ciklina A i Ki-67 i telomeraze u  
karcinomu bubrežnih ćelija**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Jovanka A. Trifunović

**Importance of testing proliferative  
markers of cyclin A and Ki-67 and  
telomerase in renal cell carcinoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**MENTOR:**

**Prof. dr Gordana Basta-Jovanović**

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,  
Institut za patologiju

**KOMENTOR:**

**Prof. dr Ivana Novaković**

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,  
Institut za humanu genetiku

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Prof. dr Miodrag Lazić**

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,  
Klinika za urologiju, KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“

**Prof. dr Momčilo Ristanović**

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,  
Institut za humanu genetiku

**Prof. dr Radoslav Gajanin**

Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet, BiH

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*Najsrdačnije zahvaljujem svom mentoru Prof. dr Gordani Basti-Jovanović na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da se razvijam na profesionalnom planu, kao i na svemu što sam od nje naučila o nauci i naučno-istraživačkom radu. Hvala joj na korisnim savetima, velikoj, iskrenoj i nemerljivoj pomoći i podršci u svim fazama izrade i pisanja ove disertacije. Hvala joj za svu toleranciju, podstrek, podršku i ljubav koju mi pruža od početka naše saradnje.*

*Takođe, se zahvaljujem i svom komentoru Prof. dr Ivani Novaković na predusretljivosti, podršci, svakoj vrsti pružene pomoći tokom izrade i pisanja ove disertacije.*

*Hvala članovima komisije, Prof. dr Miodragu Laziću, Prof. dr Momčilu Ristanoviću i Prof. dr Radoslavu Gajaninu na korisnim savetima, sugestijama i pomoći na izradi ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem Prof dr Jeleni Milašin i dr Nađi Nikolić na divnoj saradnji, velikodušnosti, srdačnosti, brojnim dobronamernim savetima i dragocenoj pomoći pri realizaciji dela potrebnih istraživanja za izradu ove teze na Institutu za genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Njihova stručnost i podrška su umnogome doprineli kvalitetu ove teze.*

*Hvala dr Ivanu Soldatoviću na njegovoj dragocenoj pomoći na statističkoj obradi rezultata i na prijateljstvu.*

*Hvala i mojoj porodici za svu ljubav, razumevanje i nesebičnu i bezuslovnu podršku koja mi je bila neiscrpan izvor energije tokom svih godina mog školovanja.*

*Ovaj rad posvećujem uspomeni na moju nedavno upokojenu baku Staniju, njenu plemenitu dušu i nesebičnu ljubav i podršku koju mi je pružala za života.*

*Beograd, jun 2018.*

**NASLOV:** Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklina A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija

## **REZIME:**

### **Uvod:**

Karcinom bubrežnih ćelija (RCC) je najrasprostranjeniji oblik karcinoma bubrega i čini oko 2-3% svih karcinoma kod odraslih, češće kod muškaraca. U svetu se beleži porast obolelih usled primene savremene tehnologije u dijagnostici koja omogućava raniju i precizniju dijagnostiku RCC. Najčešći histološki podtipovi RCC su: svetloćelijski, papilarni, hromofobni, karcinom sabirnih kanala i neklasifikovani. Proliferativni markeri ciklin A, Ki-67 i telomeraza su bitni u dijagnostici RCC.

### **Cilj:**

Imunohistohemijski ispitati intenzitet ekspresije ciklina A, Ki67 i telomeraze kod RCC i analizirati korelaciju ovih ekspresija sa kliničko-morfološkim karakteristikama RCC. Analizirati prisustvo mutacija i polimorfizma, amplifikaciju i metilacioni status u promotorskom regionu hTERT gena kod ispitivanih pacijenata sa RCC.

### **Materijal i metode:**

Za istraživanje je korišćen operativni materijal 74 pacijenta obolela od RCC dobijen parcijalnom nefrektomijom koji je posle obrade i kalupljenja, najpre obojen hematoksilin-eozinom i postavljena je histopatološka dijagnoza RCC, a kasnije su rađene imunohistohemijske metode i molekularno-genetičko istraživanje.

### **Rezultati:**

Imunohistohemijska ispitivanja ekspresije ciklina A u tkivu RCC pokazala su da postoji statistički značajna razlika ekspresije ciklina A kod različitih histopatoloških tipova. Najintenzivnija ekspresija uočena je u slučajevima papilarnog RCC. Imunohistohemijska ispitivanja ekspresije Ki67 pokazala je da je kod papilarnog RCC dobijena je izrazita pozitivnost u odnosu na preostala dva analizirana histopatološka tipa. Takođe, imunohistohemijska ekspresija telomeraze drastično je veća kod papilarnog RCC u odnosu na ostala dva histopatološka tipa. Sekvenciranje 343 bp dugog promotorskog regiona nije ukazalo na aktivaciju mutacija ni u jednom od ispitivanih uzorka RCC, ali je otkriveno prisustvo tranzicije T/C na poziciji -245 bp. Genska amplifikacija je uočena kod 19.4% pacijenata. HTERT promotor je bio metilovan u 54,8% uzoraka.

### **Zaključak:**

Proliferativni markeri ciklin A, Ki67 i telomeraze imaju veliki prognostički značaj kod RCC, naročito kod papilarnog RCC. Sekvenciranjem je otkriveno prisustvo tranzicije T/C na poziciji -245 bp. Mutirani alel bio je prisutan u homozigotnom obliku u 7,4%, u

heterozigotnom obliku u 40,7%, a 51.9% bilo je homozigotno za nemutirani tip gena (wt alel). Nije uočena povezanost između hTERT amplifikacije i epidemioloških, kliničkih i patoloških nalaza. Značajna razlika zapažena je između histopatoloških tipova tumora, pošto je kod hromofobnog histopatološkog tipa, kod svih 5 pacijenata hTERT promotor bio metilovan.

**KLJUČNE REČI:** RCC, proliferativni markeri, ciklin A, Ki67, telomeraza, hTERT, mutacije, polimorfizam, genska amplifikacija, metilacija

**NAUČNA OBLAST:** Molekularna medicina

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Patologija

**PhD THESIS:** Importance of testing proliferative markers of cyclin A and Ki-67 and telomerase in renal cell carcinoma

**ABSTRACT:**

**Background:**

Renal Cell Carcinoma (RCC) is the most common form of renal cancer and makes approximately 2-3% of all carcinoma in adults, being expressed more often in males. An increase in the number of diseased is detected due to the implementation of most contemporary technology in diagnostics that enables an early and accurate diagnostics of RCC. The most common histological subtypes of RCC are the following: clear cell, papillary, chromophobe, collecting duct carcinoma and unclassified. The proliferative markers cycline A, Ki-67 and telomerase are significant in RCC diagnostics.

**Aims:**

The goal was to immunohistochemically investigate into the intensity of the cycline A, Ki-67 and telomerase expression in RCC and analyse the correlation of these expressions with clinical-morphological characteristics of RCC. The goal was also to analyse the presence of mutations and polymorphism, gene amplification and metilation status in the hTERT promotor gene region in the examined RCC patients.

**Materials and Methods:**

The operational material used in the research was that taken from 74 patients diagnosed with RCC, obtained through partial nephrectomy, which was, following the processing and moulding, first stained by hematoxylin and eosin and then RCC was diagnosed; immunohistochemical methods and molecular-genetic research ensued.

**Results:**

Immunohistochemical investigation into the cycline A expression in the RCC tissue have shown a statistically significant discrepancies in the cycline A expression among different histopathological types. The most intensive expression is observed in the cases of papillary RCC. The immunohistochemical investigations into the Ki-67 expression have demonstrated a distinct positivity in comparison with the two other analyzed histopathological types. Similarly, the immunohistopathological expression of telomerase is dramatically higher in papillary RCC in comparisson with the other two histopathological types. The sequencing of 343 bp long promotor region has failed to demonstrate any activation of mutations in any of the examined RCC samples, however, it has shown the presence of T/C transition at the -245 bp position. The gene amplification has been observed in 19.4% patients. HTERT promotor was methylated in 54.8% samples.

**Conclusion:**

Proliferative markers, cyclin A, Ki67, and telomerases have great prognostic significance in RCC, especially in papillary RCC. Sequencing detected the presence of the T/C transition at -245 bp position. The variant allele was present in homozygous form in 7.4%, in heterozygous in 40.7%, and 51.9% were homozygous for the wild type allele. There was no association between hTERT amplification and epidemiological, clinical and pathological findings. A significant difference was observed between histopathological types of tumors, since in chromophobe histopathological type, in all 5 patients, the hTERT promoter was methylated.

**KEY WORDS:** RCC, proliferative markers, cyclin A, Ki67, telomerase, hTERT, mutations, polymorphism, gene amplification, methylation

**SCIENTIFIC FIELD:** Molecular medicine

**NARROWER SCIENTIFIC FIELD:** Pathology



## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. Anatomija bubrega .....	1
1.2. Histologija bubrega .....	3
1.3. Embriologija bubrega.....	5
1.4. Uloga bubrega .....	6
1.5. TUMORI BUBREGA .....	8
1.6. KARCINOM BUBREŽNE ČELIJE (renal cell carcinoma-RCC).....	8
1.6.1. Epidemiologija i incidenca karcinoma bubrežne ćelije.....	8
1.6.2. Etiologija .....	10
1.6.3. Klinička slika.....	14
1.6.4. Dijagnostika .....	16
1.6.5. Patohistološki izgled .....	18
1.6.6. Histološka klasifikacija tumora bubrega određena prema Klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO).....	20
1.6.7. BENIGNI TUMORI BUBREGA.....	33
1.7. Prognostički faktori kod karcinoma bubrežnih ćelija.....	39
1.8. Određivanje stadijuma širenja tumora (staging) .....	41
1.9. Određivanje gradusa tumora - Fuhrman-ov gradusni sistem (FGS) .....	42
1.10. Ćelijski ciklus – opšte karakteristike.....	44
1.11. Proliferativna aktivnost malignih tumora i markeri proliferativne aktivnosti .....	45
1.12. Ćelijski ciklus i maligna transformacija .....	46
1.13. Ciklin A.....	47
1.14. Ki67 .....	49
1.15. Telomeraza .....	51
1.15.1. Telomeraza i karcinom bubrežnih ćelija (RCC).....	53
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	55
3. MATERIJAL I METODE.....	56
3.1. ISPITIVANI PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL .....	56
3.2. HISTOPATOLOŠKA OBRADA UZORAKA TKIVA TUMORA .....	58
3.3. IMUNOHISTOHEMIJSKE METODE.....	59

3.4.	MOLEKULARNO-GENETIČKO ISTRAŽIVANJA .....	62
3.4.1.	IZOLACIJA GENOMSKE DNK.....	62
3.4.2.	AMPLIFIKACIJA DNK FRAGMENTA (PCR - LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE) I SEKVENCIRANJE.....	64
3.5.	GEL ELEKTROFOREZA .....	69
3.6.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	70
4.	REZULTATI.....	71
4.1.	Analiza kliničkih rezultata .....	71
4.1.1.	Distribucija pacijenata sa RCC prema polu .....	71
4.1.2.	Distribucija pacijenata sa RCC prema starosti .....	72
4.1.3.	Distribucija pacijenata sa RCC prema veličini (dimenzijama) tumora .....	73
4.1.4.	Distribucija pacijenata sa RCC prema stadijumu tumora.....	75
4.1.5.	Distribucija pacijenata sa RCC prema histopatološkom tipu tumora.....	75
4.1.6.	Distribucija pacijenata sa RCC prema gradusu tumora.....	77
4.1.7.	Distribucija pacijenata sa RCC prema starosti, veličini (dimenzijama) tumora i preživljavanju (u mesecima) .....	78
4.1.8.	Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC.....	79
4.1.9.	Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC .....	80
4.1.10.	Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijumu tumora kod pacijenata sa RCC	82
4.1.11.	Odnos gradusa tumora i stadijumu tumora kod pacijenata sa RCC .....	83
4.1.12.	Odnos pola i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC .....	84
4.1.13.	Odnos stadijuma tumora (niži i viši) i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomerase, ciklina A, Ki67 i preživljavanja (u mesecima) kod pacijenata sa RCC .....	85
4.1.14.	Odnos gradusa tumora (niži i viši) i starost pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomerase, ciklina A i Ki67 i preživljavanja (u mesecima) kod pacijenata sa RCC .....	89
4.1.15.	Odnos gradusa tumora (niži i viši) i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora i pola kod pacijenata sa RCC .....	93
4.1.16.	Odnos veličine (dimenzija) tumora i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC .....	96
4.1.17.	Odnos preživljavanja i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC.....	98
4.1.18.	Odnos preživljavanja i gradusa tumora kod pacijenata sa RCC.....	99
4.1.19.	Odnos preživljavanja i gradusa tumora (niži i viši) kod pacijenata sa RCC .....	100

4.1.20.	Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC .....	101
4.1.21.	Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC.....	104
4.1.22.	Odnos gradusa tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC..	105
4.1.23.	Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC.....	106
4.1.24.	Odnos histopatološkog tipa tumora i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A i Ki67 i preživljavanja (meseći) kod pacijenata sa RCC .....	107
4.1.25.	Korelaciona analiza .....	112
4.1.26.	Imunohistohemijska ekspresija telomeraze kod pacijenata sa RCC .....	113
4.1.27.	Imunohistohemijska ekspresija ciklina A kod pacijenata sa RCC .....	115
4.1.28.	Imunohistohemijska ekspresija Ki67 kod pacijenata sa RCC.....	117
4.2.	Analiza genetičkih rezultata .....	119
4.2.1.	Distribucija pacijenata sa RCC prema polu .....	119
4.2.2.	Distribucija pacijenata u odnosu na karakteristike tumora (histopatološki tip tumora, stadijum tumora, gradus tumora i genetske polimorfizme: hTERT polimorfizam, hTERT amplifikacija, hTERT metilacija).....	120
4.2.3.	Testiranje mutacija i polimorfizma na nivou jednog nukleotida (SNP).....	121
4.2.4.	Analiza hTERT amplifikacije (analiza genske amplifikacije hTERT gena).....	122
4.2.5.	Analiza hTERT metilacije (analiza metilacionog statusa promotora hTERT gena)	122
4.2.6.	Distribucija pacijenata sa RCC prema veličini (dimenzijama) tumora, procentu ekspresije telomeraze i preživljavanju (u mesecima).....	125
4.2.7.	Odnos hTERT polimorfizma i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja (u mesecima). .....	126
4.2.8.	Odnos hTERT polimorfizma (mut+hetero) i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja (u mesecima).....	126
4.2.9.	Odnos hTERT amplifikacije i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja (u mesecima) .....	127
4.2.10.	Odnos hTERT metilacije i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja ( u mesecima) .....	128
4.2.11.	Odnos hTERT polimorfizma i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola .....	129
4.2.12.	Odnos hTERT polimorfizma (hetero i mut) i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola .....	130

4.2.13. Odnos hTERT amplifikacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola .....	131
4.2.14. Odnos hTERT metilacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola .....	132
5. DISKUSIJA.....	134
6. ZAKLJUČCI.....	154
7. Literatura: .....	156

## 1. UVOD

### 1.1. Anatomija bubrega

Bubreg (*ren*) je parni organ koji predstavlja centralni deo urinarnog sistema. Bubreg je crvenkasto smeđe boje i čvrste konzistencije, oblikom podseća na veliko zrno pasulja. Na bubregu se razlikuje prednja (*facies anterior*) i zadnja (*facies posterior*) strana, spoljašnja (*margo lateralis*) i unutrašnja (*margo medialis*) ivica i gornji (*extremitas superior*), odnosno donji (*extremitas inferior*) pol (1).

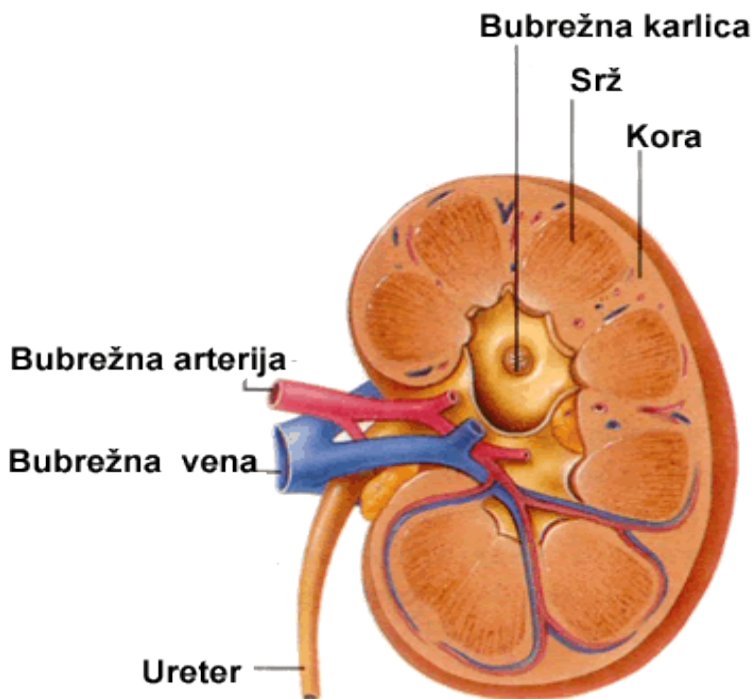
Prednja strana je konveksna i gleda napred i upolje. Zadnja strana je manje konveksna i glada nazad i unutra. Spoljašnja ivica je konveksna, a unutrašnja ivica je konkavna u srednjem delu. Na sredini unutrašnje ivice bubrega nalazi se otvor nazvan hilus bubrega (*hilus renale*), oblika vertikalno izdužene elipse, visok oko 3cm. On predstavlja ulaz u središnju šupljinu bubrega koja se zove bubrežni sinus (*sinus renalis*). Mesto hilusa je malo udubljeno, duboko je oko 3cm. Kroz bubrežni hilus prolazi sudovno-živčana peteljka. U bubrežni hilus ulaze a. renalis i plexus renalis koji predstavlja splet nerava autonomnog nervnog sistema koji inerviše bubreg, a iz sinusa izlazi v. renalis. U bubrežnom sinusu leži i deo bubrežne karlice (*pelvis renalis*). Gornji pol bubrega je zaobljen i širi je nego donji pol bubrega. Donji pol bubrega je spljošten od napred nazad (1).

Kod odrasle osobe bubreg je težak oko 140g, dužine je 10-12cm, širine oko 5cm, debljine 2-3cm. Smešten je u retroperitonealnom prostoru. Gornja trećina bubrega leži na dijafragmi. Na granici gornje i srednje trećine, ukoso, ukršta dvanaesto rebro, dok je hilus bubrega osobe u ležećem položaju u visini drugog lumbalnog pršljena. Uzdužna osovina bubrega je položena koso tako da su gornji polovi bliže od donjih. Desni bubreg leži malo niže od levog jer ga naniže potiskuje veliki desni režanj jetre koji naleže na njegov gornji pol. Gornji polovi oba bubrega udaljeni su jedan od drugog oko 8cm, a njihovi donji polovi su razmaknutiji i udaljeni su jedan od drugog oko 12cm (1).

Bubrežni parenhim je zaštićen spolja sa dva omotača. Jedan je čvrsto vezan za sam parenhim bubrega. To je tanka, providna opna, građena je od veziva i naziva se *capsula fibrosa renis*, a drugi omotač je zaštitni, i nalazi se oko fibrozne kapsule, građen je od masnog tkiva i održava bubreg u normalnom položaju jer sprečava znatnija pomeranja

bubrega prilikom naglih pokreta tela i naziva se *capsula adiposa renis*. Preko masne kapsule nalazi se bubrežna fascija (*fascia renis*). To je najpovršniji omotač bubrega, sastoji se od subperitonealnog tkiva i obavija bubreg i nadbubrežnu žlezdu koja je smeštena uz gornji pol bubrega. Na uzdužnom preseku bubrega vidi se njegova unutrašnja građa. Bubreg se sastoji od parenhimnog, kompaktnog spoljašnjeg dela i središnjeg šupljeg dela, građenog od sistema šupljina smeštenih uz hilus bubrega, a na koje se prema spolja i dole nastavlja ureter, što spaja bubreg sa mokraćnom bešikom. Kompaktni deo ima dva sloja: periferni zrnasti, žutocrvenkaste boje, debeo oko 3-4cm i naziva se kora bubrega (*cortex renalis*), i unutrašnji, linearni ružičasti, formiran u obliku niza piramida i zove se srž bubrega (*medulla renalis*). Medula bubrega je ružičaste boje i izgrađuju je Malpigijeve i Ferajnovе bubrežne piramide (*pyramides renales*) koje imaju oblik kupe, a čija je baza okrenuta prema spoljnoj površini bubrega, a vrh prema bubrežnom sinus i na njegovim zidovima prouzrokuju ispupčenja koja se zovu bubrežne kvržice (*papillae renales*). Na svakoj od ovih kvržica nalazi se 15-20 tačkastih papilarnih otvora (*foramina papillaris*) kroz koje se izliva mokraća iz završnih delova mokraćnih kanalića, koji se pružaju kroz Malpigijeve piramide. Izdanci kortikalne supstance spuštaju se do hilusa i odvajaju piramide. Kora bubrega je žućkaste boje i okružuje Malpigijeve i Farajnovе piramide. Delovi kortikalne supstance koji leže između Malpigijevih piramida su Bertinijevi stubovi (*columnae renales*). Delovi kortikalne supstance koji leže između Farajnovе piramide nazivaju se izuvijani deo režnjića kore (*pars convoluta lobuli corticalis*). Deo kore koji je između vrhova Ferajnovih piramida i fibroznog bubrežnog omotača, zove se *cortex corticis*.

Bubrežni ređanj (*lobus renalis*) gradi medilatrna supstanca jedne Malpigijeve piramide i deo kortikalne supstance Bertinijevih stubova koji je okružuje. Granicu između dva susedna ređnja označava a.interlobaris. Bubrežni ređnjić (*lobulus renalis*) i kortikalna supstanca okružuju Ferajnovu piramidu (*pars convoluta lobuli corticalis*). Granicu između dva susedna ređnjića označava a.interlobularis (1).



**Slika 1.** Normalna građa bubrega (preuzeto sa [www.biologija.rs/urinarni\\_sistemi.html](http://www.biologija.rs/urinarni_sistemi.html))

## 1.2. Histologija bubrega

Nefron (nephron) je osnovna strukturna i funkcionalna jedinica bubrega. Dužina mu se kreće od 30 do 55 mm. Svaki bubreg se sastoji od 1-3 miliona nefrona i svaki nefron je sposoban da samostalno stvara mokraću. Nefron se u svom početnom, proširenom delu sastoji od *Malpigijevog bubrežnog telašca* (*corpuskulum renale Malpighii*), oko koga se nadovezuje i nastavlja niz bubrežnih kanalića ili tubula (*tubuli renalis*) koji predstavljaju drugi deo nefrona i obuhvataju: proksimalni vijugavi tubul, tanki i debeli deo Henleove petlje i distalni vijugavi tubul (1,2,3,4).

Bubrežno telašce se nalazi u korteksu bubrega (dajući mu zrnast izgled), a tubuli su smešteni delom u korteksu, ali uglavnom u meduli bubrega (formirajući linearni izgled piramida), tako da se otvaraju na vrhu papila piramida i ulivaju se u čašice. Po lokalizaciji i građi, nefroni su podeljeni na kortikalne i jukstamedularne (1,2,3,4).

Bubrežno telašce je odgovorno za ultrafiltraciju plazme, a histološki je građeno od bubrežnog glomerula i Boumanove (*Bowman*) kapsule. Bubrežni glomerul je splet gusto zbijenih kapilara i obrazuje formaciju u vidu klupka. U svakom bubregu ima oko 1 milion

glomerula i to već od samog rođenja. On povezuje aferentnu (dovodnu) sa eferentnom (odvodnom) arteriolom, a to je jedinstven slučaj da se kapilatna mreža sakuplja i ponovo formira arterijski krvni sud (arterijski portalni sistem). Dovodna arterija pristupa bubrežnom korpuskulu na istom mestu gde ga odvodna napušta, pa se taj pol korpuskula zove vaskularni pol. Nasuprot njemu je urinarni pol, gde se infiltrirana krvna plazma (primarna mokraća), odvodi iz urinarnog prostora glomerula proksimalnim vijugavim tubulom. Bubrežni glomerul obavijen je dvostrukim epitelnim omotačem koji se zove se Bowmanova kapsula (*capsula glomeruli*). Njegov spoljašnji, parijetalni list graniči bubrežno telašće od okolnog parenhima, a čini ga sloj pljosnatih ćelija nalegih na bazalnu laminu i prostire se od urinarnog do vaskularnog pola. Na urinarnom polu ljustast epitel parijetalnog lista Boumanove kapsule prelazi u kockast epitel proksimalnog bubrežnog kanalića, dok na vaskularnom polu, spoljašnji list pravi nagli zaokret i prelazi u visceralni (unutrašnji) list Boumanove kapsule. Ćelije viscelarnog lista su kompleksnije građe i označavaju se kao podociti. Oni su priljubljeni uz kapilarni zid, a njihova bazalna lamina sjedinjena je sa bazalnom laminom endotela. Između dva lista Boumanove kapsule je interkapsularni (urinarni, mokraćni ili Boumanov) prostor gde se sakuplja primarna mokraća. Između mokraćnog prostora i lumena kapilara je semipermeabilna biološka membrana gde se cedi krv pri prelasku kroz kapilarno klupko. U središnjem delu kapilarnog klupka nalazi se mezangijum koji čine mezangijumske ćelije i ekstracelularni matriks, koga stvaraju same ćelije. Mezangijum zauzima oko 15% volumena glomerula (1,2,3,4).

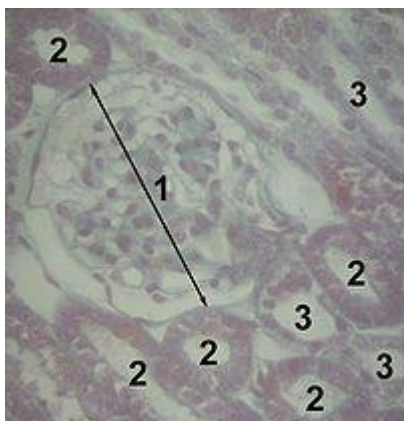
Bubrežni tubul proteže se od parijetalnog lista Boumanove kapsule, od mokraćnog pola bubrežnog korpuskula, do lučnog sabirnog kanala. Celim tokom obložen je jednoslojnim epitelom. Proksimalni i distalni segment imaju vijugavi tok, a povezuje ih pravi deo tubula koji ima nishodni i ushodni krak. Proksimalni vijugavi tubuli su odgovorni za reapsorpciju oko 60% glomerularnog ultrafiltrata. Proksimalni kanalići se nastavljaju na Henleovu petlju koja ima značajnu ulogu u koncentrisanju mokraće. Na Henleovu petlju se nastavljaju distalni vijugavi tubuli čija je uloga aktivna resorpcija NaCl (1,2,3,4).

U Malpigijevim telašćima vrši se proces sekrecije prvobitne mokraće, dok se u bubrežnim tubulima iz prvobine mokraće vrši reapsorpcija izvesnih supstanci i tako se dobija definitivna mokraća. Jukstaglomerulski aparat (JGA) je zajednički naziv za grupu specijalno diferentovanih ćelija, smeštenih na vaskularnom polu bubrežnog telašća. JGA



se sastoji iz tri komponente: makule denze, juksaglomerulskih ćelija i ekstraglomerulskih mezangijumskih ćelija (1).

U bubrežnom parenhimu između nefrona nalazi se intersticijum bubrega. U koretksu intersticijum grade fibroblasti, a u meduli zvezdaste ćelije. Hilusni deo bubrega na preseku je predstavljen šupljinom (pijelon) koju oblaže epitel prelaznog tipa, a koji se nastavlja i na početni deo uretera (1,2,3,4).



**Slika 2.** Histološka građa nefrona (preuzeto sa: [sh.wikipedia.org](http://sh.wikipedia.org))

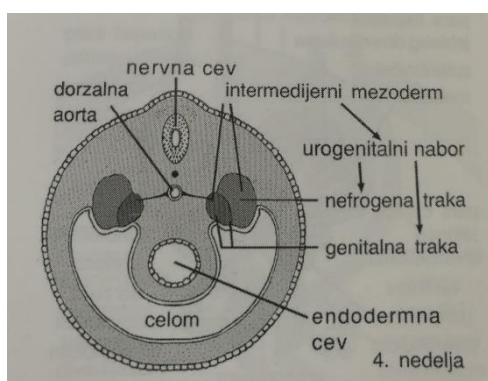
1. Glomerul, 2. Proksimalni vijugavi tubul, 3. Distalni vijugavi tubul

### 1.3. Embriologija bubrega

Bubreg se razvija iz intermedijarnog mezoderma, a on se nalazi duž dorzalnog zida tela, između somita i lateralne ploče mezoderma. Savijanjem embriona, intermedijerni mezoderm se pomera ventralno i gubi vezu sa somitima. Organogeneza bubrega počinje krajem treće nedelje embrionalnog života. Prolazi kroz tri faze koji se delimično preklapaju i to su: pronefros, mezonefros i metanefros, a svi se razvijaju iz intermedijarnog mezoderma, koji se pruža od cervikalnog do kaudalnog dela embriona. Pronefros i mezonefros odgovaraju provizornim organima koji prethode razvoju pravog bubrega (metanefros). Pronefros se razvija u cervikalnom regionu tokom četvrte nedelje gestacije. Kod čoveka je rudimentaran, privremen i nefunkcionalan. Mezonefros se razvija krajem četvrte nedelje gestacije, kaudalnije od pronefrosa. Perzistira kratko tokom 2. meseca, dok se ne razviju stalni bubrezi. Krajem drugog meseca uglavnom atrofira, osim dela od kojeg će se kod muškog pola razviti ductuli efferentes i piradydimis, a kod

ženskog epoophoron i paraoophoron. Metanefros se razvija u definitivni bubreg. Nastaje od dve komponente, oba mezodermalnog porekla: metanefrosnog ili ureterskog pupoljka, i metanefrosnog blastema (metanefrosna masa intermedijernog mezoderma). Njegov razvoj počinje u petoj nedelji embrionalnog razvoja. U početku, metanefrosni bubrezi su u karlici, ali zbog rasta tela embriona kaudalno od bubrega dolazi do njegovog kranijalnog pomeranja. Bubreg menja svoj položaj, penje se iz karlice u lumbalni predeo i u devetoj nedelji zauzima adultni položaj. Istovremeno se okreće oko svoje uzdužne osovine, tako da hilus koji je bio postavljen ventralno, dođe na medijalnu stranu, rotira se za 90° (okrenut je prema kičmenom stubu) (3,4).

Tokom razvoja, moguće su određene nepravilnosti koje se kod definitivnog bubrega ispoljavaju kao anomalije u smislu broja, veličine i građe bubrega. Neke od njih su: agnesia renis, hypoplasia renis, ectopia renis, malrotatio renis, morbus cysticus renum, triplicitas et quadriplicitas renum (3,4).



**Slika 3.** Intermedijerni mezoderm u razvoju urinarnog sistema (preuzeto od: D.Trpinac, M.Obradović, Repetitorijum histologije i embriologije, 2013)

#### 1.4. Uloga bubrega

Bubreg je parni organ čija je funkcija od životnog značaja za čoveka i utiče na rad svih ostalih organa i organizma u celini. Osnovna uloga bubrega je formiranje konačne mokraće. Pored toga on ima i druge brojne i vrlo složene uloge koje su svrstane u tri grupe: ekskretornu, humoralno-regulatorsku i endokrinu (3,4,5).

Ekskretorna uloga bubrega je njegova fundamentalna uloga i omogućava da se urinom iz organizma izluče sve supstance koje su organizmu nepotrebne i štetne. To su razni otpadni produkti metabolizma. Humoralno-regulatorska uloga predstavlja očuvanje stalnosti zapremine i sastava telesnih tečnosti radi očuvanja elektrolitnog statusa i regulacije acidobazne ravnoteže. Endokrina uloga se sastoji u sintezi, sekreciji i/ili metabolizmu različitih hormona i humoralnih činilaca (3,4,5).

Bubreg otklanja razne produkte metabolizma gradivnih i funkcionalnih materija ljudskog organizma (urea, kreatinin, urati, elektroliti, mokraćna kiselina, bilirubin) i izlučuje strane materije, toksine i produkte metabolizma lekova koji se unose u organizam, a reapsorbuje šećere i aminokiseline. Reguliše zapreminu i elektrolitni sastav telesnih tečnosti selektivnom reapsorpcijom vode i elektrolita kako bi održao normalan osmolaritet i volumen telesnih tečnosti. Zajedno sa plućima i puferima telesnih tečnosti, reguliše acidobaznu ravnotežu putem sekrecije ili zadržavanja baznih i kiselih ekvivalenata. Reguliše arterijski pritisak regulacijom izlučivanja vode i natrijuma ( $\text{Na}^+$ ). Luči hormone, renin i eritropoetin, kao i aktivnu komponentu vitamina D. Sintezom i sekrecijom oko 90% ukupnog eritropoetina, bubrezi direktno utiču i na stvaranje, tj. broj crvenih krvnih zrnaca. Vršu sintezu glukoze procesom glukoneogeneze tokom prolongiranog gladovanja (3,4,5).

Mehanizam stvaranja mokraće obuhvata tri fundamentalna procesa: filtraciju, reapsorpciju i sekreciju. Stvaranje primarne mokraće počinje filtracijom velike količine tečnosti iz glomerulskih kapilara, kroz krvno-urinarnu membranu u Boumanov urinarni prostor (omeđen Boumanovom kapsulom). Ovaj ultrafiltrat krvi zatim ulazi u sistem tubula, gde se odvija reapsorpcija (vraćanje određenih supstanci iz filtrata u krvotok) i sekrecija (transport jona i drugih supstanci iz krvotoka u bubrežne tubule). Kao rezultat nastaje konačna mokraćna, koja se preko uretera odvodi iz bubrega u mokraćnu bešiku i preko uretre izlučuje iz organizma. (3,4,5).

Kod hroničnih bolesti bubrega ili akutne bubrežne insuficijencije, dolazi do teških poremećaja u zapremini i sastavu telesnih tečnosti i nakupljanja različitih štetnih materija u organizmu. Ako se ne preduzmu odgovarajuće terapijske mere (poput hemodijalize ili peritonealne dijalize), nastupa smrt pacijenta u roku od nekoliko dana (3,4,5).

## 1.5. TUMORI BUBREGA

Kao i sve vrste tumora, i tumore bubrega možemo uopšteno podeliti na osnovu njihovog biološkog ponašanja na benigne i maligne. Maligni tumori su daleko češći, a u okviru ove grupe nalaze se dve podgrupe:

1. Primarni tumori (tumori porekla bubrežnog parenhima)
2. Sekundarni tumori (metastaze)

Najučestaliji tumori bubrega odraslih osoba su karcinom bubrežnih ćelija (RCC-renal cell carcinoma) i dele se na sledeće najčešće histološke podtipove: svetloćelijski, multilokularni cistični, papilarni, hromofobni, medularni i neklasifikovani. Svi RCC potiču od tubularnih epitalnih ćelija bubrega, tj. nefrona (5,6).

Karcinom bubrega čini svega 2% svih karcinoma čoveka, sa otprilike 190,000 novih slučajeva koji se dijagnostikuju svake godine. Češće se javlja u zemljama u razvoju (12,13,14,15).

Većinu malignih tumora bubrega čine sporadični slučajevi, dok je oko 4% karcinoma bubrežnih ćelija nasledno i povezano je sa hereditarnim kancerskim sindromima. Do sada su opisana četiri glavna tipa naslednih karcinoma bubrega: Von Hippel-Lindau (VHL), hereditarni papilarni karcinom bubrega (HPRC), Birt-Hogg-Dube (BHD) i karcinom bubrežnih ćelija udružen sa hereditarnom leijomiomatozom (HLRCC) (5,6,7,8).

## 1.6. KARCINOM BUBREŽNE ĆELIJE (renal cell carcinoma-RCC)

### 1.6.1. Epidemiologija i incidenca karcinoma bubrežne ćelije

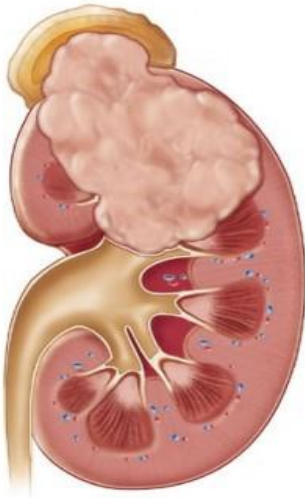
Karcinom bubrežne ćelije je grupa maligniteta koji potiče iz epitela bubrežnih tubula (6). Karcinom bubrežnih ćelija (RCC) je oblik karcinoma bubrega koji čini oko 2-3% svih dijagnostikovanih karcinoma bubrega kod odraslih osoba oba pola, najčešće između 60-70. godine starosti. Incidenca karcinoma bubrežnih ćelija raste posle 40. godine života, a opada posle 75. godine života (6,7,8,9,10). Incidenca mu je najveća u zapadnim zemljama. Stope incidencije karcinoma bubrežnih ćelija su u padu u određenim zemljama kao što su Švedska i Danska, ali u drugim evropskim zemljama i dalje postoji tendencija porasta incidence. Najniža incidenca je zabeležena u Africi i Aziji, dok je najviša u

Češkoj, gde se na godišnjem nivou otkrije 10-20 slučajeva na 100.000 stanovnika (6,7,8,9).

Karcinom bubrežnih ćelija je oko 2 puta češći kod muškaraca, nego kod žena, podjednako i u zemljama visokog i niskog rizika. Na listi svih dijagnostikovanih karcinoma kod ljudi, RCC je na 14. mestu. Karcinom bubrežnih ćelija kod muškaraca koji žive u industrijalizovanim oblastima, uključujući Japan, učestao je koliko i Non-hoćkin limfom koji je na 6. mestu, dok je u manje razvijenim zemljama na 16. mestu, a u istom je redu veličine kao i karcinom nazofarinksa (6,7,8,9,10,11).

U poslednje vreme, najnovija istraživanja u svetu beleže porast obolelih od karcinoma bubrežnih ćelija kod oba pola, i u svim delovima sveta (11). Ova pojava se može objasniti boljom i ranijom dijagnostikom, kao i primenom savremene imidžing tehnologije u dijagnostici koja omogućava raniju i precizniju dijagnostiku RCC, ali i etiološkim faktorima, koji doprinose njegovoj pojavi, kao što su: pušenje, gojaznost, profesionalna izloženost teškim metalima, hipertenzija, alkohol, diabetes mellitus (11,12,13). Najčešći histološki podtipovi RCC koji su dijagnostikovani kod ljudi su: svetloćelijski, papilarni, hromofobni, karcinom sabirnih kanala i neklasifikovani (5,6).

RCC je do nedavno smatran monomorfnom bolešću koja nastaje iz zajedničke prekursorske ćelije, ali različitih histoloških i kliničko-bioloških karakteristika. Istraživanja iz citogenetike i molekularne biologije utvrdila su da različiti podtipovi RCC imaju različite genetske abnormalnosti što se odražava na različit patohistološki izgled, biološko ponašanje i fenotipske karakteristike (6,11,13).



**Slika 4.** Karcinom bubrežne ćelije (preuzeto sa: [www.kancer.rs/karcinom-bubreznih-celija/](http://www.kancer.rs/karcinom-bubreznih-celija/))

#### 1.6.2. Etiologija

Najčešći faktori rizika za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija su:

1. Pušenje je jedan od najčešćih faktora rizika za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija. Pušenje je odgovorno za oko 90% svih slučajeva malignih tumora kod muškaraca i za oko 20-30% karcinoma bubrežnih ćelija, a prestanak pušenja linearno snižava rizik za nastanak pomenutog karcinoma u oba pola, što je pokazala i meta-analiza 26 studija (13). Dokazano je da cigarete sadrže kancerogene materije, ali isto tako u karcinogenezi karcinoma bubrežnih ćelija može imati uticaj i hronična hipoksija zbog ugljen monoksida ili zbog snižene plućne funkcije, a to može imati ulogu i u odnosu na HIF (hypoxia inducible factor) (13,14,15,16). Pored uticaja na nastanak karcinoma, pušenje predstavlja i jedan od faktora rizika za razvoj uznapredovalog karcinoma bubrega (14,15,16).
2. Gojaznost je drugi po značaju faktor rizika za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija. Nekoliko epidemioloških studija, koje su sprovedena među mnogim različitim populacijama, utvrdile su da rizik od karcinoma bubrežnih ćelija raste postepeno sa povećanjem indeksa telesne mase (BMI), kao najčešće mere za

prekomernu težinu. Učestalost karcinoma bubrežnih ćelija kod gojaznih osoba (BMI>29 kg/m<sup>2</sup>) je dvostruko veći od normalnih pojedinaca i oko 50% veći kod gojaznih (BMI 25-30 kg/ m<sup>2</sup>). I u istraživanju Liehr i saradnika navodi se da kod gojaznih osoba postoji predispozicija za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija zbog povećanog nivoa endogenog estrogena (17,18,19,20). Procenjuje se da u Evropi jedna četvrtina karcinoma bubrežnih ćelija kod oba pola, potiče od viška kilograma. Korelacija je veća kod žena, nego kod muškaraca u nekim, ali ne i svim studijama (18,19,20).

3. Hipertenzija, povišen krvni pritisak smatra se faktorom rizika za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija, mada i tumori bubrega mogu da pospeše pojavu hipertenzije. U prilog ovome govore velike kohortne studije kao i studije slučaja i kontrole (18,21,22,23,24). U istraživanju Crow WH i saradnika iz 2000. godine, pokazano je da efikasna kontrola krvnog pritiska umanjuje rizik od nastanka RCC (18,23,24). Primena antihipertenzivnih preparata smatrala se jednim od faktora rizika za nastanak ovog malignoma, ali njihov negativan uticaj još uvek nije dokazan (22,23,24).
4. Ishrana, prema analitičkim studijama, može imati ulogu u razvoju karcinoma bubrežnih ćelija (12,13,25). Međutim, i pored toga što nije dokazana veza između ishrane i rizika od razvoja karcinoma bubrežnih ćelija, neke studije su ukazale da povećani unos masti i proteina korelira sa incidencom javljanja karcinoma bubrežnih ćelija, a da ishrana bogata voćem i povrćem ima zaštitni efekat (24,25).
5. Paritet predstavlja jedan od faktora rizika za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija, ali sa nepodudarnim rezultatima, tako da se smatra da bi za nađeno povećanje incidence karcinoma bubrežnih ćelija kod višerotkinja pre bila odgovorna povećana telesna težina, koja je kod njih češća (26). Pretpostavlja se da je uzimanje oralnih kontraceptivnih sredstava i umereno konzumiranje alkohola ima protektivni efekat, ali samo kod ženskog pola (23,26).

6. Alkohol - Uticaj alkohola na pojavu karcinoma još uvek nije dovoljno jasan. Određene studije ukazuju na povoljan efekat umerenog konzumiranja alkohola, tj. blago do umereno konzumiranje alkohola smanjuje rizik za nastanak karcinoma za 10-20%, nezavisno od ostalih faktora rizika (13,23).
  
7. Profesija - Povećana učestalost karcinoma bubrežnog ćelija dijagnostikovana je kod nekih profesija kao što su: radnici izloženi derivatima kadmijuma i azbesta, radnici u industriji kože, radnici u petrohemijskoj industriji (27,28). U dve kohortne studije izneti su podaci o značajno većoj smrtnosti radnika u proizvodnji azbesta u odnosu na druge profesije (28). Izlaganje arsenu (u vodi za piće ili tokom industrijske proizvodnje), povećava rizik za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija za 30%. Takođe, kao potencionalni karcinogeni faktor za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija u mnogim studijama, pominju se i kadmijum, pesticidi i mikrotoksini (6,13,25,28).  
Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) smatra trihloretilen (sredstvo za omašćivanje metala) i tetrahloretilen (sredstvo za hemijsko čišćenje) kancerogenima kod životinja, a verovatno i kod ljudi (13,25).
  
8. Ostali faktori rizika - terminalna bubrežna insuficijencija i stečena policistična bolest bubrega (6,13,23,24,25).

Nekoliko studija je istraživalo hipotezu da genetske karakteristike mogu da moduliraju efekat izloženosti hemijskim kancerogenima. U jednoj studiji efekat pušenja je jači kod osoba sa sporim genotipom acetilator, kao što je definisano polimorfizama u N-acetiltransferaza 2 gena koja je obuhvaćena u metabolizmu policikličnih aromatičnih ugljovodonika. S druge strane, karcinom bubrežnih ćelija nije povezan sa glutathione S-transferazom (GST) M1 nultim genotipom koji učestvuje u metabolizmu nekoliko kancerogena, ali je značajno smanjen i kod pušača i nepušača koji imaju GST T1 nulti genotip (6,13,23,24).

Oko 2% karcinoma bubrežnih ćelija vezano je za nasledne sindrome od kojih su najznačajniji Von Hippel-Lindau sindrom, nasledni papilarni karcinom bubrega, nasledna leiomiomatoza i karcinom bubrežnih ćelija, Birt-Hogg-Dube sindrom i konstitucionalna



translokacija 3 hromosoma. Karcinom bubrega koji nastaje u sklopu naslednih sindroma javlja se kod mlađih osoba, a češće su bilateralni i multicentrični (6,13,29,30).

**Von Hippel-Lindau sindrom (VHL)** se nasleđuje autozomno-dominantno, a manifestuje se hemangioblastomom centralnog nervnog sistema i retine, svetloćelijskim karcinomom bubrega, feohromocitomom i tumorima gušterače i unutaršnjeg uha. Sindrom nastaje zbog nasledne mutacije VHL tumor supresor gena koji se nalazi na hromozomu 3p25-26. VHL gen koji suprimira tumor ima tri egzona i kodirajuću sekvencu sa 639 nukleotida. Ekspresija VHL gena se zapaža u raznim humanim tkivima, posebno u epitelnim ćelijama kože, gastrointestinalnom, respiratornom i urogenitalnom traktu kao i u organima sa unutrašnjim i spoljašnjim lučenjem. U CNS-u, imunoreaktivnost na pVHL je izražena u neuronima, uključujući i Purkinjeove ćelije cerebeluma (6,30).

Iako se ovi karcinomi češće javljaju kod mlađih osoba i često su multicentrični i bilateralni, karcinomi bubrega koji nastaju u sklopu Von Hippel-Lindau sindroma imaju bolju prognozu, nego sporadični slučajevi svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija (30).

**Nasledni papilarni karcinom bubrega** je nasledno oboljenje sa autozomno-dominantnim nasleđivanjem, a karakterišu ga multipli bilateralni papilarni karcinomi bubrega, najčešće histološkog tipa 1. Uglavnom nastaju u drugoj deceniji života, a često se dijagnostikuje jako kasno, kada su već prisutne metastaze. Povezan je sa lošom prognozom (31). Mutacija MET onkogeni koji se nalazi na hromozomu 7q31 kodira tirozin kinazni receptor, a odgovoran je za nastanak tumora (32).

**Karcinom bubrežnih ćelija udružen sa hereditarnom leiomiomatozom (HLRCC)** je autozomno-dominantno oboljenje koje nastaje zbog mutacije FH gena koji je lociran na 1q42.3-q43. Karakteriše se predispozicijom za benigne leiomiome kože i uterusa i karcinom bubrežnih ćelija. Tipična varijanta karcinoma bubrega je papilarni karcinom tipa 2, najčešće nuklearnog gradusa 3 ili 4. Ovaj tip karcinoma bubrega većinom je pozitivan na vimentin, a negativan na CK7 (6).

Struktura i funkcija FH gena su smeštene na hromozomu 1q42.3-q43, koji se sastoji od 10 egzona i kodira peptid od 511 aminokiselina. Prvi egzon kodira mitohondrijalni signalni peptid. Pored njega u citosolu je, takođe, prisutan i procesovani FH (bez signalnog peptida). Mitohondrijalni FH učestvuje u ciklusu trikarboksilne kiseline

(Krebs) katalizujući pretvaranje fumarata u malat. Za FH se, takođe, zna i da je uključen u ciklus uree. Međutim, uloga citosolnog FH je još uvek donekle nejasna. Bialelna inaktivacija FH-a je uočena u gotovo svim HLRCC (naslednim lejomiomatoznim tumorima). FH mutacije Germline mutacije na FH genu pronađene su u 85% porodica sa HLRCC (naslednim lejomiomatoznim tumorima) (6).

**Birt-Hogg-Dube sindrom (BHD)** karakteriše benigne kožne tumore, naročito fibrofolikulome, trihodiskome i akrokordome, uz koje, u sklopu oboljenja, nastaju spontani pneumotoraks i multipli tumori bubrega, od kojih su najčešći onkocitomi, te hromofobni i papilarni karcinom bubrega. Oboljenje se nasleđuje autozomno-dominantno, a BHD gen se nalazi na hromosomu 17p11.2 (6,33,34).

**Tuberozna skleroza (TS)** je nasledna bolest koja se prenosi autozomno-dominantno, a nastaje usled mutacije ili hromosoma 9q ili 16p, na kojima se nalaze geni TSC1 i TSC2 (35). Bolest se manifestuje multiplim hamartomima, koji mogu zahvatiti bilo koji organski sistem, a najčešće se nalaze na koži, dok se od bubrežnih manifestacija najčešće pojavljuju angiomiolipomi (6,35,36). Ovi bolesnici mogu se javiti i sa cistama bubrega i onkocitomima, a imaju i povećan rizik za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija koji je tada uvek svetloćelijskog tipa. Incidencija nastanka karcinoma bubrežnih ćelija u bolesnika s tuberoznom sklerozom je 2-4% (35,36).

### 1.6.3. **Klinička slika**

Karcinom bubrežnih ćelija u početku ne daje nikakve tegobe, ni smetnje koje bi ukazivale na njegovo prisustvo. Najčešće se dijagnostikuje slučajno, tokom ispitivanja nespecifičnih tegoba, kontrole drugih oboljenja ili sistematskih pregleda. I do 40% bolesnika je bez simptoma u trenutku postavljanja dijagnoze. Zbog toga se trijas, karakterističan za karcinom bubrega, koji čine abdominalni bol, hematurija, odnosno pojava krvi u mokraći i palpabilna abdominalna masa, retko nalaze pri postavljanju dijagnoze. Mnogo češće se bolest manifestuje nespecifičnim simptomima, kao što su gubitak telesne težine, umor, povišena telesna temperatura, bol u truhu, iscrpljenost, anoreksija i dr. Svi ovi simptomi nisu specifični za karcinom bubrega, već se često javljaju kao posledica drugih malignih ili sistemskih bolesti. (37,38).

Klasičan trijas je prisutan samo u oko 5 do 10% slučajeva i tada upućuje na uznapredovalu bolest. Najčešći simptom je hematurija u oko 50% pacijenata, a tek potom bol i palpabilna abdominalna masa u oko 40% pacijenata (37,38,39,40,41).

Pojava krvi u mokraći se objašnjava na više načina. Usled komunikacija bubrežne kore i sistema sabirnih kanalića moguća je direktna invaziju tumora sa posledičnom hematurijom. Takođe, brz tumorski rast može dovesti do pojave nekroze koja zahvata kanaliće i manifestuje pojavom krvi u urinu. Stvaranje tumorskih krvnih sudova (tumorska angiogeneza) takođe može uticati na razvoj hematurije. S obzirom da hematurija u početku može biti i nevidljiva ili mikroskopska, neophodan je pregled urina pre ultrazvučnog pregleda (UZ) ili pregleda kompjuterizovanom tomografijom (CT) (37). Postojanje palpabilnih abdominalnih ili lumbalnih masa i bol u tom regionu su česti kod bolesnika i posledica su lokalnog rasta tumora. Svojom rastom tumor vrši pritisak na bubrežnu i donju šuplju venu, pa su mogući simptomi i znaci uzrokovani venskom opstrukcijom (naglo nastaje obostrani otok donjih ekstremiteta ili varikocela zbog opstrukcije donje šuplje vene) (29,37,38,39,40,41).

Kod bolesnika obolelih od karcinoma bubrežnih ćelija može se javiti i normocitna anemija u oko 33% slučajeva. U laboratorijskim nalazima može biti prisutna povišena sedimentacija eritrocita u oko 50% pacijenata, a ređe eritrocitoza i trombocitoza (6,42,43,44). Sistemska amiloidoza tipa AA javlja se kod oko 3% pacijenata (45,46).

Hepatosplenomegalija, koagulopatija, povećanje visine serumske alkalne fosfataze i transaminaze i alfa-2-koncentracijama globulina može se javiti i kod pacijenata bez metastatske bolesti u jetri (6,42,43). Kod pacijenata kod kojih u trenutku postavljanja dijagnoze postoji i metastatska bolest, metastaze se najčešće nalaze u plućima, mekim tkivima, kostima i jetri (47,48).

Bubreg ima i endokrinu funkciju i vrši sintezu mnogih hormona, neophodnih za normalnu homeostazu. Veća produkcija tih hormona i hormonima sličnih peptida, kao i tumorska sekrecija drugih proteina, kao što su citokini i enzimi, uslovljavaju pojavu paraneoplastičnih sindroma. Karcinom bubrežnih ćelija je jedan od maligniteta koji daje najizraženiji paraneoplastični sindrom koji se registruje u oko 30% bolesnika sa simptomatskim karcinomom bubrežnih ćelija. On može biti prisutan i prilikom dijagnoze karcinoma bubrežnih ćelija kao i tokom same bolesti (47,48,49,50). Paraneoplastični sindrom predstavlja postojanje sistemskih simptoma kod obolelih, koji potiču od samog

tumora, a nisu posledica metastatskih promena ili primenjene terapije. Većina simptoma je uzrokovana proteinima koje luči sam karcinom ili sekundarno, imuni sistem obolelog. Detaljan mehanizam nastanka paraneoplastičnog sindroma je nedovoljno poznat. Pretpostavlja se da nastaje zbog povećanog lučenja citokina, kao što je interleukin-6 (IL6). To je citokin koji je povezan sa inflamatornim procesom i odgovoran je za inflamatorni sindrom u okviru paraneoplastičnog sindroma i obuhvata: povišenu temperaturu, ubranu sedimentaciju eritrocita, anemiju i trombocitozu. Manifestacije paraneoplastičnog sindroma, u okviru karcinoma bubrega, dele se u dve grupe: endokrinu i neendokrinu. U endokrinu grupu spadaju: hipertenzija, hiperkalcemija, poremećaj metabolizma glukoze, galaktoreja, Kušing-ov sindrom, policitemija i nematatska hepatična disfunkcija. Neendokrinu grupu čine: anemija, amiloidoza, nefropatija, vaskulopatija, neuromiopatija, koagulopatija i povećanje prostaglandina. Paraneoplastični sindrom povezan je sa lošom prognozom obolelih (47,49,50,51,52,53,54,55,56).

#### 1.6.4. Dijagnostika

S obzirom da karcinom bubrežnih ćelija u početku ne pravi nikakve tegobe bolesniku nema simptoma koji bi ukazivali na ovo oboljenje u ranoj fazi. Zbog toga se naveći broj karcinoma bubrežnih ćelija otkriva slučajno, prilikom sistematskih pregleda ili u sklopu praćenja drugih oboljenja. Brz tehnološki razvoj imidžing metoda kao što su ultrasonografija /UZ/ i kompjuterizovana tomografija /CT/ i njihova dostupnost široj populaciji, doprinosi ranijem otkrivanju bolesti. Ipak, i pored primene savremenih dijagnostičkih procedura, trećina pacijenata u vreme postavljanja dijagnoze ima metastatsku bolest (57).

Radi postavljanja dijagnoze karcinoma bubrega potrebno je sprovesti niz procedura koje obuhvataju: anamnezu, fizikalni pregled pacijenta, laboratorijsku dijagnostiku, radiološke procedure (ehosongrafija /UZ/, kompjuterizovana tomografija /CT/, nuklearna magnetna rezonanca /NMR/). Od ostalih dijagnostičkih procedura treba spomenuti i arterografiju, selektivna angiografiju, scintigrafiju bubrega i perkutanu biopsiju tumora bubrega (58,59,60).

Fizikalni pregled pacijenata je značajan kod detekcije palpabilne mase u lumbalnoj loži bimanuelnim pregledom (58).

Prilikom dijagnostike karcinoma bubrežnih ćelija, u laboratorijskim nalazima može biti prisutna: povišena sedimentacija eritrocita, povišeni nivo hemoglobina, serumskog kalcijuma, alkalne fosfataze, laktat dehidrogenaze (LDH). Kod 30% pacijenata prisutna je anemija. Zbog hiperprodukcije eritropoetina, kod 2-5% pacijenta javlja se eritrocitoza. U laboratorijskim analizama urina, može se uočiti prisustvo svežih eritrocita ili je sediment urina makroskopski hematuričan (58).

Ehosonografija /UZ/ abdomena, kao dijagnostička procedura je značajna procedura u dijagnostici karcinoma bubrega. Lako se izvodi, jeftina je i sprovodi se kao „skrining“ procedura (61). Oko 83% svih slučajno otkrivenih tumorskih promena na bubregu, otkriveno je ovom procedurom (62).

Kompjuterizovana tomografija /CT/ predstavlja „zlatni standard“ u dijagnostici karcinoma bubrega zbog senzitivnosti i specifičnosti većom od 85% (63). Kod snimanja tumora bubrega CT-om, postoje dve faze: predkontrasna i kontrasna. Ona uključuje CT pre i nakon i.v. datog kontrasta kako bi se potvrdila dijagnoza tumora bubrega, njegova veličina i lokalizacija, obezbedile informacije o funkciji i morfologiji kontalateralnog bubrega, njegovo ekstrarenalno širenje, zahvatanje vene kave i uvećanje okolnih limfnih čvorova, stanje nadbubrega i jetre (64,65).

Za dijagnozu karcinoma bubrežnih ćelija sve češće se koristi perkutana biopsija tumorske lezije kako bi se odredio patohistološki tip tumorske promene i stepen maligniteta, diferencijacija primarnih bubrežnih karcinoma od metastaza kod bolesnika kod kojih je ranije utvrđen ekstrarenalni karcinom. Koristi se i za histološku verifikaciju kod bolesnika koji su kandidati za nehirurški tretman, radi utvrđivanja najpovoljnije ciljane farmakološke terapije koja će dati najbolje preživljavanje, naročito kod prisutnih metastaza (6,7,65). Istraživanja koja su sprovedena u poslednjoj deceniji, pokazala su da je veliki dijagnostički značaj biopsije tumora bubrega (63). Kod izvođenja ove procedure procenat komplikacija, kao i rizik od diseminacije tumorskih ćelija je nizak i iznosi manje od 1% (66).

U istraživanju koje su sprovedeli Wunderlich i saradnici, kod tumora većih od 4 cm, podaci dobijeni biopsijom tumorske lezije, značajno su precizniji kod periferno lokalizovanih tumorskih lezija, u odnosu kada je tumorska lezija bila centralno lokalizovana (67).

U radu Marcona i saradnika, koji je publikovan u European Urology 2016., a kojim je bilo obuhvaćeno 5228 pacijenata, kojima je urađena biopsija tumora bubrega, zaključeno

je da pored ostalog, ova procedura daje značajan doprinos u prognostičkom smislu jer se njom daje uvid o patohistološkom tipu tumora i njegovom malignom potencijalu (68).

Dijagnostičke procedure: arterografija bubrega i selektivna angiografija, scintigrafija bubrega, NMR, CT grudnog koša, CT mozga i druge procedure, primenjuju se ukoliko za to postoje indikacije (65,69,70).

#### 1.6.5. Patohistološki izgled

Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija (najčešći oblik karcinoma bubrega) obično je solitaran i većih dimenzija, okruglaste mase, prečnika 3-15 cm, u simptomatskoj formi. Sve češćom upotrebom radiografskih tehnika visoke rezolucije sa ciljem da se ispituju drugi problemi, slučajno se otkrivaju čak i manji tumorski čvorovi (depoziti). Ovi karcinomi mogu nastati bilo gde u korteksu bubrega. Površina preseka svetloćelijskih karcinoma bubrežnih ćelija je žutonarandžasta, sve do sivkastobeličaste nijanse, sa zonama cističnog razmekšanja ili krvarenja (bilo starog ili svežijeg). Tumor je jasno ograničen. Ipak, ponekad se mali jezičci tumorskog tkiva pružaju u okolni parenhim, a u okolnom tkivu se mogu naći mali satelitski nodusi, što je jasan pokazatelj agresivnosti takvih lezija. Kako tumor raste, može da se dogodi da probije kroz zidove sabirnog sistema i raširi se preko čašica i karlice sve do uretera. Nešto češće, tumor invadira renalnu venu i raste u vidu solidnog stuba unutar lumena krvnog suda, ponekad se zmijoliko šireći sve do donje šuplje vene, pa čak i do desnog srca. Povremeno se vidi i direktna invazija u perinefričko masno tkivo i nadbubrežnu žlezdu (5,6,39,40).

U zavisnosti od količine prisutnih masti i glikogena, tumorske ćelije svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija mogu imati skoro vakuolaran, solidan izgled. Klasične vakuolirane (ispunjene lipidima) ili svetle ćelije oivičene su samo sopstvenim ćelijskim membranama. Jedra su obično mala i okrugla. Na drugom kraju spektra nalaze se granulirane ćelije koje liče na ćelije tubularnog epitela i koje imaju mala, okruglasta, pravilna jedra okružena zrnastom, ružičastom citoplazmom. Kod nekih tumora postoji izrazita anaplazija, sa brojnim mitotskim figurama i značajno uvećanim, hiperhromatičnim i pleomorfnim jedrima. Između suprotnih krajeva spektra, odnosno svetlih ćelija, s jedne strane, i solidnih, granularnih ćelija, s druge strane, mogu se naći sve vrste međuoblika. Tumori se dosta razlikuju i po ćelijskom aranžmanu. Ćelije mogu

praviti abortivne tubule ili se mogu grupisati u trake ili dezorganizovane mase. Stroma tumora je obično oskudna, ali je jako vaskularizovana (5,6,39,40).

Često se unutar tumora nalaze i područja sa ćelijama eozinofilne citoplazme i to češće uz nekrotična ili hemoragična područja, kao i kod karcinoma višeg gradusa. Jezgra tumorskih ćelija su okrugla do ovalna, unimorfna sa ravnomerno raspoređenim hromatinom. Kod oko 5% tumora nalaze se sarkomatoidna žarišta koja su povezana s lošijom prognozom. Unutar tumorskog tkiva nalazi se pravilna mreža krvnih sudova-vena tankih zidova. Većina svetloćelijskih karcinoma bubrežnih ćelija sadrži i siromašan limfocitni infiltrat, koji prvenstveno čine T-limfociti. Imunohistohemijski svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija reaguje sa LMW citokeratinima, CK8, CK18, AE1, Cam 5.2 i vimentinom dok je reaktivnost na HMW citokeratine i 34βE12 retko prisutna. Većina ovih tumora pozitivno reaguje i na CD10, EMA, MUC1 i MUC3 (71,72,73,74,75,76,77,78).

1.6.6. **Histološka klasifikacija tumora bubrega određena prema Klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO)**

**Tabela 1.** Histološka klasifikacija tumora bubrega određena prema WHO

<p><b>I Tumori bubrežnih ćelija (RCT)</b></p> <p>Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija            Multilokularni svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija            Papilarni karcinom bubrežnih ćelija            Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija            Karcinom Belinijevih sabirnih kanalića            Medularni bubrežni karcinom            Xp11.2 translokacijski karcinom            Karcinom bubrežnih ćelija udružen sa neuroblastomom            Mucinozni karcinom tubularnih i vretenastih ćelija            Neklasifikovani karcinom bubrežnih ćelija            Papilarni adenom            Onkocitom</p> <p><b>II Metanefrički tumori</b></p> <p>Metanefrički adenom            Metanefrički adenofibrom            Metanefrički stromalni tumor</p> <p><b>III Nefroblastični tumori</b></p> <p>Nefrogeni ostaci            Nefroblastom            Cistični delimično diferentovani nefroblastom</p> <p><b>IV Mezenhimalni tumori</b></p> <p>Tumori koji se uglavnom javljaju kod dece            Svetloćelijski sarkom            Rabdoidni tumor            Kongenitalni mezoblastični nefrom            Osificirajući bubrežni tumor novorođencadi            Tumori koji se uglavnom javljaju kod odraslih            Lejomiosarkom (invadira u bubrežnu venu)            Angiosarkom            Rabdomiosarkom            Maligni fibrozni histiocitom</p>	<p>Hemangiopericitom            Osteosarkom            Angiomiolipom            Lejomiom            Hemangiom            Limfangiom            Jukstaglomerularni ćelijski tumor            Renomedularni intersticijalni ćelijski tumor            Švanom            Solitarni fibrozni tumor</p> <p><b>V Kombinovani mezenhimalni i epitelni tumori</b></p> <p>Cistični nefrom            Mešoviti epitelni i stromalni tumori            Sinovijalni sarkom</p> <p><b>VI Neuroendokrini tumori</b></p> <p>Karcinoid            Neuroendokrini karcinom            Primitivni neuroektodermalni tumori            Neuroblastom            Feohromocitom</p> <p><b>VII Hematopoezni i limfoidni tumori</b></p> <p>Limfom            Leukemija            Plazmocitom</p> <p><b>VIII Tumori germinativnih ćelija</b></p> <p>Teratom            Horiokarcinom</p> <p><b>IX Metastatski tumori</b></p>
--	--



#### **1.6.6.1. Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija**

Svetloćelijski RCC je maligna neoplazma koja se sastoji od ćelija sa svetlom i/ili eozinofilnom citoplazmom i bogato razgranatom mrežom krvnih sudova (6).

##### ***Makroskopski izgled***

Ovi tumori spadaju u grupu solitarnih, obično nastaju u korteksu, pretežno unilateralno. Multicentričnost i bilateralnost je prisutna u manje od 5% slučajeva i tipična je za mlađe životno doba u sklopu hereditarnih sindroma (pr. Von Hippel-Lindau sindrom) (5,6). Tumori su lobularne građe, prekriveni pseudokapsulom, jasno ograničeni od okolnog tkiva i prominiraju sa površine bubrežnog korteksa. Veličina tumora varira i kreće se od 4-15cm i više. Veličina svakako nije odraz maligniteta. Na preseku je zlatno-žute boje zbog tumorskih ćelija koje su bogate lipidima, holesterolom i fosfolipidima. Često se u tumoru mogu naći ciste, nekroza, hemoragija i kalcifikacije (6).

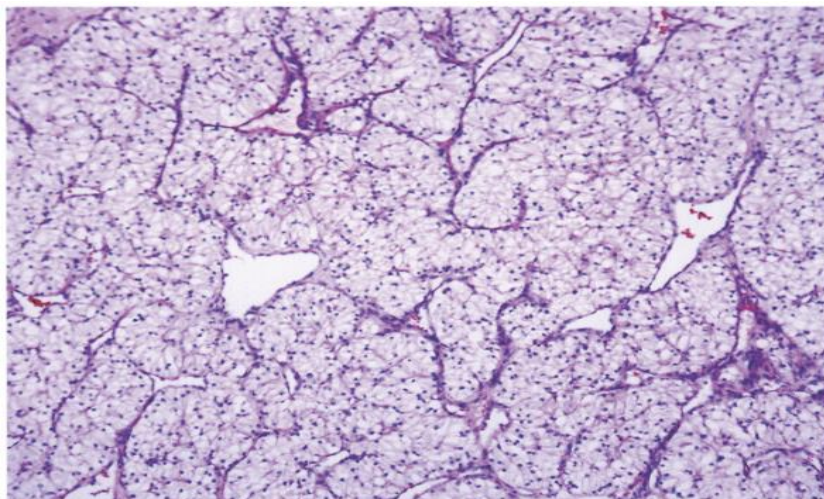


**Slika 5.** Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija (preuzeto od: WHO, 2004)

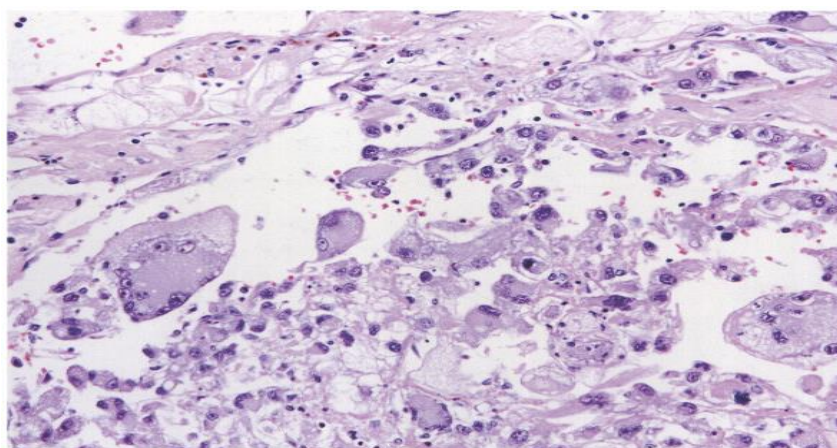
##### ***Mikroskopski izgled***

Svetloćelijski RCC je solidne građe sa alveolarnom i acinusnom strukturom, kao i tipičnom mrežom malih - sitnih krvnih sudova. Acinusne strukture mogu imati centralni, okrugli lumen sa svetloacidofilnom seroznom tečnošću ili ispunjen eritrocitima. Alveolarne i acinusne strukture mogu da se šire praveći mikrocistične i makrocistične strukture. Neretko, tumor može imati tubularnu i pseudotubularnu građu. Citoplazma je

ispunjena lipidima i glikogenom, koji se gube rutinskom histološkom metodom obrade tumorskog tkiva, ostavljajući utisak prazne i blede citoplazme sa izraženom ćelijskom membranom. Mnogi tumori sadrže ćelije sa eozinofilnom citoplazmom, što je tipično za tumore većeg gradusa. Sarkomatoidna komponenta može biti prisutna u skoro 5% ovih tumora i ona govori u prilog lošijoj prognozi. Veći broj svetloćelijskih RCC-a sadrži ćelije imunskog odgovora, tj. limfocitni ili neutrofilni infiltrat (6).



**Slika 6.** Karcinom porekla bubrežnih ćelija, svetloćelijski tip, nuklearni gradus 1 (po Fuhramu) (preuzeto od: WHO, 2004)



**Slika 7.** Karcinom porekla bubrežnih ćelija, svetloćelijski tip, nuklearni gradus 4 (po Fuhramu) (preuzeto od: WHO, 2004)

### ***Imunohistohemijski profil***

Većina ovih tumora pozitivno reaguje sa renal cell carcinoma markerom (RCC-om) - CD10, epitelnim membranskim markerom (EMA) i karbon anhidrazom IX (75,79). Obično su pozitivni i na niskomolekulske citokeratine AE1/AE3, CAM 5.2 i koeksprimiraju vimentin (6).

### ***Somatska genetika***

Mada većina svetloćelijskih karcinoma bubrežnih ćelija nije povezana sa Von Hippel Landau sindromom, 3p delecije su opisane u velikoj većini svetloćelijskih karcinoma bubrežnih ćelija putem konvencionalnih citogenetskih analiza FISH, LOH i CGH (6).

Mutacije VHL gena su opisane u 34-56% karcinoma sporadičnih svetlih ćelija bubrega (RCC). Somatska inaktivacija VHL gena se može javiti usled alelne delecije, mutacije ili epigenetskog utišavanja u 70% ili više slučajeva. Ovi podaci ukazuju na to da je VHL gen najverovatniji tumor supresorski gen kod karcinoma svetlih ćelija bubrega (RCC) (6). Delecije hromozoma 3p su primećene kod veoma malih tumora svetlih ćelija bubrega i smatraju se inicijalnim događajem u razvoju karcinoma svetlih ćelija (6).

Nivoi ekspresije mnogih gena su proučavani kod karcinoma svetlih ćelija bubrega (RCC). Uloga p53 ekspresije kod karcinoma renalnih ćelija je kontroverzna. Nekoliko studija ukazuje da je prekomerna ekspresija p53 povezana sa lošom prognozom i sa sarkomatoidnom transformacijom (6).

Ekspresija receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) je česta kod karcinoma bubrežnih ćelija i predložena je kao prognostički parametar. I dok je amplifikacija EGFR gena na hromozomu 7p13 glavni uzrok EGFR ekspresije kod tumora na mozgu nije uobičajen kod karcinoma renalnih ćelija. HER2/neu amplifikacije su retke ili ne postoje kod karcinoma renalnih ćelija (6).

cDNK analiza niza kod karcinoma svetlih ćelija bubrega pokazala je složene šeme ekspresije gena. Pokazano je da integrisanje podataka o ekspresiji gena i kliničkih podataka mogu da poboljšaju dijagnostikovanje i prognoziranje za karcinom svetlih ćelija bubrega (6).

#### **1.6.6.2. Cistični multilokularni karcinom bubrežnih ćelija**

Cistični multilokularni karcinom bubrežnih ćelija sadrži veliki broj cisti i septi koje se sastoje od malih grupa svetlih ćelija koje se ne mogu razlikovati od tumorskih ćelija tipa svetloćelijskog RCC-a (6).

##### ***Makroskopski izgled***

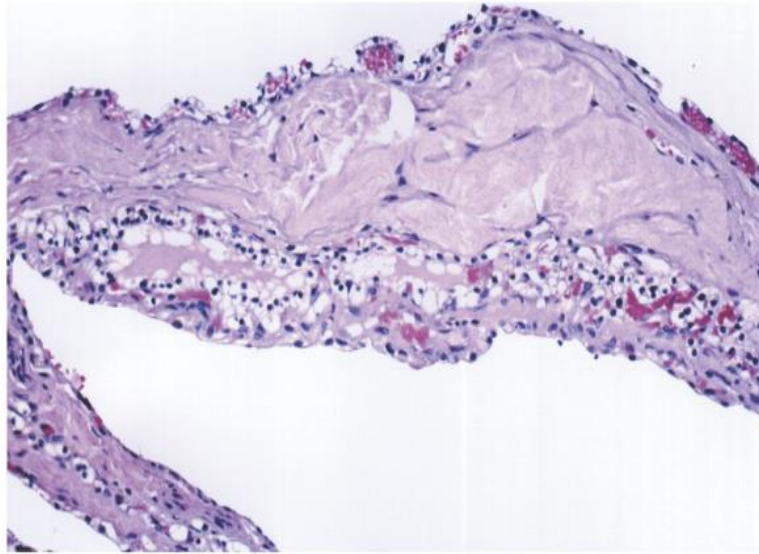
Tumor tipično karakteriše prisustvo brojnih malih i velikih cisti koje su ispunjene seroznom ili hemoragičnom tečnošću, a fibroznom kapsulom odvojene od ostatka bubrežnog parenhima. U više od 20% slučajeva viđaju se kalicifikacije u septama, kao i osealna metaplazija koja može postojati sporadično (6).



**Slika 8.** Cistični multilokularni karcinom bubrežnih ćelija (preuzeto od: WHO, 2004)

##### ***Mikroskopski izgled***

Ciste su obično potpuno ili delimično obložene slojem epitelnih tumorskih ćelija. Tumorske ćelije su pljosnatog ili nabubrelog oblika sa svetlom citoplazmom. Jedra su mala, sferičnog oblika ispunjena hromatinom (6).



**Slika 9.** Cistični multilokularni karcinom bubrežnih ćelija, nuklearni gradus 1 (po Fuhramu) (preuzeto od: WHO, 2004)

#### ***Imunohistohemijski profil***

Imunohistohemijski, tumor odgovara svetloćelijskom RCC-u (6).

#### **1.6.6.3. Papilarni karcinom bubrežnih ćelija**

Papilarni RCC je maligni tumor bubrežnog parenhima sa papilarnom ili tubulopapilarnom građom (6).

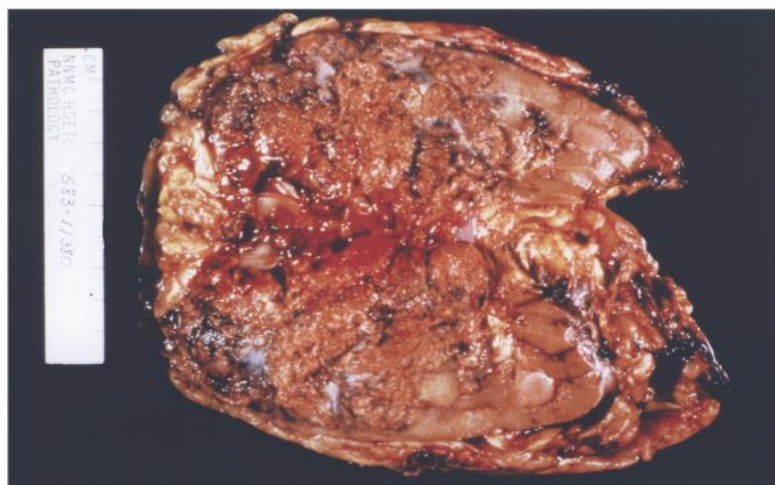
#### ***Epidemiološki podaci***

Tumor čini otprilike 10% svih tumora bubrežnih ćelija (80). Učestalost javljanja po polu i starosnim grupama je slična kao kod svetloćelijskog RCC-a (6).

#### ***Makroskopski izgled***

Tumori mogu biti jasno ograničeni pseudokapsulom, i često sadrže polja hemoragije, nekroze i cistične degeneracije (81). Učestalost bilateralnih i multifokalnih tumora je veća u poređenju sa ostalim tumorima bubrega (6).





**Slika 10.** Papilarni kacinom bubrežnih ćelija (preuzeto od: WHO, 2004)

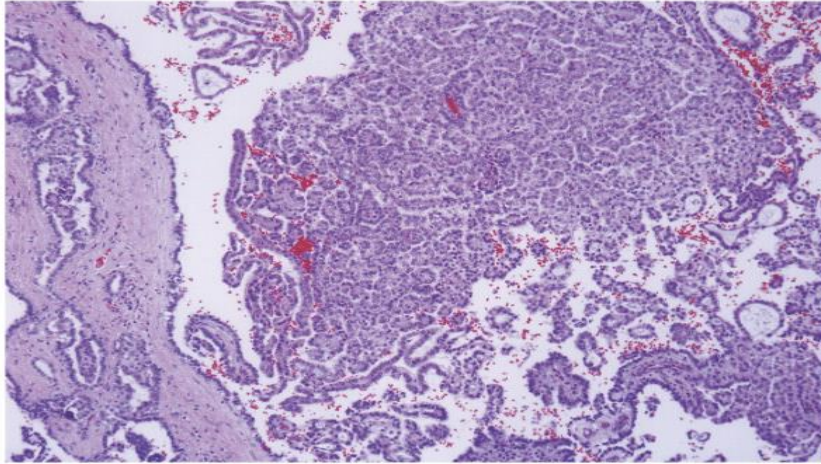
### *Mikroskopski izgled*

Papilarni RCC je karakterističan po malignim epitelnim ćelijama koje formiraju papilarne ili tubularne strukture. Često se mogu videti ciste obložene tumorskim ćelijama koje formiraju papilarne produžetke koji prominiraju u lumen ciste (82). Tumor sadrži razvijenu fibrovaskularnu stromu i nakupine penušavih makrofaga i holesterolskih kristala. Nekroze i hemoragija su često prisutne kao i granule hemosiderina u makrofagima. Često se mogu naći i kalcifikovani kalkulusi u papilama.

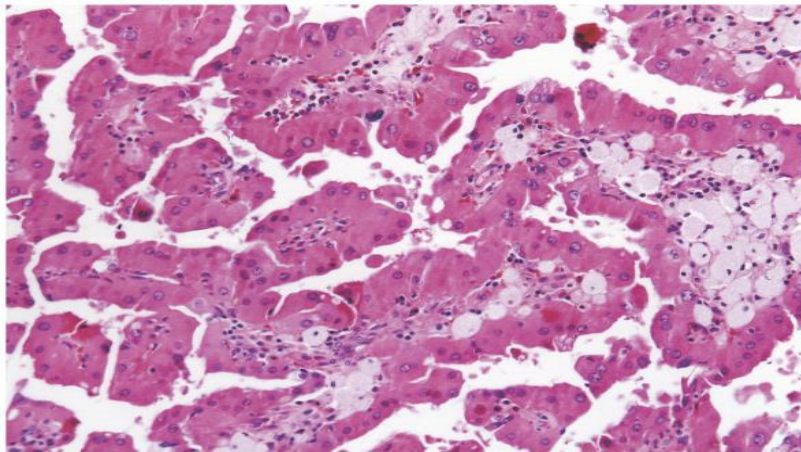
Postoje dva morfološka tipa pRCC (82):

- Tip1 tumori imaju papile prekrivene slojem tumorskih ćelija sa oskudnom citoplazmom;
- Tip2 tumori sastavljeni su od ćelija višeg nuklearnog gradusa, sa eozinofilnom citoplazmom i pseudostratifikovanim jedrima;

Sarkomatoidna diferencijacija je viđena kod 5% ovih tumora i može biti prisutna kod oba tipa (82).



**Slika 11.** Karcinom porekla bubrežnih ćelija, papilarni tip, morfološki tip 1 (preuzeto od: WHO, 2004)



**Slika 12.** Karcinom porekla bubrežnih ćelija, papilarni tip, morfološki tip 2, nuklearni gradus 2 (po Fuhramu) (preuzeto od: WHO, 2004)

### ***Imunohistohemijski profil***

Postoje minimalne imunomorfološke razlike između pRCC tip1 i tip2. Tumorske ćelije su pozitivne na AMACR, CAM 5.2, RCC, CD10, a ponekad i na EMA, Vimentin i S-100. CK7 je češće pozitivan kod tipa 1 (83).

### ***Genetika***

Aktivirajuće mutacije MET onkogeno, koji je mapiran na hromozomu 7q31, su odgovorne za ovo oboljenje. MET kodira receptor tirozin kinaze. Njegov ligand je faktor rasta hepatocita (HGFR). Mutacije u egzonima 16 do 19, tj. domen tirozin kinaze

uzrokuje konstitutivnu aktivaciju nezavisnu od liganda. Duplikacija mutantnog hromozoma 7, koja dovodi do trizomije, prisutna je kod većine HPRC tumora (6).

#### **1.6.6.4. Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija**

Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija karakterišu tumorske ćelije sa svetlom citoplazmom i prominencijama ćelijske membrane (6).

##### *Epidemiološki podaci*

Ovi tumori čine 5% svih hirurški odstranjivih tumora bubrega epitelnog porekla. Najčešće se javljaju u šestoj deceniji života. Podjednako se javljaju kod osoba oba pola. Smrtnost je manja od 10% procenata (84). Postoje sporadične i hereditarne forme bolesti.

##### *Markoskopski izgled*

Tumori su solidni i jasno ograničeni sa blago lobuliranom površinom. Kod nefiksiranih uzoraka, na preseku su homogeno svetle ili tamno braon do svetlo-sive boje nakon fiksacije u formalinu (6).



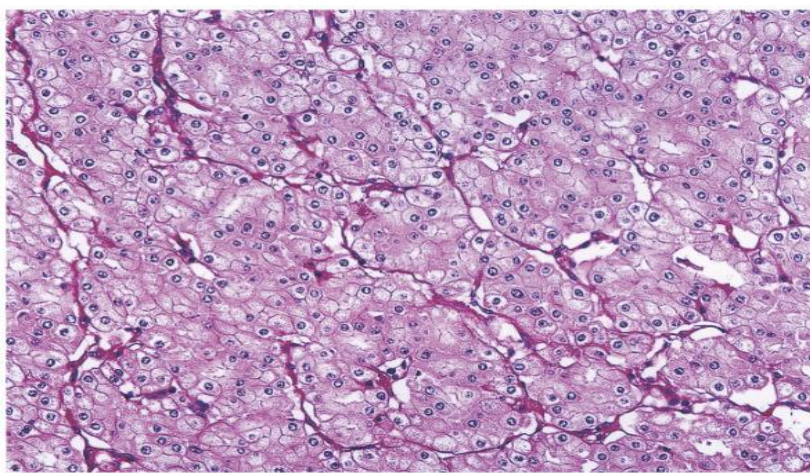
**Slika 13.** Hromofobni karcinom bubrežnih ćelija (preuzeto od: WHO, 2004)

##### *Mikroskopski izgled*

Tumorska masa je solidna, sa fokalnim kalcifikacijama i širokim vezivnim septama. Krvni sudovi imaju zadebljan i ekscentrično hijalinizovan zid, za razliku od



svetloćelijskog RCC-a. Karakterišu ga velike poligonalne ćelije sa providnom i blago retikularnom citoplazmom i prominentnom ćelijskom membranom. Pored ovih, prisutne su i male ćelije sa granuliranom eozinofilnom citoplazmom. Eozinofilna forma hromofobnog karcinoma je u potpunosti sastavljena od tumorskih ćelija sa eozinofilnom citoplazmom i prominentnim ćelijskim membranama (85). Ćelije imaju nepravilno jedro sa izraženom binukleacijom. Prisutan je i perinuklearni halo. Opisane su i sarkomatoidne varijante tumora (86).



**Slika 14.** Karcinom porekla bubrežnih ćelija, hromofobni tip, nuklearni gradus 2 (po Fuhramu) (preuzeto od: WHO, 2004)

### ***Imunohistohemijski profil***

Specifično za dijagnozu ovog tipa tumora je difuzno citoplazmatsko bojenje na Haleovo koloidno gvožđe. Tumor je pozitivan na CK7, CD117, EMA, KS (kidney specific), kadherin, parvalbumin. Hromofobni karcinom je negativan na vimentin (87).

### ***Somatska genetika***

Hromofobne karcinome bubrega karakteriše ekstenzivni gubitak hromozoma, najčešće -1,-2,-6,-10,-13,-17 i -21. Masivni gubici hromozoma vode ka hipodiploidnom DNK indeksu, primećena je endo-reduplikacija/poliploidizacija hipodiploidnih ćelija. Telomeričke veze i skraćivanje telomere su takođe primećeni (6).

#### **1.6.6.5. Karcinom Belinijevih sabirnih kanalića ( „Collecting duct Ca“)**

Karcinom Belinijevih sabirnih kanalića je maligni epitelni tumor koji nastaje iz ćelija Belinijevog sabirnog kanala, koji zajedno sa urotelom, embrionalno poreklo vodi od ureteričnog pupoljka (6).

##### ***Epidemiološki podaci***

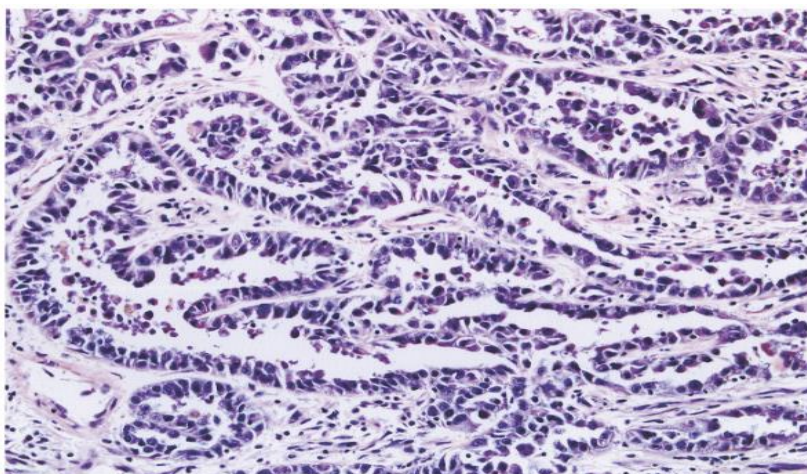
Ovo je redak tumor, koji čini manje od 1% svih bubrežnih maligniteta. Duplo češće se javlja kod muškaraca uzrasta 13-83 godina (88).

##### ***Makroskopski izgled***

Tumor je obično lokalizovan u centralnom delu bubrežnog parenhima. Nejasno je ograničen, sivo-bele boje, sa veličinom koja varira 2,5-12 cm. Neki tumori rastu tako da invadiraju bubrežnu karlicu, sa mogućim poljima nekroze i satelitnim nodulusima (6).

##### ***Mikroskopski izgled***

Dijagnoza ovog tumora je teška i bazira se na isključivanju ostalih tumora. Klasični karcinom sabirnog kanala ima tubularni ili tubulopapilarni rast, žlezde koje infiltrišu bubrežni parenhim i dezmodoplastičnu stromu (89). Nejasno je ograničen od okolnog tkiva.



**Slika 15.** Karcinom porekla bubrežnih ćelija, Collecting duct, nuklearni gradus 2 (po Fuhramu) (preuzeto od: WHO, 2004)

### ***Imunohistohemijski profil***

Imunohistohemijske karakteristike se prepliću između urotelijalnog i RCC-a. Čelije su pozitivne na visokomolekulske citokeratine (CK) i vimentin (88).

### ***Somatska genetika***

Molekularni događaji koji doprinose razvoju karcinoma sabirnog kanala (CDC) su još uvek nedovoljno shvaćeni jer je samo nekoliko slučajeva analizirano. LOH je identifikovan na više hromozomskih krakova kod CDC-a, uključujući 1q,6p, 8p, 13q, i 21q. Gubitak 3p hromozomskog kraka je nađen kod CDC-a. Mapiranje visoke gustine celog dugog kraka hromozoma 1 pokazalo je da je region minimalne delecije smešten na 1q32.1-32.2. Jedna studija je ukazala da 8p LOH može biti povezan sa visokim stadijumom tumora i lošom prognozom za pacijenta. Nasuprot RCC-u, u CDC-u su opisane HER2/neu amplifikacije (6).

### ***Prognoza i faktori predviđanja***

Tipični karcinomi sabirnog kanala imaju lošu prognozu i mnogi su već kod prezentacije metastazirali. Oko dve trećine pacijenata umire u roku od dve godine, nakon postavljanja dijagnoze (6).

#### **1.6.6.6. Xp 11.2.Translokacijski karcinom**

Xp11.2.Translokacijski karcinom karakteriše niz od nekoliko različitih translokacija na hromozomu Xp11.2, koje rezultuju fuzijom TFE3 gena sa određenim genima na drugom hromozomu (6).

### ***Epidemiološki podaci***

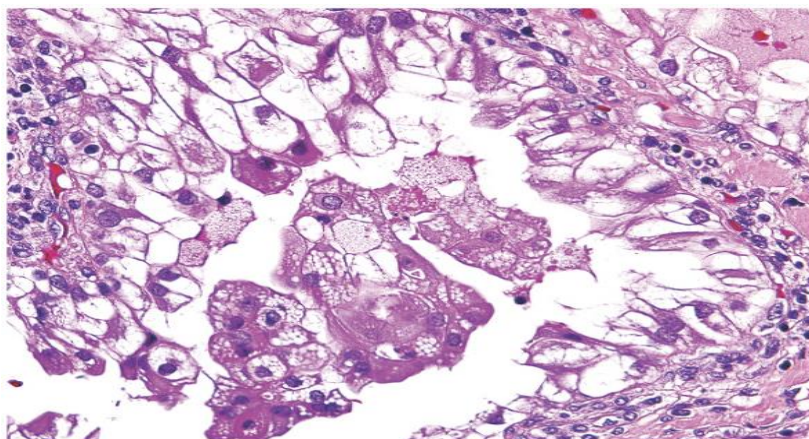
Najčešće se javlja kod dece i mlađih osoba (90).

### ***Makroskopski izgled***

Tumor je mrko-žute boje sa poljima nekroze i hemoragije (11).

### ***Mikroskopski izgled***

Najupečatljivija karakteristika ovih tumora je prisustvo papilarnih struktura sa svetlim ćelijama, i često sa ćelijama sa granuliranom eozinofilnom citoplazmom. Tumorske ćelije su voluminozne, nejasnih granica. Jedra su krupna sa vezikularnim hromatinom i upadljivim jedarcima. Često se mogu naći psamomska telašca i hijalini čvorovi (91).



**Slika 16.** Karcinom porekla bubrežnih ćelija, Translokacijski karcinom (svetloćelijski tip) (preuzeto od: WHO, 2004)

### ***Imunohistohemijski profil***

Najspeifičnija karakteristika karcinoma je pozitivnost na TFE3 protein, a pored toga pokazuje pozitivnost na CD10 i RCC, AMACR, ređe na citokeratin i EMA (91,92).

### ***Somatska genetika***

Ove karcinome određuje nekoliko različitih translokacija koje uključuju hromozom Xp11.2, a sve rezultiraju fuzijama gena koje uključuju TFE3 gen. One uključuju  $t(X;1)(p11.2;q21)$ , što rezultira fuzijom PRCC i TFE3 gena,  $t(X;17)(p11.2;q25)$  koja dovodi do fuzije ASPL (poznat i kao RCC17 ili ASPSCR1) i TFE3 gena,  $t(X;1)(p11.2;p34)$ , koja dovodi do fuzije PSF i TFE3 gena i  $inv(X)(p11;q12)$ , što dalje rezultira fuzijom Non O (p54nrb) i TFE3 gena. TFE3 je član bazične *helix-loop-helix* familije transkripcionih faktora. I PRCC-TFE3 i ASPL-TFE3 fuzioni proteini zadržavaju TFE3 DNA vezujući domen, lokalizuju se na nukleusu i mogu delovati kao aberantni transkripcioni faktori (M. Ladanyi, neobjavljena zapažanja). Nivoi ekspresije TFE3

fuzionih proteina su aberantno visoki u poređenju sa nativnim TFE3, možda zato što su fuzionni partneri TFE3 svuda ekspresovani i daju svoje promotere fuzionim proteinima. Interesantno je da dok i t(X;17) renalni karcinomi i ASPS mekih tkiva sadrže identične ASPL-TFE3 fuzione transkripte, t(X;17) translokacija je konzistentno balansirana (recipročna) kod prvog, a obično nebalansirana kod drugog spomenutog tipa tumora (tj. derivat hromozoma X se ne vidi u ASPS) (6).

### ***Prognoza i faktori predviđanja***

Veoma malo se zna o kliničkoj slici ovih karcinoma. Pošto se pacijenti sa ASPL-TFE3 karcinomom bubrega obično javljaju u odmakloj fazi bolesti, klinički tok ovih oblika za sada izgleda indolentno (6).

## **1.6.7. BENIGNI TUMORI BUBREGA**

Benigni tumori bubrega su retkost. Najvažnije je znati da postoje i da ih ne zamenimo sa mnogo značajnijim malignim tumorima bubrega (5,6).

### **1.6.7.1. Angiomiolipom -AML**

Angiomiolipom je benigni mezenhimalni tumor sačinjen od masnog tkiva, vretenastih glatkih mišićnih ćelija i abnormalnih krvnih sudova debelih zidova (6).

### ***Epidemiološki podaci***

Žene četiri puta češće obolevaju od muškaraca. Smatra se da je tuberozna skleroza (TS) precipitirajući faktor za nastanak tumora (92,93). Kod osoba sa TS tumor se dijagnostikuje kod osoba starosne dobi 25 - 35 godina, dok se kod onih bez TS javlja u starosnoj dobi 45 - 55 godina (92,93).

### ***Etiološki faktori***

Veruje se da angiomiolipom uzrokuje proliferaciju perivaskularnih epitelnih ćelija (94). Međutim, etiološki i patogenetski mehanizmi nastanka tumora još uvek su nedovoljno poznati.



### ***Lokalizacija tumora***

Angiomiolipom može nastati i u korteksu i u meduli bubrega. Može se širiti retroperitonealno. Lezije mogu biti multifokalne (95).

### ***Klinička slika***

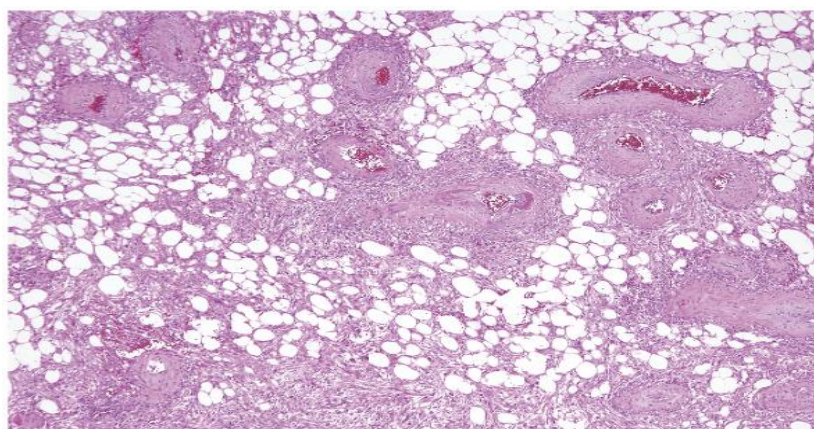
Klinička slika je promenljiva i zavisi pre svega od prisustva ili odsustva tuberozne skleroze (TS). Pacijenti sa TS su obično asimptomatski i tumor se otkrije radiološkim pregledom. Pacijenti bez TS se lekaru javljaju zbog hematurije, bolova u kukovima i palpabilne mase u abdomenu. Može doći i do retroperitonealnog krvarenja (6).

### ***Makroskopski izgled***

Angiomiolipom je solitarni tumor, dobro ograničen, bez kapsule. Boja tumora varira i zavisi od prisustva različitih tkiva. Ukoliko su u tumoru prisutne sve tri komponente, može podsećati na svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija, a ukoliko dominira samo mišićna komponenta, podseća na lejomiom. Tumor može biti jako veliki (6).

### ***Mikroskopski izgled***

Klasični histološki trijas čini prisustvo masnog tkiva, glatkih mišića i loše organizovanih krvnih sudova debelih zidova. Granica tumora i zdravog tkiva je oštra. Neretko se tumor može razviti subkapsularno sa predominacijom glatkih mišićnih ćelija (6).



**Slika 17.** Angiomiolipom (preuzeto od: WHO, 2004)

### ***Imunohistohemijski profil***

Angiomiolipom je pozitivan na melanocitne markere (HMB45, HMB50, CD63, tirozinaza, Mart1/MelanA) i na glatko mišićne markere (glatko mišićni aktin, kalponin, mišićno specifični aktin) (6).

### ***Somatska genetika***

Za dva gena se zna da izazivaju TS. TSC1 gen je lociran na hromozomu 9q34, sadrži 23 egzona i kodira hamartin, 130 kDa protein. TSC2 gen je lociran na hromozomu 16p13, sadrži 41 egzon i kodira tuberin, 180 kDa GTPase-aktivirajući protein za RAP1 i RAB5. Tuberin i hamartin reaguju jedan sa drugim formirajući citoplazmički kompleks. AML često pokazuje gubitak heterozigotnosti (LOH) različitih delova mesta TSC2 gena i kod sporadičnih i kod tumora povezanih sa TS. TSC1 gen je povremeno uključen u LOH (6).

### ***Prognoza i faktori predviđanja***

Klasični AML su benigni. Veoma mali broj se povezuje sa komplikacijama i morbiditetom i mortalitetom. Krvarenja u retroperitoneumu, obično kod tumora većih od 4 cm i trudnica, mogu ugroziti život. Bubrežne ciste i višestruki AML-i kod TS pacijenata mogu dovesti do otkazivanja bubrega (6).

#### **1.6.7.2. Papilarni adenom bubrega**

Papilarni adenomi su tumori dijametra 5 mm ili manje, koje karakteriše papilarna ili tubularna građa niskog nuklearnog gradusa (6).

### ***Epidemiološki podaci***

Papilarni adenomi spadaju u grupu najčešćih neoplazmi epitelnog porekla bubrežnih tubula. Brojna istraživanja su pokazala da je incidenca javljanja ovih tumora u starosnoj dobi do 40 godina 10%, a kod starijih od 70 godina veća od 40% (95). Takođe, navode se hemodijaliza i cistična bolest bubrega kao mogući uzroci nastanka papilarnih tumora (6).

### ***Markoskopski izgled***

Ovi tumori predstavljaju dobro ograničene, žuto-sivkasto-bele čvoriće manje od 1 mm u bubrežnom korteksu. Obično su papilarni adenomi solitarni, ali u nekim slučajevima se sreću multiple i bilateralne forme. Ukoliko se jave u velikom broju, to se naziva “bubrežna adenomatoza” (6).

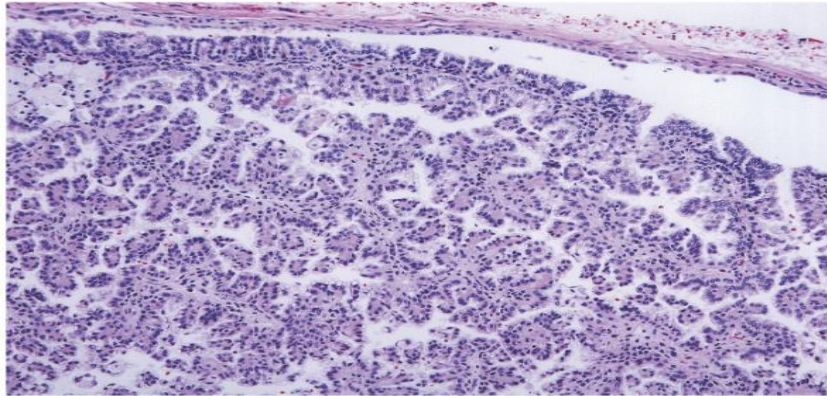
### ***Mikroskopski izgled***

Papilarni adenomi mogu imati tubularnu, papilarnu ili tubulopapilarnu građu koja odgovara izgledu papilarnog karcinoma morfološkog tipa 1 i 2 (96). Neki tumori poseduju fibroznu kapsulu. U većini slučajeva, citoplazma je bleđa i svetla. Psamomska telašca su prisutna (97). U sklopu genetskih ispitivanja koja su rađena u cilju istraživanja povezanosti mutacija i pojave papilarnog adenoma, uočena je veza između gubitka Y hromozoma i kombinovanom trizomijom 7 i 17 hromozoma, i pojave adenoma (6).

### ***Somatska genetika***

Gubitak hromozoma Y i kombinovana trizomija hromozoma 7 i 17 su prve vidljive kariotipske aberacije kod papilarnih bubrežnih tumora. Ova kombinacija genetskih tumora je utvrđena kao jedina kariotipska promena kod malih papilarnih bubrežnih tumora od 2 mm do 5 mm u prečniku, svi sa nuklearnim stepenom 1. Ovi nalazi ukazuju da papilarni adenomi prolaze kroz dodatne genetske promene tokom rasta koje menjaju njihovo biološko ponašanje. Jedna CGH analiza je proučavala 6 papilarnih tumora sa prečnikom manjim od 6 mm i primetila je višak na hromozomu 7 kod 4 uzorka. Ovi podaci sugerišu da genetski događaji koji iniciraju papilarne bubrežne adenome uključuju višak na hromozomu 7 i gubitak hromozoma koji određuje pol. Mali bubrežni tumori pokazuju slične, ali manje ekstenzivne genetske promene od svojih pandana, papilarnih bubrežnih karcinoma. Klinički indolentan tok papilarnih tumora može, delimično, da bude rezultat manjeg broja genetskih promena po jednom tumoru. Međutim, nije moguće razlikovati adenome i karcinome na osnovu genetskih promena pošto mnogi karcinomi pokazuju samo mali broj genetskih promena (6).





**Slika 18.** Papilarni adenom (preuzeto od: WHO, 2004)

### **1.6.7.3. Onkocitom**

Onkocitom je benigni epitelni tumor bubrega sastavljen od krupnih ćelija bogatih mitohondrijama i eozinofilnom citoplazmom (6).

#### ***Epidemiološki podaci***

Onkocitom je prvi opisao Zippel 1942. (98) godine, a kasnije Klein i Valensi (99). Čini ukupno 5% svih bubrežnih neoplazmi epitalnog porekla (100). Brojna ispitivanja su pokazala da se tumor javlja u svim uzrastima, ali sa pikom u sedmoj deceniji života. Muškarci približno dva puta češće obolevaju od žena. Češći su sporadični slučajevi. Nakon hirurškog uklanjanja nikada ne recidivira (6).

#### ***Klinička slika***

Kod većine bolest protiče asimptomatski i slučajno se otkrije u toku radiološkog pregleda. Mada se neki pacijenti javljaju sa hematurijom, palpabilnom masom u abdomen i bolom u kukovima (6).

#### ***Makroskopski izgled***

Onkocitom je dobro ograničen tumor bez kapsule. Boja tumora varira od klasične mahagoni braon boje do blede žute. U 33% slučajeva može se uočiti centralni, zvezdasti ožiljak, koji se češće viđa u tumorima većih dimenzija. Krvarenje u tumoru je prisutno u čak 20% slučajeva, dok je uočljiva nekroza veoma retko prisutna (6).

### ***Mikroskopski izgled***

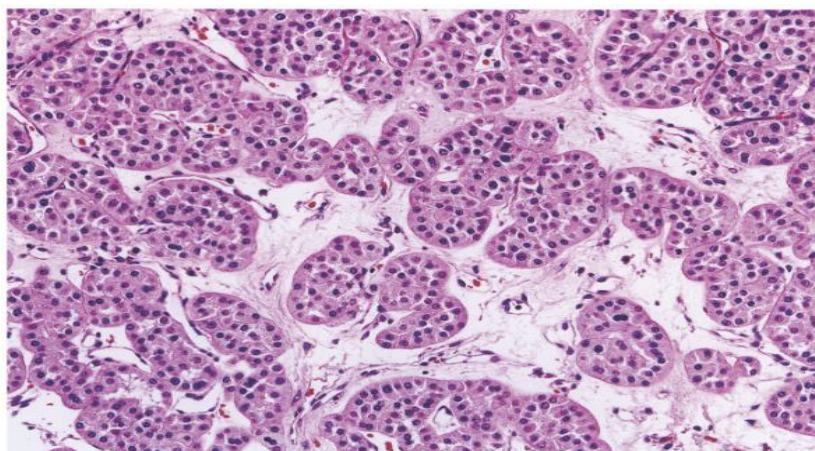
Karakteristično za ove tumore je prisustvo solidnih kompaktnih gnezda, acinusa, tubula ili mikrocisti. Predominantne ćelije (nazvane “onkocitoidne”) su okruglog oblika sa gustim granulama eozinofilne citoplazme. Jedra su okrugla sa ravnomerno raspoređenim hromatinom i centralno postavljenim jedarcetom. Manju grupaciju ćelija, sa oskudnim citoplazmatskim granulama, čini visok nuklearni citoplazmatski odnos i tamno hiperhromatsko jedro koje se jasno uočava. Ponekad se mogu uočiti polja nekroze. Retko su prisutne male papile, dok klasična papilarna građa nije karakteristična za ove tumore. Takođe, retko se uočavaju mikroskopska proširenja tumora u perirenalno masno tkivo (6).

### ***Somatska genetika***

Većina bubrežnih onkocitoma pokazuje mešavinu ćelija sa normalnim i abnormalnim kariotipovima. Kod nekoliko onkocitoma, translokacija t(5;11)(q35;q13) je bila uočena. Neki od ovih slučajeva pokazuju gubitak hromozoma 1 i 14 (6).

### ***Prognoza i faktori predviđanja***

Bubrežni onkocitomi su benigne neoplazme. Ovaj zaključak se bazira uglavnom na podacima iz nekoliko poslednjih studija koje uključuju rigorozan patološki pregled i adekvatno kliničko praćenje tokom koga ni jedan jedini slučaj nije rezultirao smrću pacijenta zbog metastaze oboljenja (6).



**Slika 19.** Onkocitom (preuzeto od: WHO, 2004)

## ***Onkocitomatoza***

Zabeleženo je nekoliko slučajeva u kojima bubrezi sadrže veliki broj lezija onkocitoma sa širokim spektrom morfoloških karakteristika, poput onkocitoma, benignih promena u tubulima, mikrocistama oko tumorskih ćelija itd (101).

### **1.7. Prognostički faktori kod karcinoma bubrežnih ćelija**

Prognostički faktori su veoma korisni za određivanje adekvatnog pristupa. Faktori koji utiču na prognozu su: anatomske, histološke, kliničke i molekularne faktori (6).

U anatomske faktore spadaju veličina tumora, lokalizacija tumora, venska invazija, invazija bubrežne kapsule, zahvaćenost nadbubrega, limfnih čvorova i postojanje udaljenih metastaza. RCC najčešće metastazira u pluća, jetru, kosti i limfne čvorove. Jednogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa brojnim metastazama je manje od 50%, petogodišnje 5-30%, a desetogodišnje 0-5%. Prisustvo visceralnih metastaza daje lošu prognozu. Retroperitonealna limfadenopatija je izuzetno negativan prognostički faktor (6).

U histološke faktore spadaju Fuhrmanov gradus sistem, podtipovi RCC-a, prisustvo sarkomatoidne komponente, mikrovaskularna invazija, prisustvo tumorske nekroze, zahvaćenost sabirnog sistema bubrega. Papilarni i svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija ima lošiju prognozu u odnosu na hromofobni karcinom bubrežnih ćelija. Pacijenti sa sarkomatoidnom komponentom imaju lošije preživljavanje (6).

Klinički faktori su Karnofsky performans status-KPS, paraneoplastički simptomi i laboratorijske promene. Karnofsky performans status se odnosi na opšte stanje pacijenta i predstavlja jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora za preživljavanje. Postojanje paraneoplastičnog sindroma ukazuje na lošu prognozu. On se manifestuje gubitkom telesne težine veće od 10%, febrilnošću i kaheksijom. Laboratorijski nalazi poput anemije, hiperkalcemije, povišene vrednosti alkalne fosfataze u serumu i sedimentacije eritrocita su znaci loše prognoze (6).

Molekularni faktori obuhvataju vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), Ki-67, p53, CA-9, C-reaktivni protein (CRP), E-kadherin, osteopatin i dr. Bojenjem na CA-9 i p53 ili određivanje proliferativnog statusa pomoću Ki-67, koriste se za predviđanje prognoze kod ovih pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija (6).

## 1.8. Određivanje stadijuma širenja tumora (staging)

Internacionalna Unija za borbu protiv raka (IUCC), uvela je 1978. godine TNM klasifikaciju tumora bubrega. Danas je u upotrebi revizija TNM klasifikacije iz 2009. godine i TNM dodatak iz 2012. godine. Za kliničko određivanje stadijuma bolesti još se koriste anamneza, fizikalni pregled pacijenta i laboratorijske analize (6).

**Tabela 2.** TNM klasifikacija

<b>TNM klasifikacija</b>	
<b><u>T – primarni tumor</u></b>	<b><u>N – regionalni limfni čvorovi</u></b>
Tx – prisustvo primarnog tumora ne može biti procenjeno	Nx – nije utvrđeno širenje u regionalne limfne čvorove
To – nema znakova o primarnom tumoru	No – ne postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
T1 – tumor do 7cm ili manji, ograničen na bubreg	N1 – prisustvo metastaze tumora u jednom limfnom čvoru
T1a – tumor do 4cm ili manji, ograničen na bubreg	N2 – prisustvo metastaze tumora u više od jednog limfnog čvora
T1b – tumor veći od 4cm, ali manji od 7cm, ograničen na bubreg	<b><u>M – prisustvo udaljenih metastaza</u></b>
T2 – tumor veći od 7cm, ograničen na bubreg	Mx – nije utvrđeno prisustvo udaljenih metastaza
T2a – tumor veličine 7-10cm, ograničen na bubreg	Mo – bez udaljenih metastaza
T2b – tumor veći od 10cm, ograničen na bubreg	M1 – prisustvo udaljenih metastaza
T3 – tumor zahvata velike vene ili perirenalno tkivo, ali ne i istostranu nadbubrežnu žlezdu i ne probija Gerotijevu fasciju	
T3a – tumor makroskopski zahvata renalnu venu ili njene segmentalne grane koje sadrže mišićni sloj ili tumor zahvata perinealno i/ili masno tkivo renalnog sinusa (peripelvično) masno tkivo, ali ne probija Gerotijevu fasciju	
T3b – tumor makroskopski zahvata venu kavu ispod dijafragme	
T3c – tumor makroskopski zahvata venu kavu iznad dijafragme ili zahvata zid vene kave	
T4 – tumor se širi izvan Gerotijeve fascije (uključujući širenje u istostranu nadbubrežnu žlezdu)	

### **Stadijumi tumora:**

- Stadijum I - T1 No Mo
- Stadijum II - T2 No Mo
- Stadijum III - T3 No Mo ili T1/T2/T3 N1 Mo
- Stadijum IV - T4 bilo koji N Mo  
bilo koji T N2 Mo  
bilo koji T bilo koji N M1

Za određivanje stadijuma tumora, neophodno je sagledati: veličinu i lokalizaciju primarne tumorske lezije i njegov odnos sa okolnim strukturama; ispitati stanje perirenalnih i retroperitonealnih limfnih žlezda; prisustvo tumora u renalnoj i donjoj šupljoj veni; postojanje infiltracije u jetri i nadbubrežima; prisustvo udaljenih metastaza u jetri, plućima, kostima (6).

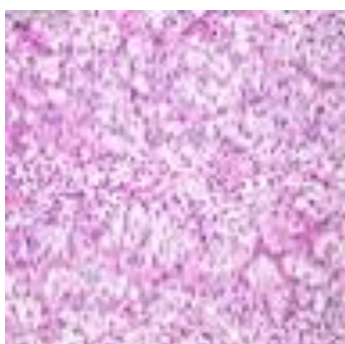
### **1.9. Određivanje gradusa tumora - Fuhrman-ov gradusni sistem (FGS)**

Za procenu histopatološkog stepena ćelijske anaplazije kod svih tipova karcinoma bubrežnih ćelija koristi se Fuhrman-ov gradusni sistem (FGS). Pored stadijuma tumora, on je najbitniji prognostički faktor za karcinome bubrežnih ćelija (102).

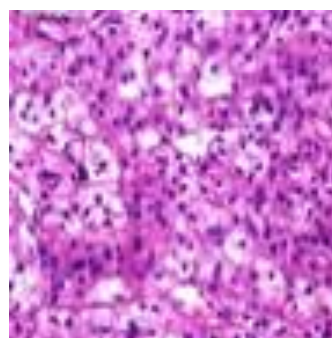
**Tabela 3.** Histopatološki stepen ćelijske anaplazije karcinoma bubrežnih ćelija po Fuhrmanu

Fuhrman gradus I	dobar stepen ćelijske diferencijacije
Fuhrman gradus II	umeren stepen ćelijske diferencijacije
Fuhrman gradus III	loš stepen ćelijske diferencijacije
Fuhrman gradus IV	visok stepen ćelijske anaplazije

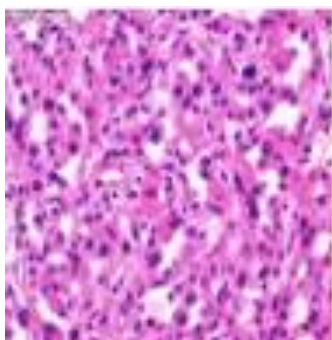
Fuhrman gradusni sistem (FGS) se određuje mikroskopiranjem pri uvećanju od 10x. Tumori gradusa I imaju mala hiperhromatična jedra sa neuočljivim jedarcima, dok tumori gradusa II poseduju fino granulirani hromatin sa teže uočljivim jedarcima. Kod tumora nuklearnog gradusa III, jedarca jasno dominira pri mikroskopskom uvećanju, a nuklearni gradus IV karakteriše ćelijski pleomorfizam i hiperhromazija sa pojedinačnim ili multiplim makronukleolima (103).



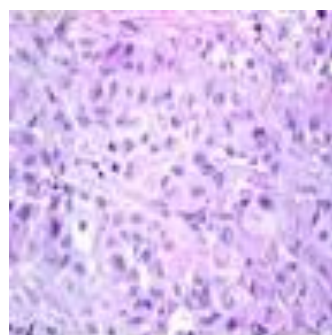
Gradus 1



Gradus 2



Gradus 3



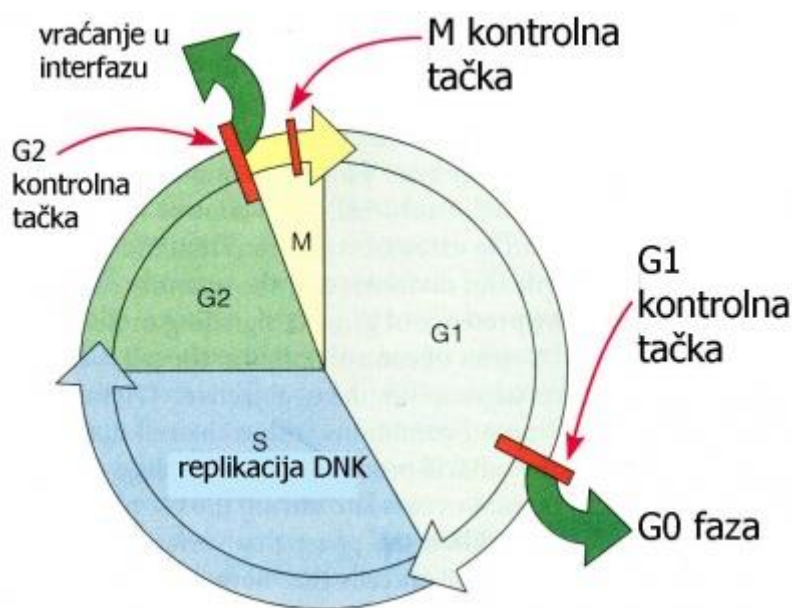
Gradus 4

**Slika 20.** Fuhrmanov nuklearni gradus (preuzeto sa: [www.pathologyoutlines.com](http://www.pathologyoutlines.com))



### 1.10. Ćelijski ciklus – opšte karakteristike

Ćelijski ciklus je proces kojim se ćelije dele na kćerke ćelije. Tradicionalno se deli na 4 faze: G1fazu (faza pripreme za sintezu DNK), S fazu (faza sinteze DNK), G2 fazu (faza pripreme za deobu ćelije) i M fazu (faza deobe ćelije). Mnogi autori fazu mirovanja ili G0 fazu takođe smatraju fazom ćelijskog ciklusa. Na prelazu jedne faze u drugu se nalaze tzv. kontrolne tačke, čija je funkcija da proverava kvalitet i integritet genoma. Regulacija kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, naročito regulacija G1/S kontrolne tačke, dovodi se u vezu sa poreklom/genezom tumora hipofize (104). Progresija kroz ćelijski ciklus je regulisana pomoću ciklin zavisnih kinaza (CZK). Aktivnost CZK je uslovljena fluktuacijama u intracelularnoj koncentraciji njihovih aktivatora (ciklina) ili inhibitora (inhibitor ciklin zavisnih kinaza, ICZK) (105).



**Slika 20.** Ćelijski ciklus

(preuzeto sa: [http://www.bionet-skola.com/w/%C4%86elijski\\_ciklus](http://www.bionet-skola.com/w/%C4%86elijski_ciklus))



### 1.11. Proliferativna aktivnost malignih tumora i markeri proliferativne aktivnosti

Tumore karakteriše proliferativna aktivnost, odnosno brži rast tumora u odnosu na rast normalnog tkiva. Proliferativna aktivnost se ogleda u povećanom broju mitozu (ćelijskih deoba). Mitotski indeks tumora predstavlja broj ćelija u deobi na 100 tumorskih ćelija. To je najstariji i najčešće korišćeni parametar kinetike proliferativnih aktivnosti ćelija tumora, koji i pored mnogih imunohistohemijskih i drugih pokazatelja, i dalje se koristi i predstavlja tzv. "zlatni standard" za rutinsku procenu ćelijske proliferacije tumora. Ovaj metod kvantifikacije proliferativne aktivnosti ćelija tumora zahteva samo standardno pripremljene preseke tkiva obojene hematoksilinom i eozinom (HE) i sposobnost identifikacije „mitotskih figura“. On je najstariji, najbrži i najjeftiniji metod kvantifikacije proliferativne aktivnosti ćelija tumora i najčešće korišćen metod za određivanje proliferativne aktivnosti solidnih tumora kod ljudi (106). Aktuelan je čak i u eksperimentalnim modelima u kulturi tumorskih ćelija. Poznato je da se nekontrolisan rast, kao osnovna karakteristika neoplazmi, nalazi u korelaciji sa sposobnošću metastaziranja, a koja zavisi od velikog broja novostečenih svojstava malignih ćelija (106).

Mitoza (M faza) je faza proliferatornog ćelijskog ciklusa koja u proseku traje 1 sat. Vreme koje ćelije iste linije u kulturi provedu u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa je promenljivo. Tako faza proliferativnog ciklusa ljudske ćelije, koja rapidno proliferiše traje približno 24 sata. Trajanje proliferativnog ciklusa G1 faze je promenljivije. Procenjuje se da najkraće vreme trajanja G1 faze oko 10 sati. Ćelije kod kojih u G1 fazi ciklus traje danima, nedeljama ili godinama, nalaze se u stanju mirovanja, izvan ćelijskog ciklusa, odnosno u G0 fazi (neproliferativni status ćelije). S faza traje 6-12 sati. G2 faza u većine ljudskih ćelija traje 2-4 sata (107).

Određivanje mitotskog indeksa zavisi od: fiksacije tkiva, tipa fiksativa, načina bojenja, debljine preseka tkiva, načina iskazivanja broja ćelija u deobi, izbora uzoraka tkiva i vidnih polja, kao i odabranog postupka brojanja. Kada se primene istovetne tehnike brojanja, određivanje mitotskog indeksa suštinski postaje reproducibilan metod. Kod rutinske primene veličina mitotskog indeksa izražava se u odnosu na tzv. standardno polje, površine od 2 mm<sup>2</sup> (107,108).

Mitotski indeks našao je svoju primenu u klasifikaciji tumora (109), razlikovanju tumora slične morfologije (110), predviđanju biološkog ponašanja tumora (111-113), gradiranju

tumora (114-116), prognozi bolesti uključujući i preživljavanje bolesnika (117-127), proceni potencijala recidiviranja tumora (111,128-130), proceni mogućnosti maligne transformacije (131), proceni verovatnoće metastaziranja (132,133), u odlučivanju o lečenju tumora (134), beleženju efekata lečenja (135,136) i epidemiološkim studijama promene agresivnosti tumora (137).

Zamerke upućene klasičnom načinu određivanja broja ćelija u mitozu odnose se na nedovoljnu reproducibilnost i potrošnju vremena za brojanje (107). Unazad nekoliko godina imunohistohemijski pokazatelji mitotske faze ćelijskog ciklusa MPM-2 i PPH3, upotrebljavaju se u brojanju mitozu na tkivu fiksiranom u formalinu (108).

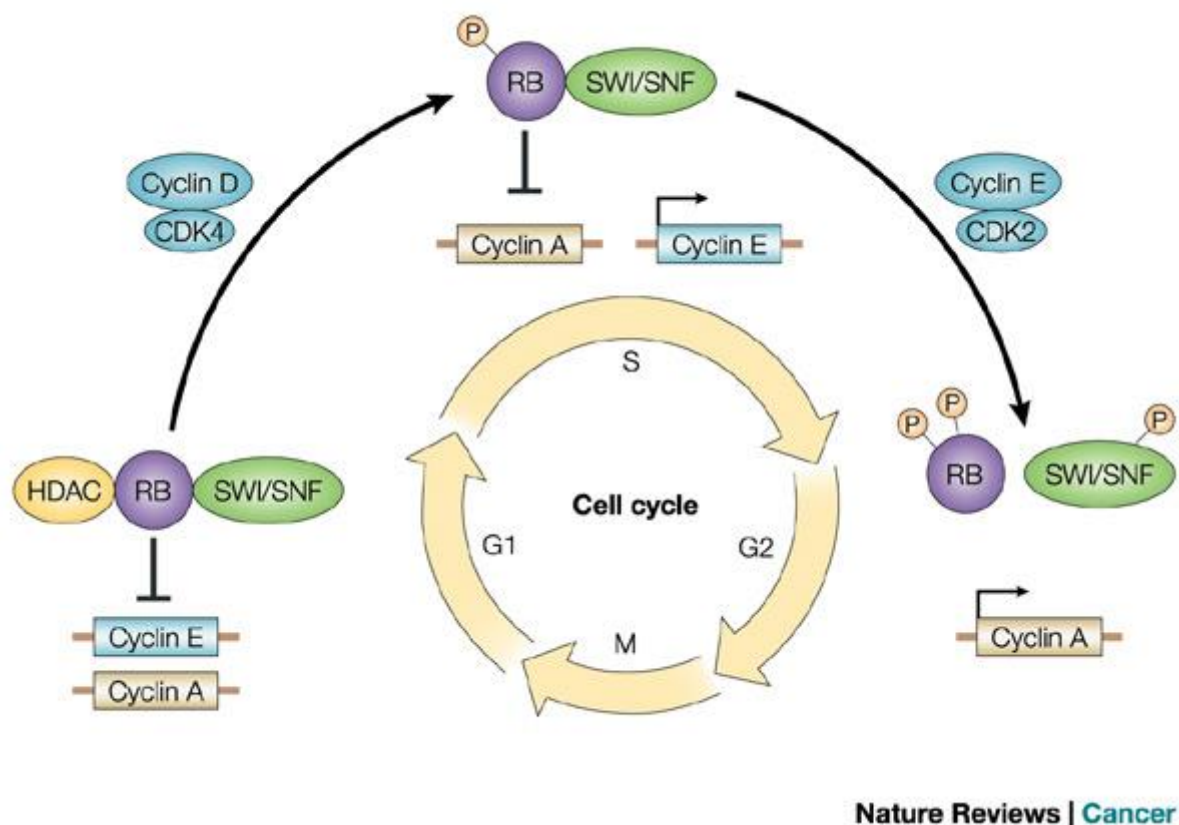
Fosforilisani histon H3 je protein koji se nalazi u jedru ćelije i javlja se samo u mitotskoj fazi ćelijskog ciklusa (138). Radi se o antitelima (zečja, poliklonska, anti-PPH3) odabranim za fosforilisani serin na desetom mestu amino-kraja histona H3, koji je povezan s mitotskom kondenzacijom hromatina, uključujući profazu. Korelacija ovog antitela sa brojem mitotskih figura koji je prepoznat bojenjem HE, veoma je visoka ( $r=0,86$ ;  $p<0,001$ ). Antitelo PPH3 vezuje se za fosforilisani serin na 28. mestu histona H3. U značajnoj korelaciji sa brojem mitozu je i pokazatelj ćelijske proliferacije MCM2 (*minichromosome maintenance protein 2*) (139).

## 1.12. Ćelijski ciklus i maligna transformacija

Povećana ćelijska proliferacija koja vodi do nastanka tumora javlja se kao posledica poremećaja ćelijskog ciklusa. Smatra se da su u tumorskim ćelijama mehanizmi koji normalno sprečavaju ćelijsku deobu inaktivirani, u korist onih koji stimulišu deobe. Veruje se da

gubitak funkcije pRb-a stimuliše abnormalnu proliferaciju kao rezultat deregulacije E2F transkripcionih faktora koju prati povećana ekspresija specifičnih gena S faze. I pozitivni (ciklini i CDKs) i negativni (CDKI) regulatori ćelijskog ciklusa, koji funkcionišu preko pRb-a, takođe mogu biti izmenjeni tokom proliferativnih bolesti (140).

### 1.13. Ciklin A



**Slika 21.** Ciklin A

(preuzeto sa:[http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n2/fig\\_tab/nrc1273\\_F6.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n2/fig_tab/nrc1273_F6.html))

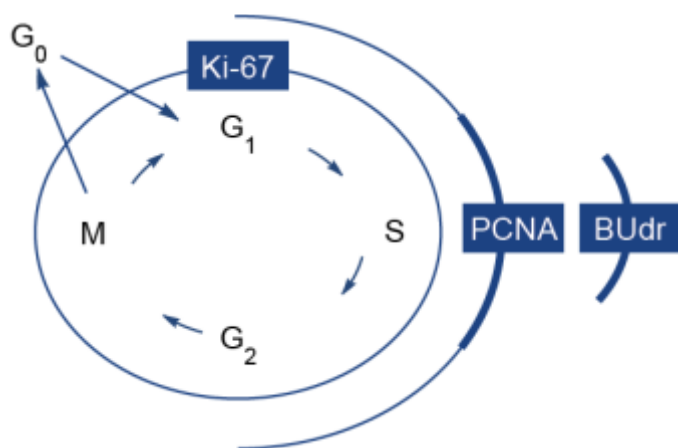
Ciklin A je protein od 60 kD, koji je uključen u kontrolu replikacije molekula DNK i ćelijskog ciklusa. Poznato je da kod ljudi postoje dve forme ovog ciklina: A1 i A2. Gen CCNA1 odgovoran za produkciju ciklina A1 lokalizovan je na hromozomu 13, dok je gen CCNA2 koji kodira drugu formu smešten na hromozomu 4. Ciklin A2 značajan je u procesima embriogeneze, kao i za regulaciju mejoze (141). S druge strane, ciklin A2 učestvuje u procesima vezanim za kontrolu ćelijskog ciklusa somatskih ćelija (142). Ovaj ciklin je zanimljiv zbog činjenice da može da formira komplekse sa dve ciklin zavisne kinaze: CDK1 i CDK2. Ova osobina omogućava proteinu da bude uključen u kontrolu nekoliko etapa ćelijskog ciklusa. Ciklan A se proizvodi i transportuje u jedro tokom S i G<sub>2</sub> faze i degradira se kada ćelija uđe u M fazu (143,144). Njegova ekspresija postoji u

kasnoj G1 fazi, dostiže maksimum tokom S faze i rane mitoze, a kada je povezan sa CDK1, započinje kondenzaciju hromozoma i najverovatnije cepanje nuklearnog omotača (140). Smatra se da ciklin A u mitozu stabilizuje ciklin B, određuje njegov poluzivot sprečavajući degradaciju ciklina. Ciklin A se degradira tokom mitoze, a neposredno pre metafaze (143). Za degradaciju je neophodna veza ciklina A i njegovog CDK partnera (144). S obzirom da je svaki ciklin odgovoran za fosforilaciju specifične grupe CDK supstrata, smatra se da nakon degradacije ciklina, specifični supstrati treba da se defosforilišu. Stoga, uređena destrukcija različitih ciklina pomaže da se utvrdi tačan redosled događaja u kasnoj mitozu (145). Pravovremena degradacija ciklina A i B je ključni događaj u mitozu. Izostanak degradacije ciklina A, kao posledica mutacije gena koji kodira ciklin A protein (CCNA), dovodi do zastoja ćelije u metafazi, dok mutacije ciklin B gena zaustavljaju ćeliju u anafazi (146,147).

Kontrola ekspresije ciklina A obavlja se na nivou transkripcije. E2F je jedan od ključnih regulatora nivoa ciklina A u toku ćelijskog ciklusa. Ovaj transkripcioni faktor vezuje se za specifične sekvence u okviru promotora gena CCNA2 i na taj način dovodi do aktivacije transkripcije. Pokazano je da povećanje nivoa p53 nakon oštećenja DNK, dovodi do inhibicije sinteze ciklina A, proteina p21. Ovaj protein sprečava delovanje kompleksa ciklin D-CDK4 što održava E2F u kompleksu sa proteinom Rb (148).

Pokazano je da poremećaji ekspresije regulatora ćelijskog ciklusa, kao što je ciklin A, mogu imati značajnu ulogu u tumorogenezi (149). Prekomerna ekspresija ciklina A je uočena u velikom broju humanih tumora, kao što su skvamozni karcinom usne duplje (150), karcinom kolona (151,152), karcinom laringsa (153,154), invazivni maligni melanom (155), karcinom štitaste žlezde (156), karcinom pluća (157,158), Bovenova bolest (159), adenokarcinom prostate (160), karcinom dojke (161), tranziciocelularni karcinom bubrega i uretera (162). Prekomerna ekspresija ciklina A u ovim tumorima je u korelaciji sa nepovoljnim prognostičkim faktorima. Obično postoji koekspresija ciklina A sa proliferativnim markerima kao što su PCNA (proliferating cell nuclear antigen) i Ki67 (149). Nasuprot tome, pokazana je prekomerna ekspresija ciklina A u normalnoj sluznici kolona (163) i u karcinomu jajnika sa dužim periodom preživljavanja (164).

#### 1.14. Ki67



**Slika 22.** Ki67 (preuzeto sa : <http://www.keywordsking.com/a2ktNjcgZmxvdw/>)

Protein Ki-67 je primarno bio definisan kao prototip monoklalnog mišijeg antitela sintetisanog nakon imunizacije životinja jedrima ćelija Hodgkinovog limfoma koja pripadaju ćelijskoj liniji L428. Naziv proteina potiče od imena grada u kome je prvi put sintetisan (Kiel) i broja klona. Budući da antigen na kojeg je generisano antitelo nije inicijalno jasno definisan, imenovan je kao Ki-67 antigen. Međutim, kada je struktura proteina - antigena bila prepoznata na osnovu cDNK, ona nije odgovarala ni jednom poznatom proteinu, te je zato zadržan naziv proteina Ki-67 (165). Ki-67 je marker proliferacije kako netumorskih, tako i tumorskih ćelija. Tokom interfaze, Ki-67 se detektuje u jedru, dok je tokom mitoze translociran na površinu hromozoma. Ki-67 se detektuje u svim fazama ćelijskog ciklusa (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M), izuzev u G<sub>0</sub> fazi (165).

Iako tačna funkcija proteina Ki-67 u ćelijskom ciklusu još nije prepoznata, nesumnjivo je da su ekspresija proteina Ki-67 i ćelijski ciklus neraskidivo povezani. Sa druge strane, još nije prepoznat protein koji sa takvom preciznošću detektuje ćelije koje se nalaze izvan G<sub>0</sub> faze ćelijskog ciklusa. Smatra se da varijacije u intenzitetu imunohistohemijskog bojenja zavise od podfaze ćelijskog ciklusa u kojoj se ćelija nalazi (165).

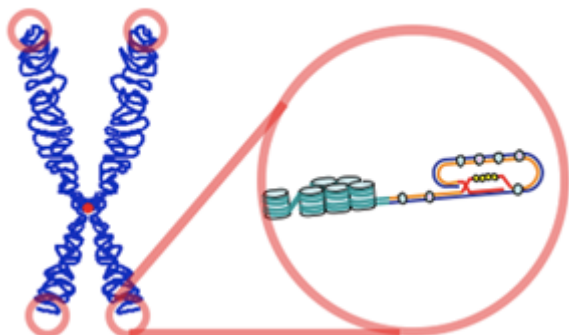
Imunohistochemijsko bojenje Ki-67 ima široku primenu u patologiji u svakodnevnoj praksi. Klon Ki-67 MIB-1 je postao neizostavan kako dijagnostički, tako i prognostički marker (165).

Iako je kao u većini imunohistochemijskih bojenja, procena proliferativne aktivnosti tumora antitelima Ki-67 ili MIB-1 potencionalno korisna u odabranim situacijama, u mnogim slučajevima ona verovatno ne pruža više od pažljivog ispitivanja mitotske aktivnosti (166). Takođe, poznato je da odložena fiksacija utiče na otkrivanje mitotskih figura, što nema uticaja na procenu proliferativne aktivnosti kod korišćenja ekvivalenata Ki-67 (167). Ipak, među ekvivalentima Ki-67, kao što su monoklonska MIB-1 (DAKO) i MM1 (Novocastra), te poliklonski imunoglobulini NCL-Ki-67p (Novocastra) i Rah Ki-67 (DAKO), najveći indeks obeležavanja na parafinskim uzorcima ima MIB-1, i to u proseku oko 30% veći od ostalih, ali je na sreću, neznačajno. Postoji značajna korelacija broja mitozu i Ki-67 pozitivnosti (168).

Povećana proliferacija ćelija, bez obzira na primenjen metod otkrivanja, snažno korelira s lošom prognozom. Brojanje mitozu obezbeđuje najreproducibilnije i nezavisne prognostičke rezultate (169).

Indeks ćelija u mitozu ostaje nezaobilazni parametar kinetike ćelijske proliferacije (121,170) i u nekim slučajevima, kao što su gastrointestinalni stromalni tumori (171), jedini nezavisni prognostički indikator u odnosu na druge pokazatelje ćelijske proliferacije, poput Ki-67 ili ciklina D1 (165).

### 1.15. Telomeraza



**Slika 23.** Telomera

(preuzeto sa: <https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-replication/a/telomeres-telomerase>)

Telomeraza je visokoodrživ enzim i predstavlja specifičnu reverznu ćelijsku transkriptazu koja služi kao katalizator sinteze i produžavanja DNA telomera njegovim sopstvenim RNA uzorkom (172,173). Telomeraza nadoknađuje gubitak telomera usled problema replikacije na kraju niza (174), a izražen je u oplodnim ćelijama, proliferativnim ćelijama pri obnavljanju tkiva i „besmrtnim“ ćelijama (175). Aktiviranje telomeraze i stabilizovanje telomera podržavaju hipotezu da je održavanje telomera od suštinske važnosti za postizanje „besmrtnostikancerogenih ćelija i mogu da predstavljaju korak u ograničavanju stope rasta kancera (175,176). U ispitivanjima korišćenjem vrhunski senzitivnog PCR, aktivnost telomeraze je otkrivena u skoro 85% do 90% uzoraka karcinoma kod ljudi (176), a nivoi aktivnosti telomeraze su procenjeni pomoću TRAP ispitivanja variraju od jednog kancerogenog tkiva do drugog (177-180). Dobijeni rezultati ukazuju na to da ljudske kancerogene ćelije *in vivo* nemaju uvek, ili ne zahtevaju, reaktiviranje telomeraze (175,177,178). Istraživanja vezana za neuroblastom, karcinom pluća, dojke, gastrointestinaln sistema, kolorektuma i pankreasa, pokazala su da aktivnost telomeraze može da bude korisna pri otkrivanju kancerogenih ćelija (177-183). U nekim slučajevima, visoka aktivnost telomeraze u uzorcima tumora statistički se poklapa sa lošom prognozom maligne bolesti. Jedno od najznačajnijih pitanja koje je još uvek otvoreno, odnosi se na to, šta u uzorcima karcinoma predstavlja na ćelijskom nivou jaka ili blaga aktivnost telomeraze. Nameću se dva objašnjenja. Prvo, varijacije u aktivnosti

telomeraze u skladu su sa vrstom tkiva i mogu da budu posledica različitih nivoa prisustva telomeraze u svakoj ćeliji tumora. Drugo, ova razlika može da bude i posledica apsolutnog broja ćelija tumora u okviru tumora kod kojih se uočava aktivnost telomeraze. Da bi se odredilo koje je objašnjenje tačno, ili da li su oba tačna, potrebne su i tehnike za ispitivanje distribucije proteina reverzne transkriptaze humane telomeraze (*hTERT*) na ćelijskom nivou kod biopsijskih uzoraka tumora (184).

Humana telomeraza se sastoji od dva dela, iz integralne RNK matrice (TERC) koja obezbeđuje uzorak za sintezu telomerskog ponavljanja kod ljudi (TTAGGG)<sub>n</sub> i reverzne transkriptaze humane telomeraze (*hTERT*), koja je 127 kD protein i koji vrši funkciju katalizatora u razmnožavanju (ponavljanju) krajeva linearne DNA (57). *hTERT* komponenta dodaje (TTAGGG)<sub>n</sub> ponovke na krajeve telomera, koristeći TERC komponentu kao matricu za reverznu transkripciju, odnosno sintezu DNK na osnovu RNK (185-187).

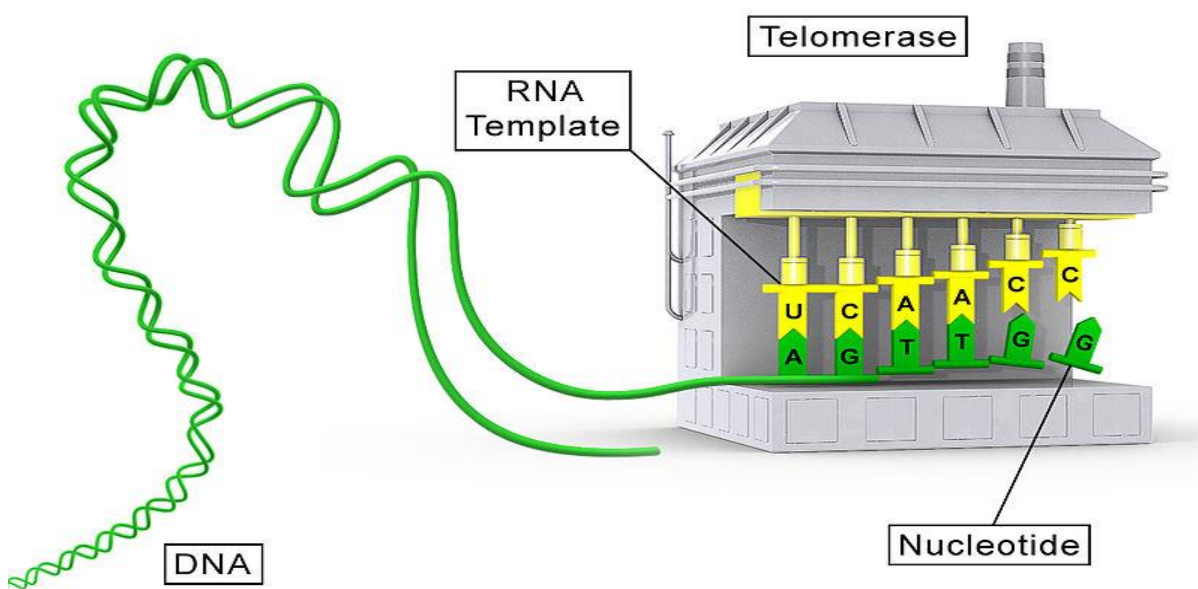
Iako su drugi sastojci kao što je hTEP1 (protein vezan za telomerazu, 1) (188), hsp90 i p23 (189) prisutni u kompleksu (jedinjenju) humane telomeraze *in vivo*, njihova uloga u funkcionisanju telomeraze nije tako jasna. Studije *in vitro* koje su koristile preparate retikulolizata zečeva i *hTERT* protein pokazuju da su ove dve komponente dovoljne da se ponovo uspostavi aktivnost telomeraze (190). Iako izraženost hTR može da se otkrije analizom Northern blot, primenom Northern blot analize ili *in situ* hibridizacije (ISH) vrlo je teško otkriti veoma slabo prisustvo *hTERT* mRNA u ćelijama i tkivima sa aktivnošću telomeraze. Primenom RT-PCR, prisustvo *hTERT* mRNA je u skladu sa nivoima aktivnosti telomeraze *in vitro* i *in vivo* (191,192), ali alternativne varijante spajanja *hTERT*a mogu da izazovu pogrešna tumačenja izraženosti *hTERT* (193). Postupcima Northern ili RT-PCR može da se proceni ukupna količina telomeraze u celokupnim tkivima, ali ne mogu da se procene nivoi aktivacije telomeraze u svakoj ćeliji (184).

Aktivnost telomeraze je suzbijena tokom embrionske faze razvoja u većini tkiva (191,194), ali se može videti kod proliferativnih oplodnih ćelija, ćelija nalik na proliferativne hematopoetične ćelije, aktiviranih limfocita, proliferativnih premenopauzних endometrijskih ćelija, podskupa ćelija epiderma i u kriptama creva (195-198). Ove ćelije mogu da postanu izvor aktivnosti telomeraze u tumorskim tkivima koja pokazuju jasnu aktivnost telomeraze. Stoga bi otkrivanje aktivacije telomeraze na



ćelijskom nivou na uzorcima tumora, olakšalo procenu porekla aktivnosti telomeraze (184).

Postojanje kompenzatornih mehanizama za skraćivanje telomera je prvi predvideo sovjetski biolog Aleksej Olovnikov 1973. godine (199). On je takođe predložio telomernu hipotezu starenja i povezanost telomera sa karcinomom. Telomerazu su otkrili Kerol Grajder i Elizabet Blekbern 1984. godine kod trepljara *Tetrahymena* (200). Zajedno sa Džekom Šostakom, Grajder i Blekbern su nagrađeni za ovo otkriće Nobelovom nagradom za fiziologiju i medicinu 2009. godine (201).



**Slika 24.** RNA-vođena DNK polimeraza; konceptualni dijagram koji pokazuje telomerazu i njenu RNA komponentu vezanu za DNK (preuzeto sa: <https://sr.wikipedia.org/wiki/Telomeraza>)

### 1.15.1. Telomeraza i karcinom bubrežnih ćelija (RCC)

#### **Promene kod karcinoma bubrežnih ćelija (RCC)**

Telomeraza je često prisutan enzim kod malignih tumora, a odsutan je kod većine ljudskih somatskih tkiva. Ovaj enzim formira krajeve većine hromozoma DNK (telomera)

dodavanjem heksamernih (TTAGGG)<sub>n</sub> nukleotidnih ponovaka. Kod ćelija kod kojih nedostaje aktivna telomeraza, telomere se skrate sa svakim ćelijskim ciklusom i to rezultira starenje ćelije. Kada se aktivira, telomere se skrate sa svakim ćelijskim ciklusom, a zatim ide kompenzatorno produženje ćelija, koje se potom umnožavaju i na kraju postaju besmrtno i metastaziraju. Ovaj kompleksan multigenetski proces može dokazati da je telomeraza koristan marker tumorske progresije i ishoda bolesti pacijenta (202).

Odsustvo telomerase u većini somatskim ćelijama i njeno prisustvo u većini malignih tumora, učinilo je enzim preovlađujućim dijagnostičkim markerom (202).

Merenje telomernosti može da pruži dodatne informacije koje mogu biti korisne kao marker za tumorsku progresiju i ishod pacijenata. Detekcija aktivnosti telomerase kod karcinoma bubrežnih ćelija može biti ključ za razumevanje gubitka kontrole rasta u ćelijama tumora (202).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

CILJEVI ISTRAŽIVANJA SU:

1. Imunohistohemijski ispitati intenzitet ekspresije ciklina A kod RCC i analizirati korelaciju ekspresije ciklina A sa kliničko-morfološkim karakteristikama RCC (stadijumom tumora, nuklearnim gradusom tumora, histopatološkim tipom, veličinom tumora i preživljavanjem (u mesecima) ;
2. Imunohistohemijski ispitati intenzitet ekspresije Ki67 kod RCC i analizirati korelaciju ekspresije Ki67 sa kliničko-morfološkim karakteristikama RCC (stadijumom tumora, nuklearnim gradusom tumora, histopatološkim tipom, veličinom tumora i preživljavanjem (u mesecima) ;
3. Imunohistohemijski ispitati intenzitet ekspresije telomeraze kod RCC i analizirati korelaciju ekspresije telomeraze sa kliničko-morfološkim karakteristikama RCC (stadijumom tumora, nuklearnim gradusom tumora, histopatološkim tipom, veličinom tumora i preživljavanjem (u mesecima) ;
4. Analizirati promotorski region hTERT gena i detektovati prisustvo mutacija i polimorfizma -245T>C kod ispitivanih pacijenata sa RCC ;
5. Analizirati prisustvo genske amplifikacije u promotorskom regionu hTERT gena kod ispitivanih pacijenata sa RCC, kao i povezanost između hTERT amplifikacije i epidemioloških, kliničkih i patoloških nalaza;
6. Analizirati metilacioni status promotorskog regiona hTERT gena kod ispitivanih pacijenata sa RCC ;

### 3. MATERIJAL I METODE

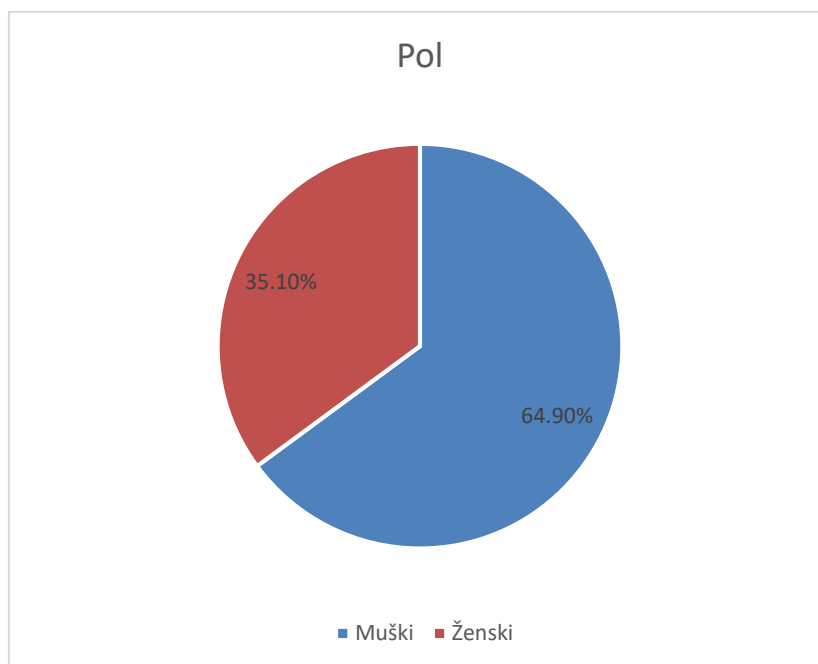
#### 3.1. ISPITIVANI PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL

Za izradu doktorske disertacije korišćen je operativni materijal pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija (RCC), dobijen parcijalnom nefrektomijom na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i Kliničko-bolničkom centru „Dr Dragiša Mišović“, a dijagnostikovano na Institutu za Patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od 2010. do 2013. godine.

Za obrađeni materijal postoji odobrenje Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije (KCS) i Kliničko-bolničkom centru „Dr Dragiša Mišović“.

Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom.

Studijom je bilo obuhvaćeno 74 pacijenta, i to 48 pacijenata muškog pola (64,9%) i 26 pacijenata ženskog pola (35,1%) sa histopatološki verifikovanim karcinomom bubrežnih ćelija (RCC) (Grafikon 1).



**Grafikon 1.** Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

Za svakog pacijenta su prikupljeni sledeći kliničko-morfološki podaci: pol, godine starosti, stadijum tumora, nuklearni gradus tumora, histopatološki tip tumora (HP), veličina (dimenzije) tumora i preživljavanje (u mesecima).

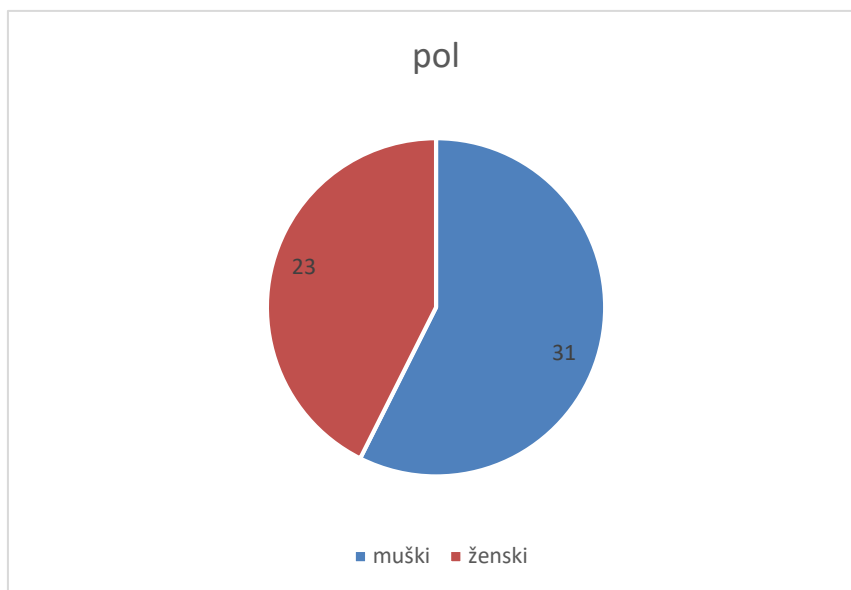
Operativni materijal pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija (RCC) posle obrade i kalupljenja, najpre je obojen hematoksilin-eozinom (H&E) i postavljena je histopatološka dijagnoza RCC, a kasnije su rađene imunohistohemijske metode i molekularno-genetičko istraživanja.

Obrada operativnog materijala RCC-a, bojenje hematoksilin-eozinom i imunohistohemijsko bojenje urađeno je na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Molekularno-genetičko istraživanje sprovedeno je u saradnji sa Laboratorijom za genetiku Instituta za Neurologiju KCS i Laboratorijom za genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Molekularno-genetičko istraživanje je obuhvatalo: izolaciju genomske DNK iz tumorskog tkiva fiksiranog u parafinu, umnožavanje (amplifikaciju) promotora hTERT gena primenom lančane reakcije polimeraze (engl. Polymerase chain reaction, PCR) i analiza PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu, sekvenciranje produkata amplifikacije, analiza metilacionog statusa promotora hTERT gena metodom lančane reakcije polimeraze specifične za metilaciju (engl. Methylationh specific PCR, MSP) i kvantifikacija promotora hTERT gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (engl. Quantitative real time PCR analysis, qPCR ).

Retrospektivnom studijom obuhvaćeno je 54 uzoraka DNK uzetih od pacijenata obolelih od karcinoma bubrežnih ćelija (RCC), od kojih je 23 uzoraka DNK izolovano i iz uzoraka krvi obolelih pacijenta. Za izolaciju DNK korišćen je KAPA Express Extract Kit (Kapa Biosystems, Inc, Wilmington, MA, USA).

Od 54 bolesnika, 31 (57,4%) bili su muškog pola, a 23 (42,6%) ženskog pola (Grafikon 2).



**Grafikon 2.** Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

### 3.2. HISTOPATOLOŠKA OBRADA UZORAKA TKIVA TUMORA

Po uzimanju operativnog materijala RCC-a, uzorci su fiksirani 12-24h u 4% puferovanom formalinu, zatim ispirani vodom i dalje dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije (od 70% do apsolutnog alkohola, tokom 24h), da bi zatim bili lipofilizovani u ksilolu i dalje kalupljeni u parafin. Dobijeni parafinski blokovi su sečeni standardnim mikrotomom na isečke debljine 3-5  $\mu\text{m}$ . Preseci su dalje bojani hematoksilin-eozinom (H&E).

Receptura za hematoksilin-eozin bojenje, prema preporukama proizvođača:

1. I ksilol .....5 minuta
2. II ksilol..... ..5 minuta
3. 100% alkohol..... ..3 minuta
4. 100% alkohol..... ..3 minuta
5. 96% alkohol ..... ..3 minuta
6. 70% alkohol ..... ..3 minuta
7. dobro isprati destilovanom vodom
8. Mayer-ov hematoksilin..... ..5 minuta
9. dobro isprati destilovanom vodom

10. amonijačna voda.....uroniti  
10 puta
  11. dobro isprati destilovanom vodom
  12. Eosin (1% vodeni rastvor).....10-15 minuta
  13. isprati dobro tekućom vodom
  14. 70 % alkohol..... .2 minuta
  15. 96 % alkohol.....2 minuta
  16. 100% alkohol .....3 minuta
  17. 100 % alkohol .....3 minuta
  18. I ksilol .....5 minuta
  19. II ksilol .....5 minuta
  20. III ksilol.....staviti i odmah pokrivati.
- Obrisati pločicu i montirati Canada balsam-om (60g u 100 mL ksilola) ili DPX-om.  
Histopatološka dijagnoza RCC-a postavljena je na H&E pločicama.

### 3.3. IMUNOHISTOHEMIJSKE METODE

Imunohistohemijska obrada je obavljena u Laboratoriji za imunohistohemiju i histohemiju Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Imunohistohemijska tehnika u formalinu fiksiranih i u parafinu ukalupljenih uzoraka predstavljala je višestepenu proceduru koja je obuhvatala sledeće postupke, prema protokolu:

- deparafinizacija,
- proteolitička digestija
- blokiranje endogene peroksidaze
- imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike.

Preseci debljine 3-4 µm dobijeni sečenjem parafinskih kalupa su nakon sušenja od 16h na 56<sup>0</sup>C deparafinirani po sledećoj proceduri:

- I ksilol.....5-7 minuta, ocediti
- II ksilol.....5-7 minuta, ocediti
- 100% alkohol.....3 minuta, ocediti
- 100% alkohol.....3 minuta, ocediti

96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
destilovana/dejonizovana voda.....	30 sekundi

***Proteolitička digestija (demaskiranje antigena):***

Deparafinisani preseći su preneti u plastičnu kivetu sa oko 250 ml radnog rastvora citratnog pufera (10mmol/L, pH 6.0) i kuvaju se u mikrotalasnoj pećnici 2x5 minuta na maksimalnoj temperaturi, a zatim se hlade u citratnom puferu 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju su isprani destilovanom vodom dva puta po 30 sekundi.

***Blokiranje endogene peroksidaze:***

Preparati se potope 5 minuta u 3% vodonik-peroksid (rastvoren u destilovanoj vodi), zatim isperu destilovanom vodom i preliju fosfatnim puferom (PBS-phosphate-buffered saline, 0,02 mol/L, pH 7,0) 3x2 minuta.

***Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike***

Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (Labelled streptavidin-biotin-LSAB+ metoda, DAKO, Danska). Bojenje se odvija po sledećoj proceduri, koja je navedena u instrukcijama proizvođača :

**FAZA I (primarno antitelo razblaženo po uputstvu proizvođača):**

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
- 2.pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30µl) primarnog antitela,
- 3.inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi,
- 4.pažljivo isprati PBS iz špic-boce,
- 5.preliti svežim puferom.

**FAZA II (biotinilizovano vezno antitelo)**

- 1.odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
- 2.pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30µl) LINK antitela,
- 3.inkubacija 30 minuta
- 4.pažljivo isprati PBS iz špic-boce,
- 5.preliti svežim puferom.

**FAZA III (streptavidin-peroksidaza):**

- 1.odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
- 2.pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30µl) streptavidin-peroksidaze,



- 3.inkubacija 30 minuta
- 4.pažljivo isprati PBS iz špric-boce,
- 5.preliti svežim puferom.

**FAZA IV (supstrat hromogen):**

- 1.odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
- 2.pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 $\mu$ l) hromogena diaminobenzidina (DAB),
- 3.inkubacija 10 minuta
- 4.ispiranje destilovanom vodom

**FAZA V (kontrastiranje):**

- 1.Mayer-ov hematoksilin 5 do 10 minuta,
- 2.pažljivo isprati destilovanom vodom,
- 3.uroniti 10 puta u kivetu sa 0,037 mol/L amonijačne vode,
- 4.ispiranje destilovanom/dejonizovanom vodom 2 do 5 minuta.

Pokriti vodenim medijumom.

Mesta specifičnog vezivanja antitela su crvenosmeđe boje, dok hematoksilin, nespecifično vezan za jedra svih ćelija, boji ih plavo.

Imunohistohemijska procedura je korišćena za sledeća antitela, u odgovarajućim razblaženjima:

- Ciklin A (H-432, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) razblaženje 1:200, preko noći.
- Telomeraza (Thermoscientific MA-5-16034, Invitrogen, Waltham, MA USA) razblaženje 1:50, preko noći.
- Ki67 (monoklonsko antitelo, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark), razblaženje 1:50.

Za svako primenjeno antitelo je postojala pozitivna i negativna kontrola.

Imunohistohemijsko bojenje je analizirano na svetlosnom mikroskopu (Bx50F4, Olympus Optical, Japan).

Za Ciklin A: pozitivne ćelije pokazuju smeđu prebojenost jedra i za ta antitela brojane su sve ćelije sa nuklearnom ekspresijom (bez obzira na intenzitet bojenja), na ukupno 300 izbrojanih ćelija na polju velikog uveličanja (x400), primenom Digitalne kamere (DP70, Olympus, Japan) i Imaging Software cell F (Olympus, Japan).

Za Telomerase: ekspresija telomerase detektovana je kao smeđa prebojenost jedra ili citoplazme. Brojanje ćelija vršeno je u 10 vidnih polja na uveličanju 400x. Ekspresija telomerase predstavljala je procenat obojenih ćelija (jedara ili citoplazme) od 1000 prebrojanih. Ukoliko je uzorak imao 15% ili više ćelija sa obojenim nukleusom, to je predstavljalo pozitivnu nuklearnu ekspresiju telomerase. Citoplazmatska ekspresija određena je semikvantitativno: manje od 5% obojenih ćelija (nema ekspresije; (-); 5%-35% obojenih ćelija (fokalna ekspresija; (+), 36%-65% obojenih ćelija (umerena ekspresija; (++)), i više od 65% pozitivnih ćelija (difuzna ekspresija; (+++)).

Za Ki67: indeks Ki-67 predstavlja frakciju Ki-67 pozitivnih jedara detektovanih imunohistohemijski. Za imunocitohemijsko ispitivanje primenjena je metoda avidin-biotin kompleks (ABC), a analiza imunohistohemijske reakcije vršena je korišćenjem svetlosnog mikroskopa na uveličanju 400x. Rezultati su interpretirani na osnovu intenziteta imunohistohemijske reakcije u tumorskim ćelijama. Procenat tumorskih ćelija sa jedrima u kojima je detektovano prisustvo Ki-67 proteina određen je na najmanje 800 tumorskih ćelija u četiri selektovana polja koja su pokazivala najveću imunoreaktivnost.

### 3.4. MOLEKULARNO-GENETIČKO ISTRAŽIVANJA

#### 3.4.1. IZOLACIJA GENOMSKE DNK

**Postupak izolacija DNK iz tumorskog tkiva fiksiranog u parafinu, vršio se u skladu sa preporukama proizvođača.**

Prvi dan izolacije :

**Deparafinizacija:** neophodno je osloboditi tumorsko tkivo od parafina. To se postiže tako što se uzorci maceriraju i prebace u ependorf epruvete. U tako pripremljen uzorak dodati 1 ml ksilola i vorteksovati 30 minuta, zatim kratko centrifugirati na 13000 rpm.

Ksilol odliti, a ako je ostalo još parafina vezanog za tkivo, ispiranje ksilolom treba ponoviti. Kada smo sigurni da je sav parafin odstranjen, tkivo ispiramo etanolom da bi uklonili preostali ksilol. U uzorak se dodaje 1 ml etanola, kratko se vorteksuje i centrifugira na 13000 rpm. Etanol se odlije i ovaj korak ispiranja etanolom treba još jednom ponoviti kako bi bili sigurni da je sav ksilol uklonjen. Po završnom odlivanju etanola, u uzorak dodati 1ml destilovane vode, kako bi odstranili preostali etanol. Vorteksovati kratko i centrifugirati na 13000 rpm. Od izuzetne je važnosti da se sav ksilol

i etanol uklone, pošto ovi alkoholi ometaju PCR reakciju. Destilovanu vodu odliti, a ependorf epruvetu sa uzorkom ostaviti otvorenu i inkubirati u termostatu na 37°C 10-15 minuta, dok ne upari sva preostala tečnost iz tkiva. Zatim se uzorku dodaje 100-300 µl digestivnog pufera TNE (100 Mm NaCl, 25 Mm EDTA, 10 Mm TRIS-HCl, Ph 8) u zavisnosti od veličine tkiva pripremljenog za digestiju. Smeši se dodaju još i 2 µl proteinaze K (koncentracija 10 mg/ml) i 10 µl 1 % SDS (10 % SDS-a u finalnoj zapremini smeše). Ostaviti u vodenom kupatilu na 37°C preko noći.

#### Drugi dan izolacije :

Uzorku dodati 500 µl smeše fenol/hloroform + izoamil alkohol, koja je dobijena tako što su zapreminski odnosi hloroforma i izoamil alkohola 24 : 1 a odnos fenola prema hloroform izoamil alkoholu je 1 : 1. Nakon dodavanja, uzorak dobro resuspendovati i centrifugirati 5 minuta na 3000 rpm. DNK se nalazi u vodenoj fazi a fenol sa ćelijskim sadržajem je u donjoj fazi. Uzeti supernatant i prebaciti u novi ependorf. Ako rastvor nije homogen, ponoviti prethodni korak. Na ovaj način je nakon enzimske degradacije digestivnim puferom, izvršena i hemijska degradacija svih proteinskih konstituenata tkiva i time je postignuto prevođenje DNK iz organske u vodenu fazu. U sledećem koraku dodati 500 µl smeše hloroform + izoamil alkohol (24 : 1), dobro resuspendovati i kratko centrifugirati. Uzeti supernatant i prebaciti u novi ependorf. U vodenom sloju se nalazi DNK i treba voditi računa da se ne uzme interfaza sa proteinima. Dodati 1/10 volumena vodene faze 4 M NaCl + 2 volumena 96% etanola sa -20 °C. Promešati. DNK precipitira u vidu beličastih končića. U slučaju da DNK nije vidljiva, ostaviti ependorf na -20°C jedan sat. Kratko centrifugirati da se istaloži DNK, etanol odliti. Dodati 10 µl 3M Na-acetata i 300 µl 96% etanola, promešati i centrifugirati. Odstraniti etanol i dodati 70% etanol sa -20°C, kratko centrifugirati. Odstraniti etanol i osušiti pellet. Rastvoriti DNK u destilovanoj vodi. Kvalitet i koncentracija DNK se određuje spektrofotometrijskom metodom prema preporukama proizvođača (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Nemačka).

### 3.4.2. AMPLIFIKACIJA DNK FRAGMENTATA (PCR - LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE) I SEKVENCIRANJE

Lančana reakcija polimeraze (engl. PCR) je *in vitro* amplifikacija određene DNK sekvence na definisan i ponovljiv način. Reakcija koristi dva oligonukleotida (prajmera) koji su komplementarni krajevima sekvence koja se umnožava i koji su međusobno suprotno orijentisani. Sinteza DNK je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri „prepoznaju“.

PCR reakciona smeša je volumena od 5 do 100  $\mu$ l i sadrži komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK:

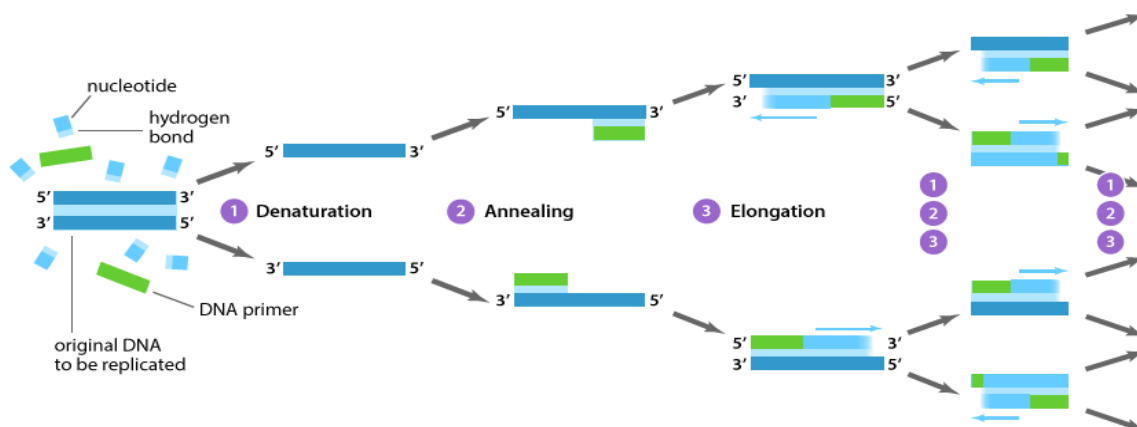
1. DNK uzorak, matrica koja se kopira. Za izvođenje PCR metode može se koristiti DNK izolovana iz različitih vrsta biološkog materijala. Kada je reč o humanom biološkom materijalu, koristi se DNK izolovana iz leukocita periferne krvi, epitela bukalne sluznice, amnionske tečnosti, tkiva uzetog biopsijom ili autopsijom, urina, semene tečnosti, cerebrospinalne tečnosti, tkiva fiksiranog u formalinu ili parafinu, korena dlake, krvne mrlje, pljuvačke.
2. Prajmeri, oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira. Prajmeri za PCR su sintetički jednolančani DNK fragmenti, oligonukleotidi, neophodni za otpočinjanje sinteze DNK. U standardnim PCR eksperimentima izbor, dizajn, kombinacija i koncentracija prajmera najčešće su presudni za uspeh reakcije.

Generalne osobine prajmera su:

- Dužina od 14 do 40 nukleotida
- G/C sadržaj od 40 do 75%
- Balansirana distribucija G/C i A/T bogatih regiona
- Tačka topljenja od 42 do 65°C
- Ne sadrže 3' kraj koji je komplementaran 3' kraju drugog prajmera koji se koristi u PCR smeši

- Ne sadrže palindromske sekvence, čime se na nižim temperaturama onemogućava stvaranje struktura ukosnice stabilizovanih intralančanim vodoničnim vezama. Prajmeri sa sekundarnim strukturama ne hibridizuju sa targetnom DNK, što smanjuje efikasnost ili inhibira PCR reakciju.
3. Nukleotidi, gradivni elementi DNK. Koncentracije dATP-a, dCTP-a, dGTP-a i dTTP-a u PCR reakcionoj smeši su ekvimolarne.
  4. Termostabilna DNK polimeraza – Taq polimeraza je visoko procesivna 5'-3' DNK zavisna DNK polimeraza (koristi DNK kao matricu za sintezu komplementarnog DNK lanca) bez 3'-5' egzonukleazne aktivnosti. Optimalna temperatura za aktivnost ovog enzima je 72°C, na kojoj ugrađuje do 150 nukleotida u sekundi. Vreme poluživota Taq polimeraze na 95°C iznosi oko 40 minuta. Ona uspešno amplifikuje fragmente do 1-3 kb iz genomske DNK.
  5. Joni Mg (Mg<sup>2+</sup>), neophodni za rad Taq polimeraze i sintezu DNK. Mg<sup>2+</sup> grade komplekse sa dNTP-ovima, koji su kao takvi supstrat za DNK polimerazu. Takođe, neophodni su za rad same Taq polimeraze, koja je metaloprotein.
  6. PCR pufer, obezbeđuje pH optimalan za rad termostabilnih polimeraza, koji iznosi od 8.3 do 9.2, u zavisnosti od tipa polimeraze.
  7. PCR aditivi, koriste se za pospešivanje efikasnosti PCR-a. To su: dimetilsulfoksid (DMSO), formamid, glicerol, bovin serum albumin (BSA), želatin, Tween 20, Triton X100. PCR aditivi imaju višestruku funkciju: omogućavaju kompletniju denaturaciju molekula DNK, eliminišu sekundarne strukture ciljne sekvence i prajmera, snižavaju tačku topljenja prajmera, stabilizuju Taq polimerazu, eliminišu dejstvo raznih inhibitora PCR-a.

Izvodi se u mikrotubi zapremine 0.2-0.5 ml, gde se u PCR mašinama podvrgava preciznim, cikličnim promenama temperature. Reakcija sa odvija u 25 – 40 ponovljenih ciklusa DNK sinteze. Broj umnoženih fragmenata u PCR-u eksponencijalno raste jer svaki novosintetisani lanac u sledećem ciklusu služi kao matrica za sintezu DNK.



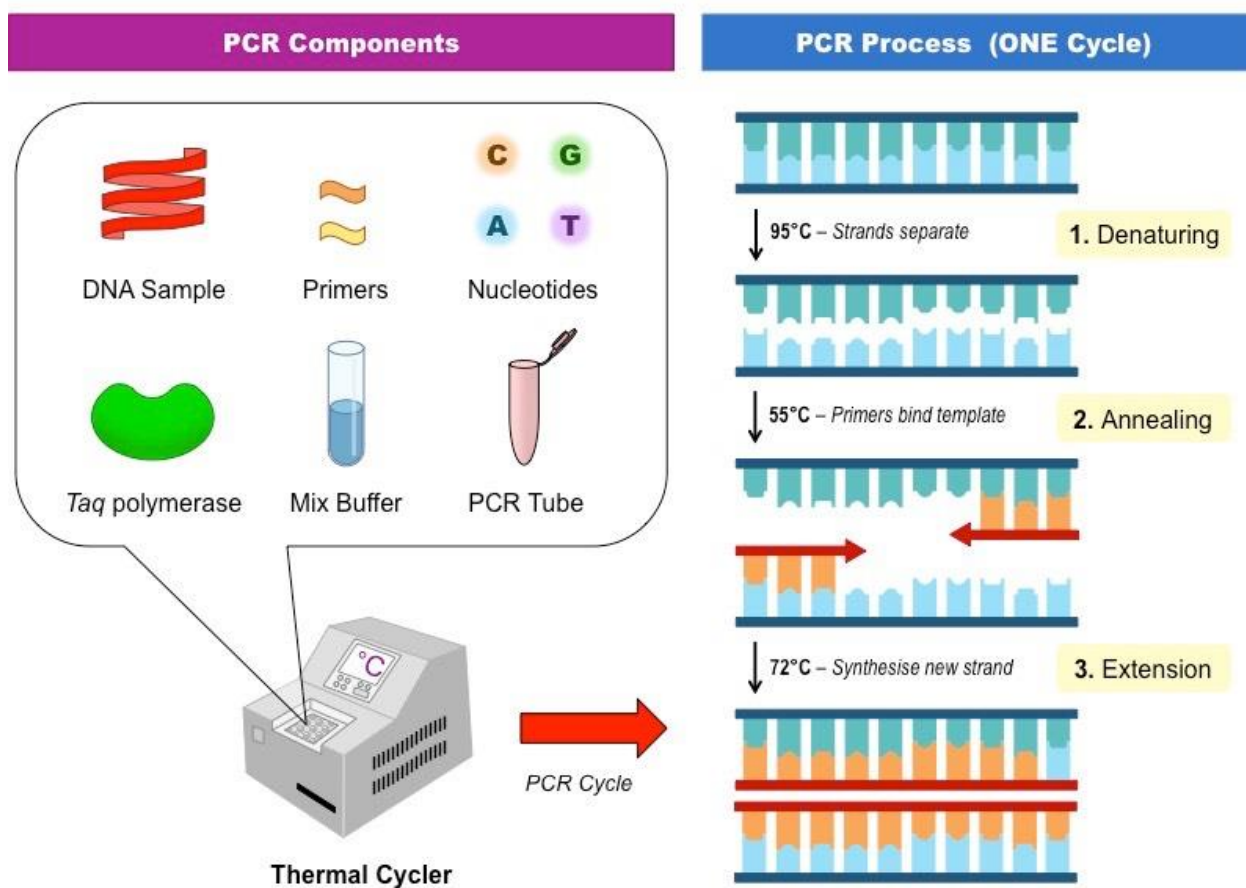
**Slika 25.** PCR ciklus

(preuzeto sa:

[www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/polymerase\\_chain\\_reaction\\_introduction.php](http://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php))

Svaki PCR ciklus se sastoji iz tri koraka:

1. Termalna denaturacija DNK, raskidanje vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK, kako bi došlo do hibridizacije prajmera. Izvodi se inkubacijom PCR reakcione smeše na 95°C;
2. Hibridizacija prajmera sa matricom, uspostavljanje vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence na matrici. Izvodi se na temperaturi od 42°C do 65°C u zavisnosti od dužine i nukleotidne sekvence prajmera;
3. Elongacija (ekstenzija) prajmera, ugradnja nukleotida na 3' krajevima prajmera (sinteza DNK) katalizovana termostabilnom DNK polimerazom. Odvija se na temperaturi od 72°C (optimalna temperatura za rad Taq polimeraze).



**Slika 26.** Komponente PCR smeše (preuzeto sa: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>)

Ovako dobijeni produkti amplifikacije se zatim sekvencioniraju u rastućem i opadajućem lancu korišćenjem ABI Big Dye Terminator chemistry i ABI 3500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sekvence se analiziraju korišćenjem Sequencher software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Identifikovane promene potvrđene su ponovljenom analizom svakog uzorka. Sekvenciranje se obavlja u cilju utvrđivanja prisustva i vrste varijacije u sekvenci.

### 3.4.2.1. PCR SPECIFIČAN ZA METILACIJU

Metilacioni status promotora hTERT gena određen je PCR specifičnim za metilaciju (MSP). Genomska DNK modifikovana je tretmanom natrijum bisulfitom primenom kompleta za metilaciju EZ-DNK, a prema preporukama proizvođača (Zymo research,

Orange, CA, USA). Da bi se otkrile izmene u nizu DNK nakon tretmana bisulfitom korišćen je MSP kojim su se izdvojile metilisani od nemetilisanih alela. Dve posebne reakcije PCR izvedene su primenom sledećih prajmera: Uf: 5'-TTGAGAATTTGTAAAGAGAAATGATG-3' i Ur: 5'-CTAAAAACAAACCCAAAAACACA-3' za nemetilisani promoter (dužine 133 bp) i Mf: 5'-TTGAGAATTTGTAAAGAGAAATGAC-3' i Mr: 5'-TAAAAACGAACCCGAAAACG-3' za metilisani promoter (dužine 131 bp). Amplifikacija PCR vršena je u čitavoj zapremini od 50 µl, a smeša za reakciju sadržala je 1 × PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM dNTPs, 0.6 µM prajmere (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.4 µg/µl BSA, 5% DMSO, 1.5U *Taq* polimerazu (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA) i 3 µl DNK tretirane bisulfatom kao obrazac. Amplifikacija je sprovedena pod sledećim uslovima: početna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 min, nakon toga 40 ciklusa denaturacije na 95°C tokom 30 s, anelacija u trajanju od 30 s na 55°C, ekstenzija na 72°C tokom 30 s, i konačna ekstenzija na 72°C u trajanju od 4 min. Genomska DNK iz limfocita zdravih donora korišćena je kao kontrola u slučaju nemetilisanih gena, a ista DNK, tretirana in vitro primenom SssI methyltransferase, korišćena je kao kontrola kod metilisanih gena. Proizvodi PCR naneti su na 8% PAA gelove, obojene etidijum bromidom i posmatrani pod UV svetlošću. hTERT promoter gena posmatran je kao (1) nemetilisan u slučajevima kada je uvećanje postignuto samo reakcijom sa nemetilisanim prajmerima (U) i (2) metilisan/delimično metilisan u slučajevima kada bi uvećavanje bilo rezultat samo uz metilisani prajmer (M) ili uz oba (U i M). Izvedeno je ponovljeno amplifikacija 20% uzorkom po slučajnom izboru gde nije bilo razlika (nepodudarnosti) između statusa metilacije utvrđenim u duplikatu.

#### **3.4.2.2. KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE U REALNOM VREMENU (qPCR)**

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qPCR) i komparativni metod (Ct) za kvantifikaciju hTERT gena sprovedeni su primenom SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline, London, UK), prema preporukama proizvođača. Paralelno, β-globin gen amplifikovan je kao referentna vrednost za normalizaciju. Svi eksperimenti sa PCR u realnom vremenu sprovedeni su u duplikatu. Za amplifikaciju su korišćeni sledeći



prajmeri: 5'-CACCCGTCCTGCCCTTCACCTT-3' i 5'-GGCTTCCCACGTGCGCAGCAGGA-3' u slučaju hTERT i 5'-TGTGCTGGCCCATCACTTTG-3' i 5'-ACCAGCCACCACTTTCTGATAGG-3' u slučaju  $\beta$ -globina. Vrednost komparativnog metoda (Ct) izračunata je za svaki uzorak, a stepeni amplifikacije izračunati su kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Nivo uvećanja hTERT normalizovan je prema  $\beta$ -globinu, a doza gena veća od 2.5. se smatrala kao amplifikacija.

### 3.5. GEL ELEKTROFOREZA

Za analizu PCR produkata koristi se gel elektroforeza. Gel elektroforeza je tehnika kojom se molekuli DNK, RNK i proteina mogu međusobno razdvojiti na osnovu razlika u veličini, specifičnoj konformaciji i količini naelektrisanja. Zbog ovih razlika oni imaju različitu pokretljivost u gelu pod uticajem električnog polja, pri čemu manji molekuli putuju brže kroz gel.

DNK molekuli su negativno naelektrisani na fiziološkom pH, tako da se u električnom polju kreću od negativne elektrode – katode ka pozitivnoj elektrodi – anodi. Gelovi za elektroforezu se prave od polimera - agaroze ili poliakrilamida. Gelovi sa većim procentom polimera, otežavaju makromolekulima kretanje pri elektroforezi (oni se sporije kreću), tako da obezbeđuju bolji razdvajanje molekula.

Komponente za pravljenje poliakrilamidnog (PAA) gela sa redosledom stavljanja:

- Voda
- 5 x TBE (Tris-Borna kiselina-EDTA) – pufer
- APS (amonijum-persulfat)-obezbeđuje slobodne radikale, rastvor je 10% i čuva se na +4°C
- Akrilamid – tj. Smeša akrilamida i N,N'-metilen-bisakrilamida u odnosu 29 : 1
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) – katalizator polimerizacije

Priprema i izvođenje PAA gel elektroforeze:

1. Pripremiti gel određene koncentracije, zavisno od dužine fragmenata koje je potrebno razdvojiti. Tokom eksperimentalnog postupka korišćen je 8% gel.
2. Staklene ploče očistiti etanolom. Na spejsere naneti vazelin kako bi sprečili curenje gela. Postaviti spejsere na jednu ploču, tako da su međusobno pod uglom od 90°.

Preklopiti drugom pločom i naliti gel. Ploče pričvrstiti štipaljka. Postaviti češalj kako bi omogućili formiranje bunara u gelu.

3. Nakon isteka vremena potrebnog za polimerizaciju gela (oko 30 minuta), ploče postaviti u aparaturu
4. Naliti uzorke u bunare u gelu i « pustiti » elektroforezu na određenoj voltaži (230 V)
5. Po završetku elektroforeze, gel obojiti etidijum-bromidom i vizualizovati razdvojene fragmente u transluminatoru.

### 3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U ovoj studiji korišćeni su deskriptivni i analitički statistički metodi. Od deskriptivnih, korišćeni su: apsolutni i relativni brojevi (n,%), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana), mere disperzije (standardna devijacija, interkvartilni raspon).

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su parametarski testovi (t test, ANOVA) i neparametarski testovi (hi-kvadrat, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test).

Za ispitivanje povezanosti korišćena je Spirmanova korelaciona analiza.

Rezultati su prikazivani tabelarno i grafički.

P vrednost (p value) manja od 0,05 je korišćena kao vrednost za odbacivanje nulte hipoteze.

Svi podaci obrađeni su u SPSS 20.0 (IBM korporacija) softverskom paketu.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza kliničkih rezultata

Za izradu doktorske disertacije analiziran je biopsijski materijal 74 pacijenata sa RCC dijagnostikovani na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od

2010. do 2013. godine.

Analizirani su kliničko-morfološki parametri pacijenata sa RCC u odnosu na pol, godine starosti, veličinu (dimenzije) tumora, stadijum tumora, nuklearni gradus tumora, histopatološki tip tumora (HP) i preživljavanje (u mesecima).

#### 4.1.1. Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

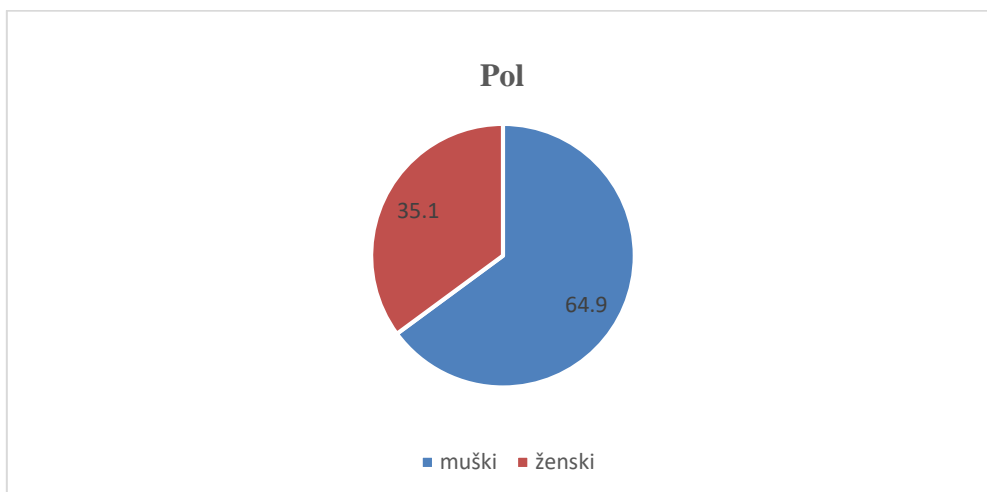
U odnosu na pol u analiziranoj grupi od 74 pacijenata sa RCC, bilo je 48 (64,9%) pacijenata muškog pola i 26 (35,1%) pacijenata ženskog pola.

Rezultati istraživanja su pokazali da je incidenca obolelih od RCC češća kod muškaraca, nego kod žena.

U Tabeli 4. i na Grafikonu 3. prikazana je distribucija pacijenata u odnosu na pol.

**Tabela 4.** Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

Pol pacijenata	N	%
muški	48	64,9
ženski	26	35,1
ukupno	74	100,0



**Grafikon 3.** Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

#### 4.1.2. Distribucija pacijenata sa RCC prema starosti

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 74 pacijenata sa RCC i oni su prema godinama starosti podeljeni u 4 grupe:

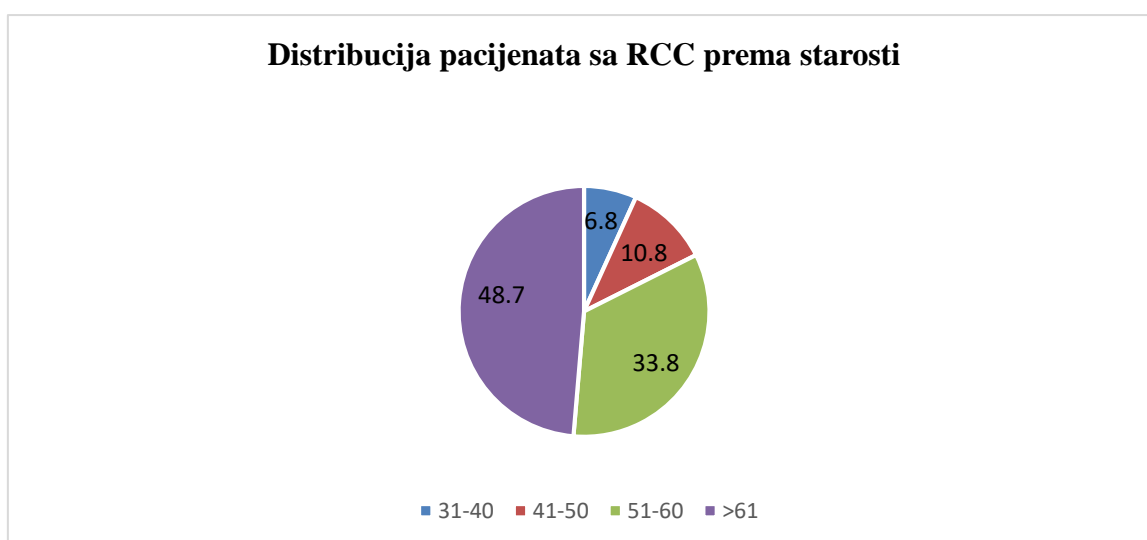
- prvu grupu činili su pacijenti starosti od 31- 40 godina,
- drugu grupu činili su pacijenti starosti od 41-50 godina,
- treću grupu činili su pacijenti starosti od 51- 60 godina,
- četvrtu grupu činili su pacijenti starosti preko 61 godine.

Analizom podataka koji govore o starosti pacijenata, utvrđeno je, da je najviše pacijenta, njih 36 (48,7%), pripadalo starosnoj grupi preko 61 godine, a najmanje pacijenata, njih 5 (6,8%), pripadalo starosnoj grupi od 31-40 godina. Prosečna starost pacijenata bila je ( $59.27 \pm 10.25$ ), a kretala se u rasponu od 33 do 85 godina. Najmlađi pacijent imao je 33, a najstariji 85 godina života.

U Tabeli 5. i na Grafikonu 4. prikazana je distribucija pacijenata sa RCC prema starosti.

**Tabela 5.** Distribucija pacijenata sa RCC prema starosti

Distribucija pacijenata sa RCC prema starosti			
	N	%	Kumulativni %
31-40	5	6,8	6,8
41-50	8	10,8	17,6
51-60	25	33,8	51,4
>61	36	48,7	100
Ukupno	74	100,0	



**Grafikon 4.** Distribucija pacijenata sa RCC prema starosti

#### 4.1.3. Distribucija pacijenata sa RCC prema veličini (dimenzijama) tumora

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 74 pacijenata sa RCC i oni su prema veličini tumora, podeljeni u 6 grupe:

- prvi grupu čine pacijenti koji su imali tumore veličine od 0 - 20,0 mm,
- drugu grupu čine pacijenti koji su imali tumore veličine od 20,1 - 40,0 mm,
- treću grupu čine pacijenti koji su imali tumore veličine od 40,1 - 60,0 mm,
- četvrtu grupu čine pacijenti koji su imali tumore veličine od 60,1 - 80,0 mm,
- petu grupu čine pacijenti koji su imali tumore veličine od 80,1 - 100,0 mm,
- šestu grupu čine pacijenti koji su imali tumore veličine preko 100,1 mm.

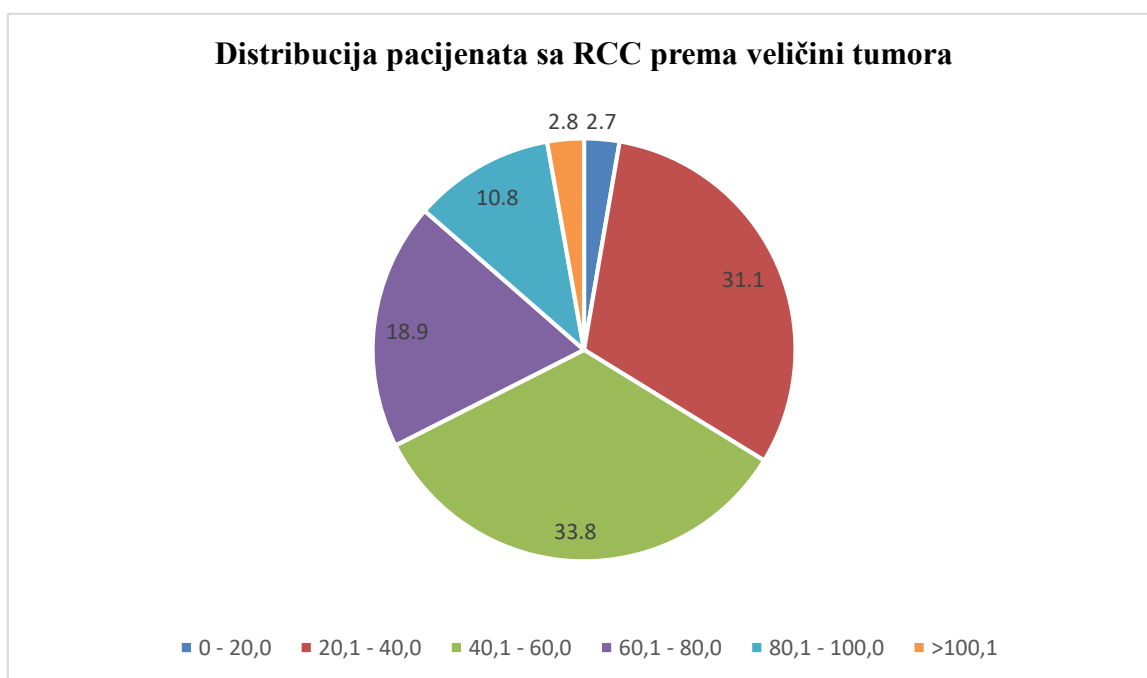
Analizom rezultata koji govore o veličini tumora kod 74 pacijenta sa RCC, utvrđeno je

da je najveći broj pacijenata, 25 (33,8%) pacijenata, imao tumore veličine od 40,1 do 60,0 mm, a najmanji broj pacijenata, 2 (2,8%) pacijenta, imao je tumore veličine preko 100,1 mm.

U Tabeli 6. i na Grafikonu 5. prikazana je distribucija pacijenata sa RCC prema veličini tumora

**Tabela 6.** Distribucija pacijenata sa RCC prema veličini tumora

Veličina ( dimenzije ) tumora			
	N	%	Kumulativni %
0 - 20,0	2	2,7	2,7
20,1 - 40,0	23	31,1	33,8
40,1 - 60,0	25	33,8	67,6
60,1 - 80,0	14	18,9	86,5
80,1 - 100,0	8	10,8	97,3
>100,1	2	2,8	100
Ukupno	74	100,0	



**Grafikon 5.** Distribucija pacijenata sa RCC prema veličini tumora

#### 4.1.4. Distribucija pacijenata sa RCC prema stadijumu tumora

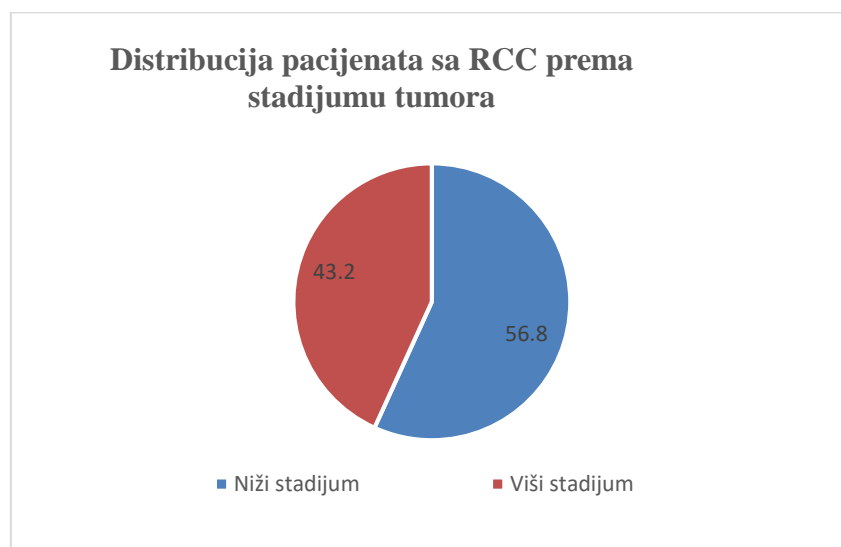
Istraživanja prema stadijumu tumora pokazala su, da su od 74 pacijenata sa RCC:

- tumori nižeg stadijuma dijagnostikovani kod 42 pacijenta (56,8%), a
- tumori višeg stadijuma dijagnostikovani kod 32 pacijenta (43,2%).

U Tabeli 7. i na Grafikonu 6. prikazana je distribucija pacijenata sa RCC prema stadijumu tumora

**Tabela 7.** Distribucija pacijenata sa RCC prema stadijumu tumora

Stadijum tumora (T)		
	N	%
Niži	42	56,8
Viši	32	43,2
Ukupno	74	100,0



**Grafikon 6.** Distribucija pacijenata sa RCC prema stadijumu tumora

#### 4.1.5. Distribucija pacijenata sa RCC prema histopatološkom tipu tumora

Istraživanja pacijenata sa RCC prema histopatološkom tipu tumora pokazala su da je od

ukupno 74 pacijenta:

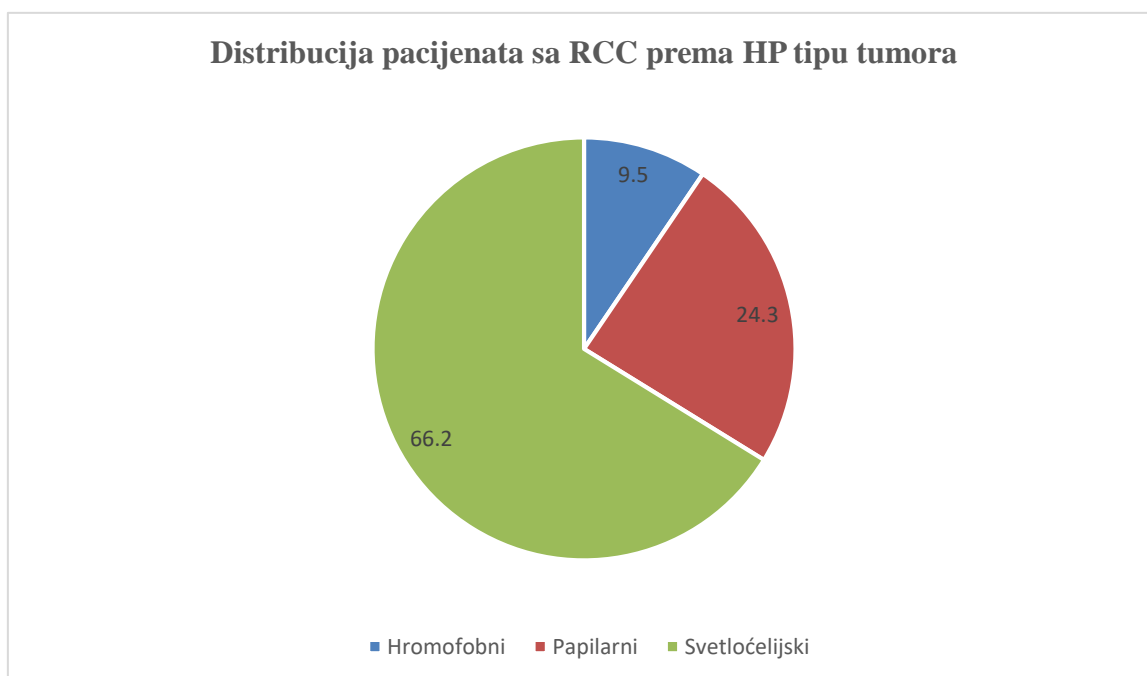
- 49 (66,2%) pacijenata imalo svetloćelijski histopatološki tip RCC,
- 18 (24,3%) pacijenata imalo papilarni histopatološki tip RCC,
- 7 (9,5%) pacijenata imalo hromofobni histopatološki tip RCC.

U odnosu na histopatološki tip tumora, svetloćelijski histopatološki tip RCC je bio najzastupljeniji, kod 49 (66,2%) pacijenata.

U Tabeli 8. i na Grafikonu 7. prikazana je distribucija pacijenata sa RCC prema histopatološkom tipu tumora.

**Tabela 8.** Distribucija pacijenata sa RCC prema histopatološkom tipu tumora

Histopatološki tip tumora		
	N	%
Hromofobni	7	9,5
Papilarni	18	24,3
Svetloćelijski	49	66,2
Ukupno	74	100,0



**Grafikon 7.** Distribucija pacijenata sa RCC prema histopatološkom tipu tumora



#### 4.1.6. Distribucija pacijenata sa RCC prema gradusu tumora

Istraživanja prema gradusu tumora pokazala su da je kod 74 pacijenata sa RCC:

- 4 pacijenta (5,4%) imao tumor gradusa I,
- 37 pacijenta (50%) imao tumor gradusa II,
- 30 pacijenta (40,5%) imao tumor gradusa III,
- 3 pacijenta (4,1%) imao tumor gradusa IV,

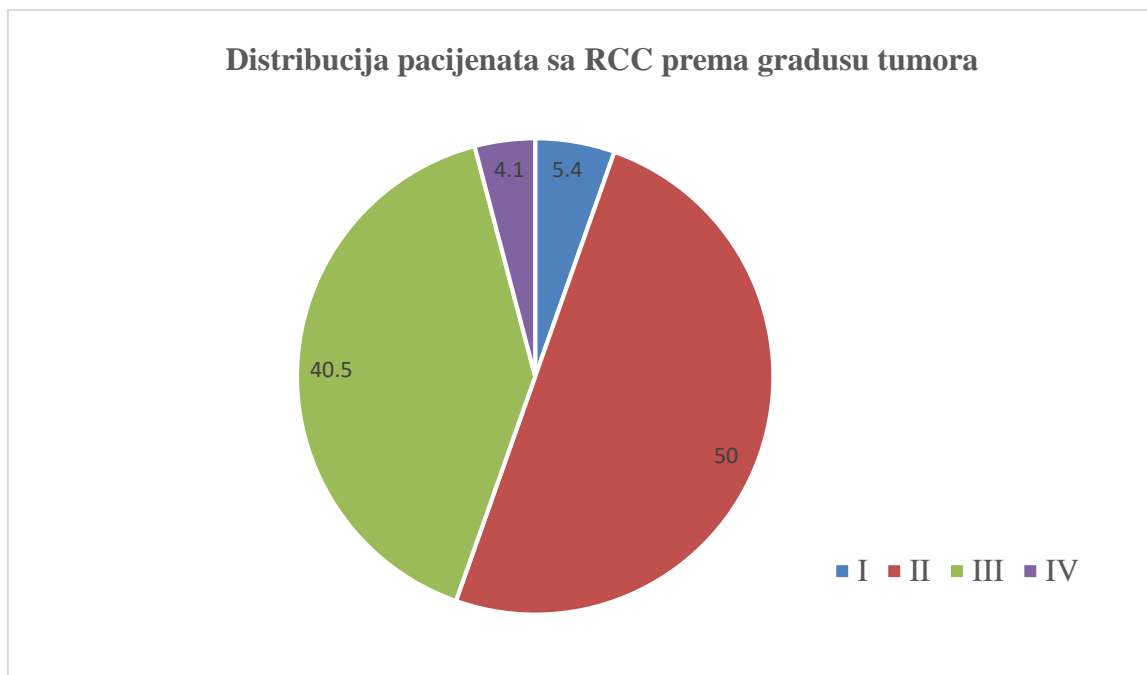
Zbog relativno malog broja slučajeva, gradusi I i II označeni su kao niži gradus tumora, a gradusi III i IV označeni kao viši gradus tumora.

U odnosu na gradus tumora, u grupi od 74 pacijenta sa RCC, niži gradus je dijagnostikovao kod 41 (55,4%) pacijenta, dok je viši gradus dijagnostikovao kod 33 (44,6%) pacijenta.

U Tabeli 9. i na Grafikonu 8. prikazana je distribucija pacijenata sa RCC prema gradusu tumora.

**Tabela 9.** Distribucija pacijenata sa RCC prema gradusu tumora

Gradus tumora	N	%
I	4	5,4
II	37	50,0
III	30	40,5
IV	3	4,1
Ukupno	74	100,0



**Grafikon 8.** Distribucija pacijenata sa RCC prema gradusu tumora

#### 4.1.7. Distribucija pacijenata sa RCC prema starosti, veličini (dimenzijama) tumora i preživljavanju (u mesecima)

U ovom istraživanju, praćena je starost, veličina tumora i preživljavanje kod pacijenata sa RCC i utvrđeno je:

1. da se prosečna starost pacijenata kretala od 33 do 85 godina ( $59,27 \pm 10,25$ ),
2. da su se prosečne veličine tumora kretale od 15 do 130 mm, ( $53,14 \pm 23,47$ ),
3. da se prosečno preživljavanje pacijenata kretalo od 11 do 58 meseci ( $37,65 \pm 12,6$ ).

U Tabeli 10. prikazana je distribucija pacijenata prema starosti, veličini tumora i preživljavanju u mesecima

**Tabela 10.** Starost, veličina tumora i preživljavanje

	Aritmetička sredina	SD
Starost	59,27	10,25
Veličina tumora (mm)	53,14	23,47
Preživljavanje (meseci)	37,65	12,6

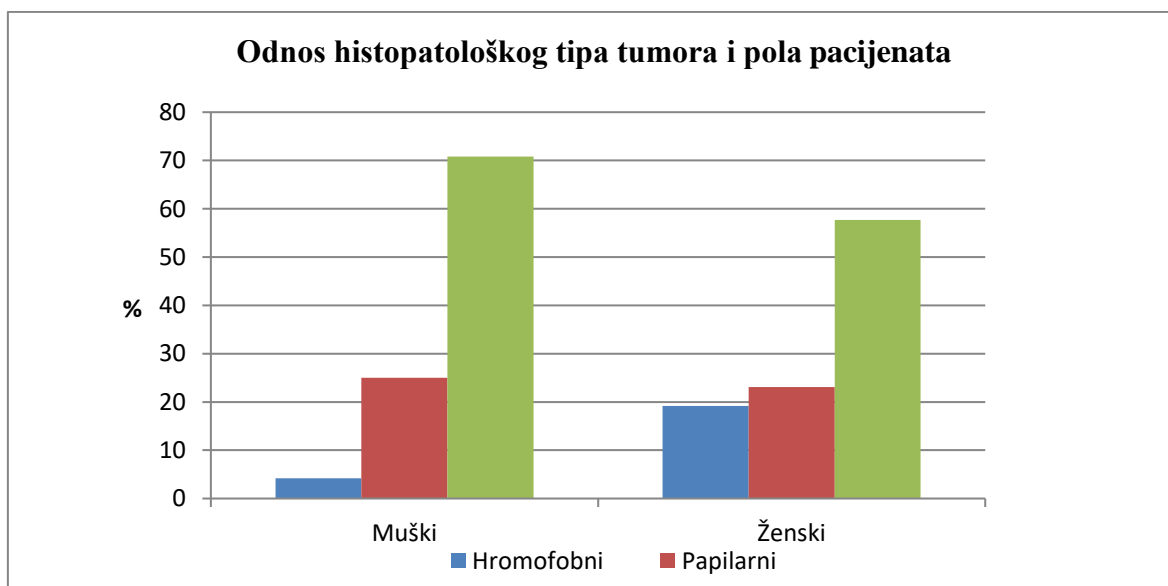
#### 4.1.8. Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

Istraživanje odnosa histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenta sa RCC, od kojih je 48 (64,9%) pacijenata bilo muškog pola i 26 (35,1) pacijenata ženskog pola, **nije nađena statistički značajna razlika** u broju pacijenata muškog i ženskog pola u odnosu na histopatološki tip tumora.

Rezultati istraživanja odnosa histopatološkog tipa tumora i pola su prikazani u Tabeli 11. i na Grafikonu 9.

**Tabela 11.** Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

		Histopatološki tip tumora			Ukupno
		Hromofobni	Papilarni	Svetloćelijski	
Pol	Muški	2 (4,2%)	12 (25%)	34 (70,8%)	48 (100%)
	Ženski	5 (19,2%)	6 (23,1%)	15 (57,7%)	26 (100%)
Ukupno		7 (9,5%)	18 (24,3%)	49 (66,2%)	74 (100%)
Pirsonov hi kvadrat= 4,511; p=0,125					



**Grafikon 9.** Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.9. Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

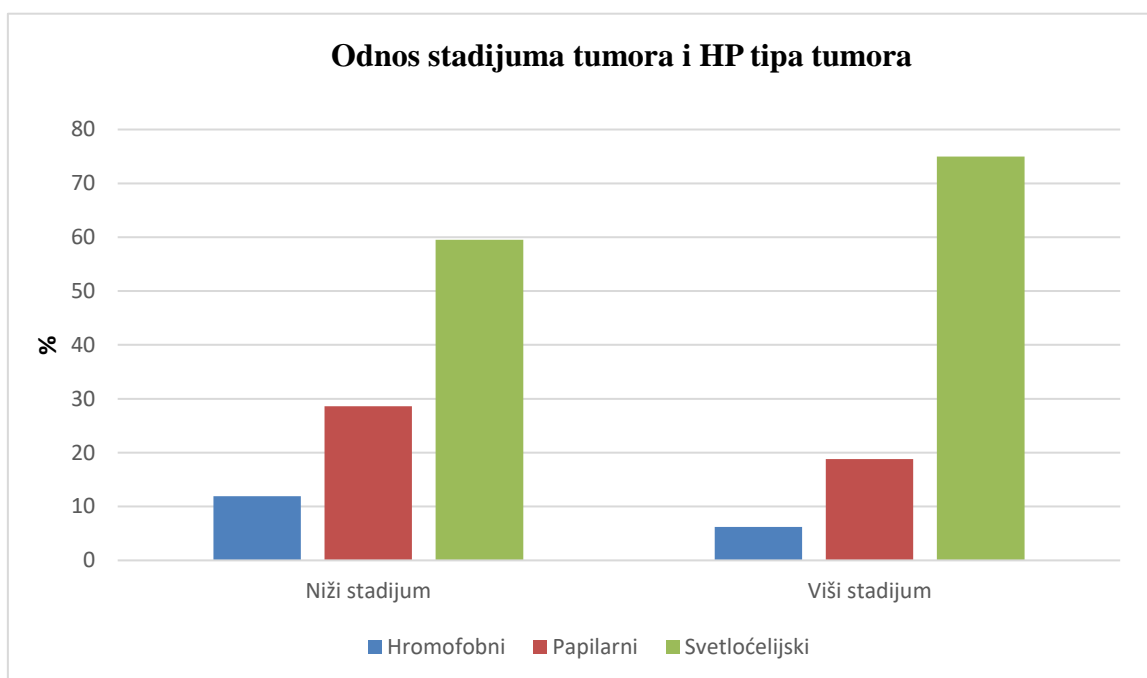
Istraživanje odnosa stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC je pokazalo:

- da **nema statistički značajne razlike** u odnosu na histopatološki tip tumora i stadijum tumora ( $X^2=1,991$ ;  $p=0,406$ ),
- da **ima statistički značajne razlike** u odnosu na histopatološki tip tumora i gradus tumora ( $X^2=1,167$ ;  $p=0,583$ ) i
- da **ima statistički značajne razlike** u odnosu na histopatološki tip tumora i pol pacijenata ( $X^2=1,511$ ;  $p=0,125$ ).

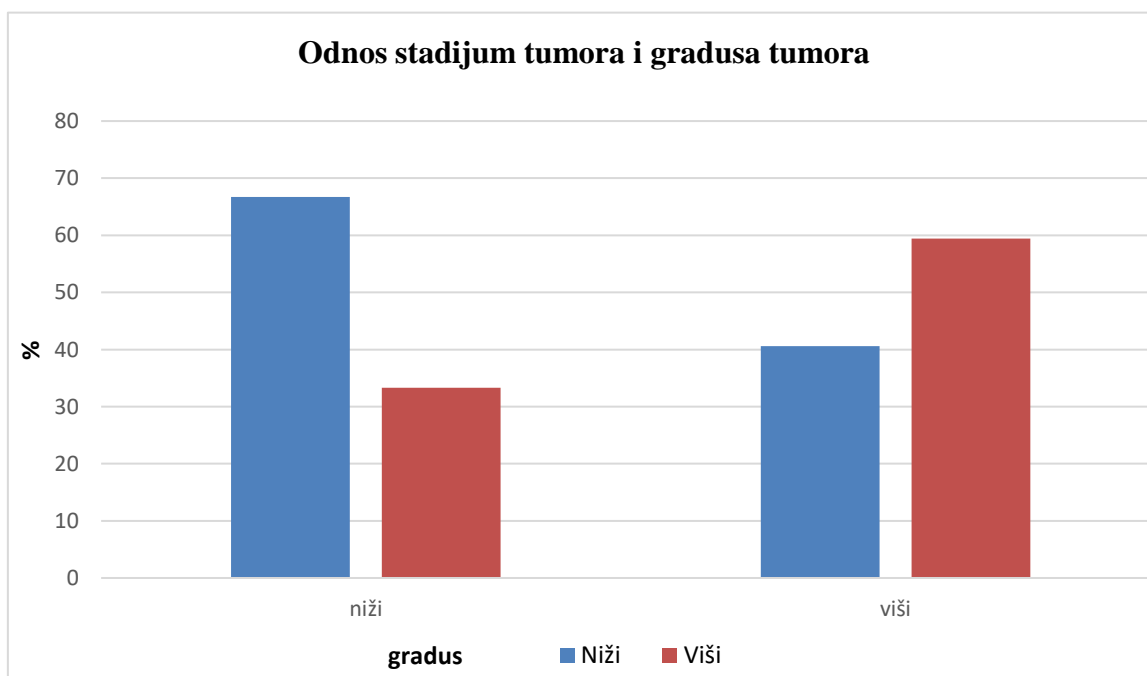
Rezultati istraživanja odnosa stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora, gradusa tumora i pola prikazani su u Tabeli 12. i na Grafikonima 10,11,12.

**Tabela 12.** Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

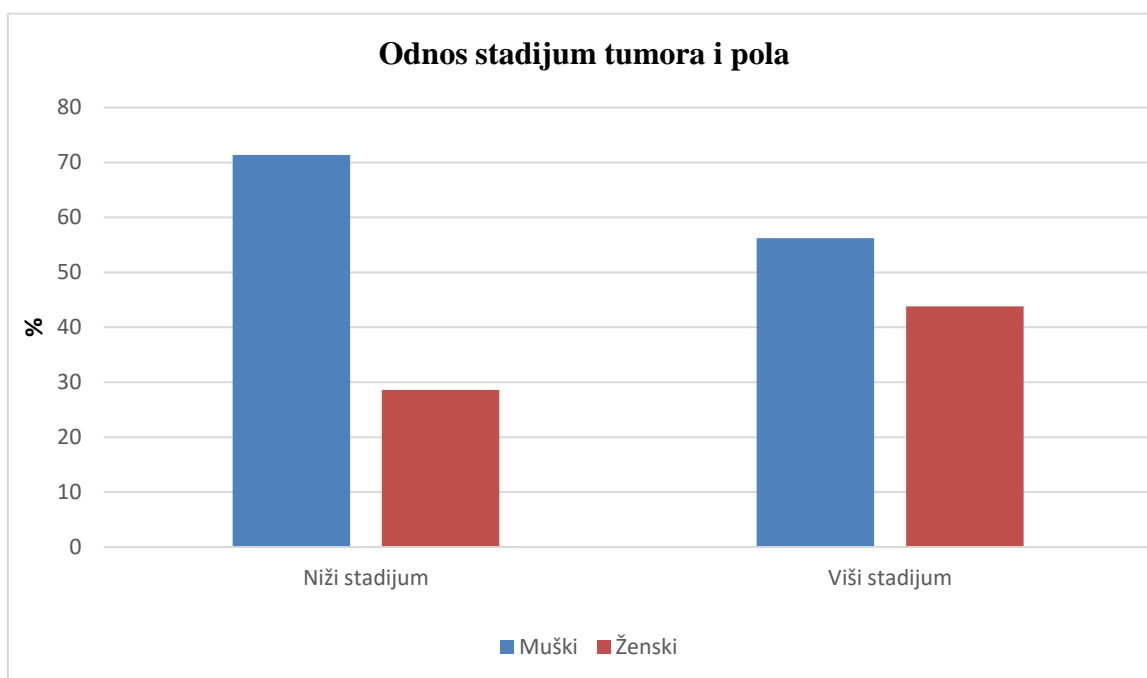
		Stadijum tumora		p vrednost
		Niži stadijum	Viši stadijum	
Histopatološki tip tumora	Hromofobni	5 (11,9%)	2 (6,2%)	0,406
	Papilarni	12 (28,6%)	6 (18,8%)	
	Svetloćelijski	25 (59,5%)	24 (75,0%)	
Gradus tumora	Niži	28 (66,7%)	13 (40,6%)	0,026
	Viši	14 (33,3%)	19 (59,4%)	
Pol	Muški	30 (71,4%)	18 (56,2%)	0,175
	Ženski	12 (28,6%)	14 (43,8%)	



**Grafikon 10.** Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 11.** Odnos stadijuma tumora i gradusa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 12.** Odnos stadijuma tumora i pola kod pacijenata sa RCC

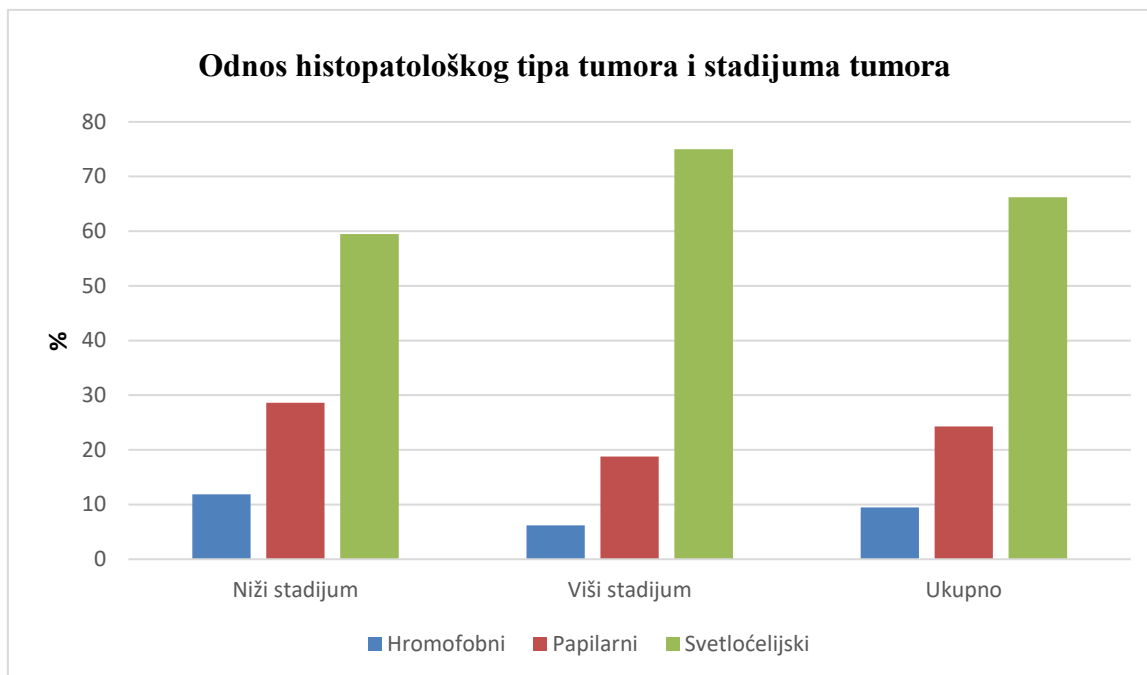
#### 4.1.10. Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijumu tumora kod pacijenata sa RCC

Istraživanjem odnosa histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC **nije nađena statistički značajna razlika** između stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora ( $p > 0,05$ ).

Rezultati istraživanja odnosa histopatološkog tipa tumora i stadijumu tumora prikazani su u Tabeli 13. i na Grafikonu 13.

**Tabela 13.** Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC

		Histopatološki tip tumora			Ukupno
		Hromofobni	Papilarni	Svetloćelijski	
Stadijum tumora	Niži	5 (11,9%)	12 (28,6%)	25 (59,5%)	42 (100%)
	Viši	2 (6,2%)	6 (18,8%)	24 (75%)	32 (100%)
Ukupno		7 (9,5%)	18 (24,3%)	49 (66,2%)	74 (100%)
Pirsonov hi kvadrat= 1,991; $p=0,406$					



**Grafikon 13.** Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC

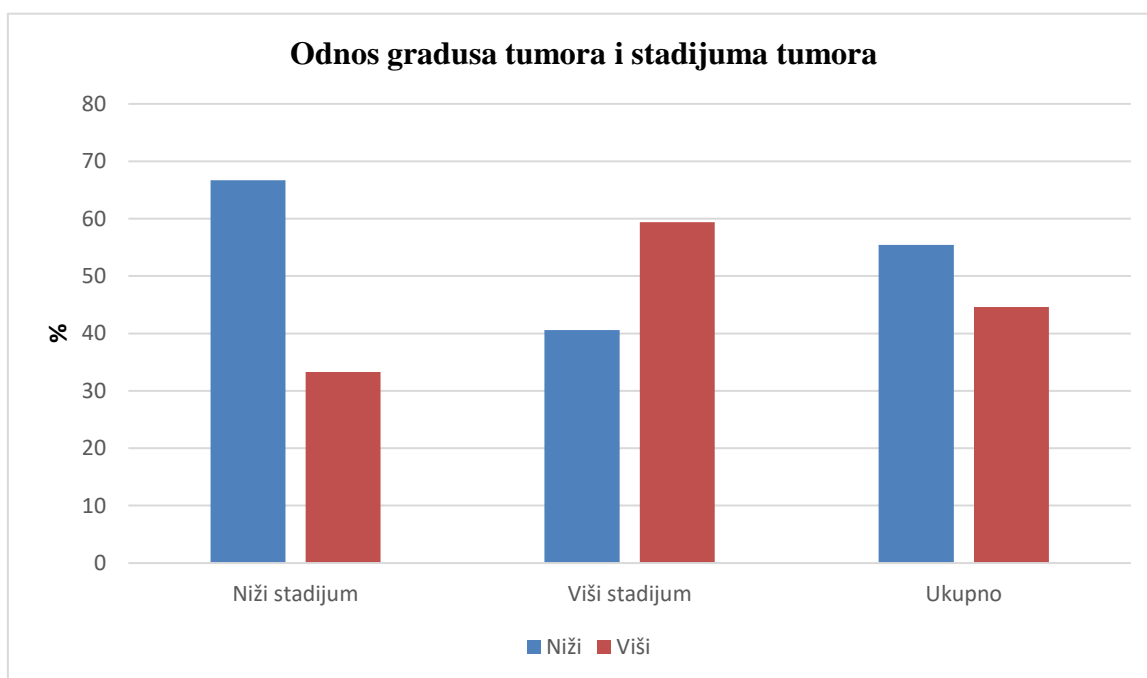
#### 4.1.11. Odnos gradusa tumora i stadijumu tumora kod pacijenata sa RCC

Istraživanjem odnosa gradusa tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC pokazano je da je najviše pacijenata pripadalo nižem gradusu i nižem stadijumu tumora, 28 (66,7%) pacijenta, dok je najmanje pacijenta pripadalo nižem gradusu i višem stadijumu tumora, 13 (40,6%) pacijenta. Ova razlika je **pokazala statističku značajnost ( $p < 0,05$ )**.

Rezultati istraživanja odnosa gradusa tumora i stadijumu tumora prikazani su u Tabeli 14. i na Grafikonu 14.

**Tabela 14.** Odnos gradusa tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC

		Gradus tumora		Ukupno
		Niži	Viši	
Stadijum tumora	Niži	28 (66,7%)	14 (33,3%)	42 (100%)
	Viši	13 (40,6%)	19 (59,4%)	32 (100%)
Ukupno		41 (55,4%)	33 (44,6%)	74 (100%)
Pirsonov hi kvadrat = 4,985; $p=0.026$				



**Grafikon 14.** Odnos gradusa tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.12. Odnos pola i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC

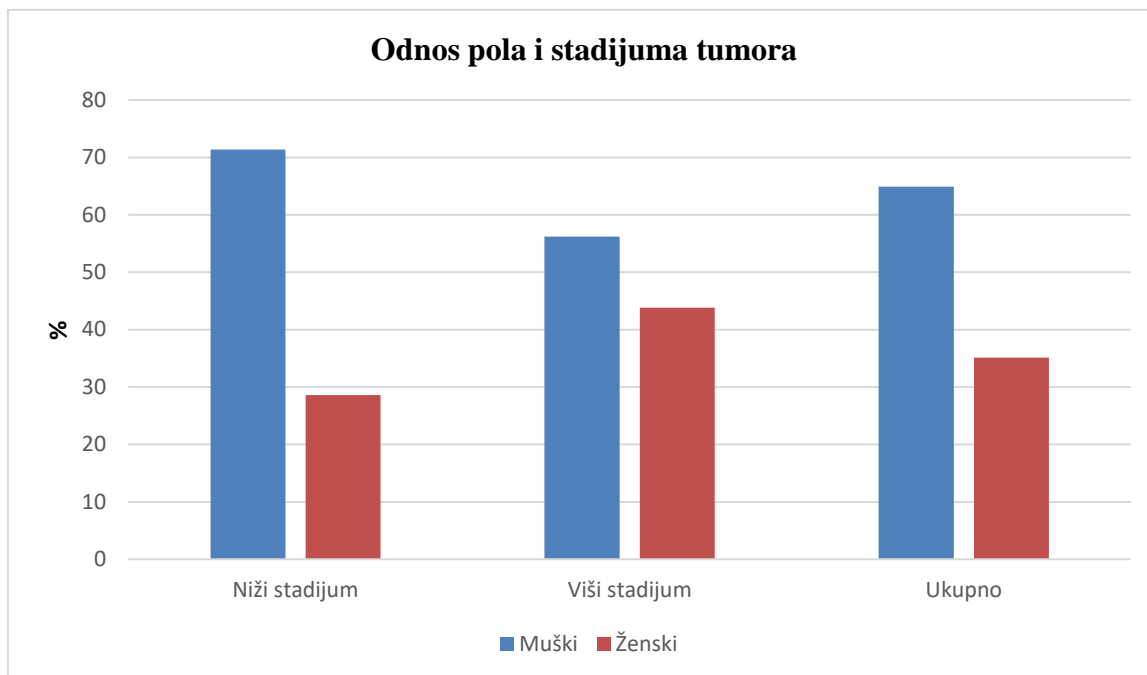
Istraživanjem odnosa pola i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC, **nije nađena statistički značajna razlika** ( $p > 0,05$ ) odnosa pola i stadijuma tumora.

Rezultati istraživanja odnosa pola i stadijumu tumora prikazani su u Tabeli 15. i na Grafikonu 15.

**Tabela 15.** Odnos pola i stadijuma tumora kod pacijenta sa RCC

		Pol pacijenata		Ukupno
		Muški	Ženski	
Stadijum tumora	Niži	30 (71,4%)	12 (28,6%)	42 (100%)
	Viši	18 (56,2%)	14 (43,8%)	32 (100%)
Ukupno		48 (64,9%)	26 (35,1%)	74 (100%)
Pirsonov hi kvadrat = 1,836; $p=0.175$				





**Grafikon 15.** Odnos pola i stadijuma tumora kod pacijenta sa RCC

#### 4.1.13. Odnos stadijuma tumora (niži i viši) i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A, Ki67 i preživljavanja (u mesecima) kod pacijenata sa RCC

Kod pacijenta sa RCC praćen je odnos stadijuma tumora (niži i viši) i starosti, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A i Ki67 i preživljavanja.

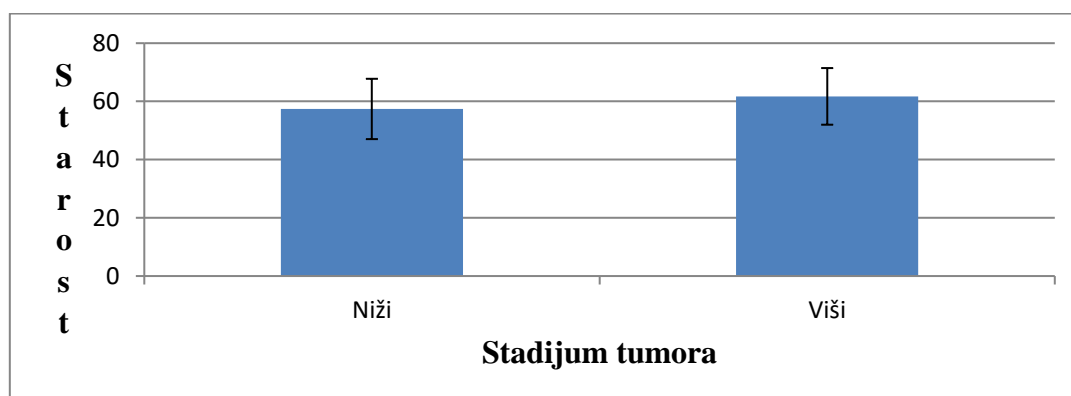
Rezultati istraživanja su pokazali:

- da su pacijenti sa RCC sa nižim stadijumom tumora bili nešto mlađi od pacijenta sa višim stadijumom tumora. Ali, **razlika nije pokazala statističku značajnost** ( $t=-1,821$ ;  $p=0,073$ );
- da **nije bilo statistički značajne razlike** kod pacijenata sa nižim i višim gradusom RCC u odnosu na procenat ekspresije telomeraza ( $Z=-0,104$ ;  $p=0,917$ ) i procenat ekspresije ciklina A ( $Z=-0,039$ ;  $p=0,969$ );
- da je veličina tumora koji su nižeg stadijuma **statistički značajno manja** od veličine tumora višeg stadijuma ( $Z=-3,989$ ;  $p<0,001$ ) i
- da je **statistički značajno** duže preživljavanje uočeno kod pacijenata sa RCC sa nižim gradusom u odnosu na pacijente sa višim gradusom ( $Z=-4,314$ ;  $p<0,001$ ).

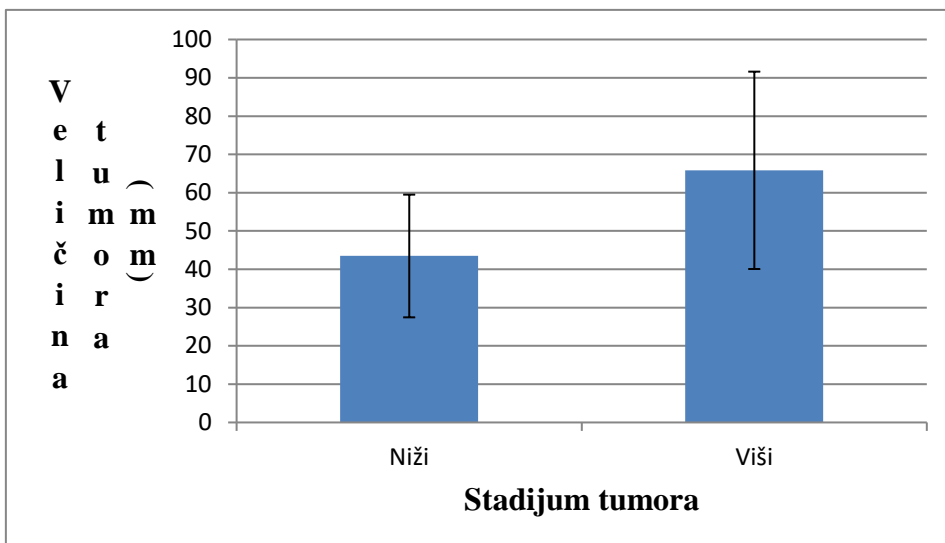
Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 16. i na Grafikonima 16,17,18,19,20,21.

**Tabela 16.** Odnos stadijuma tumora (niži i viši) i starosti, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A i Ki67 i preživljavanja kod pacijenata sa RCC

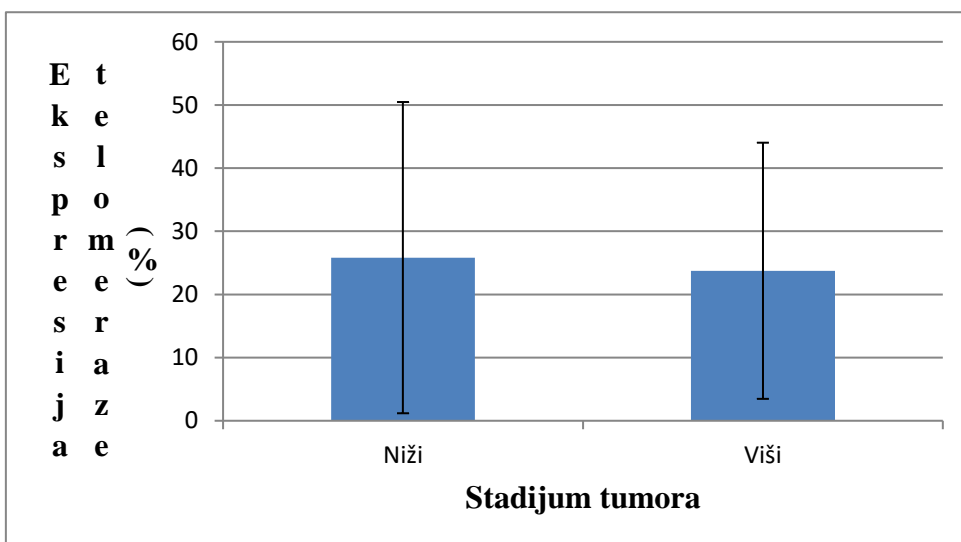
	Stadijum tumora (T)	
	Niži	Viši
Starost	57,40 SD= 10,36	61,72 SD=9,73
Dimenzije tumora	43,47 SD= 16,02	65,84 SD= 25,77
Ekspresija telomeraza (%)	25,83 SD= 24,64	23,75 SD=20,28
Ekspresija ciklina A (%)	19,17 SD= 23,11	16,72 SD= 17,90
Ekspresija Ki67(%)	6,60 SD=8,50	6,70 SD=7,90
Preživljavanje (meseci)	43,31 SD= 10,07	30,22 SD=11,81



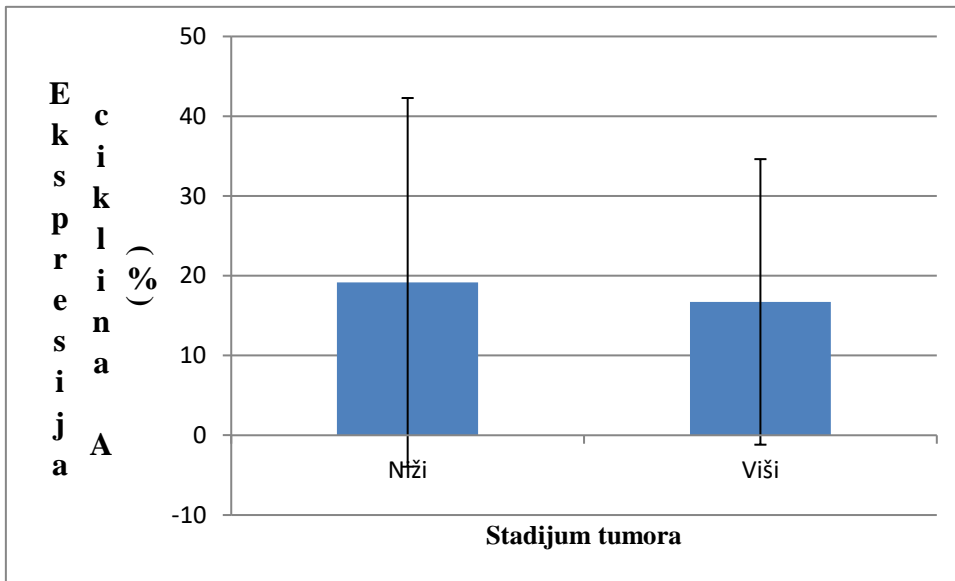
**Grafikon 16.** Odnos stadijuma tumora i starosti kod pacijenata sa RCC



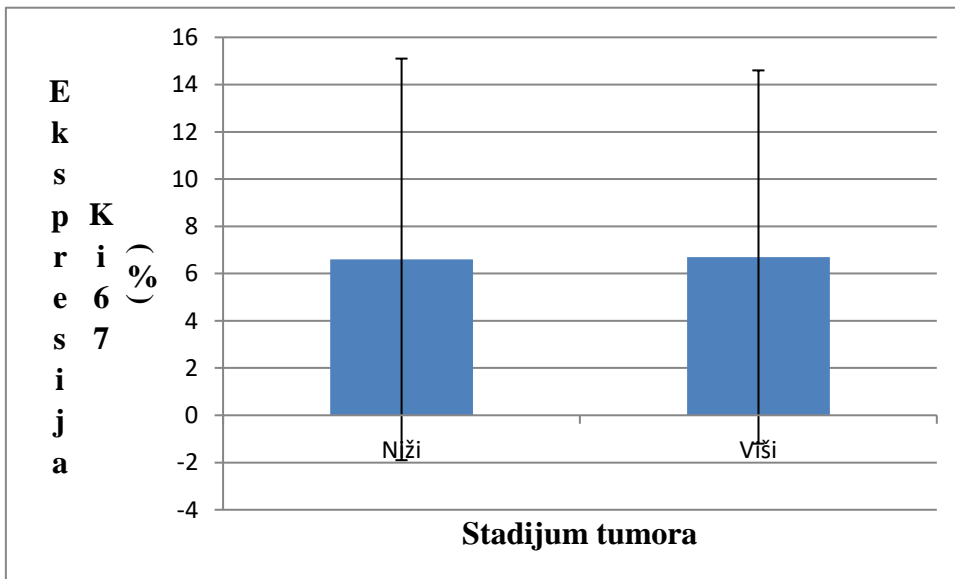
**Grafikon 17.** Odnos stadijuma tumora i veličine tumora kod pacijenata sa RCC



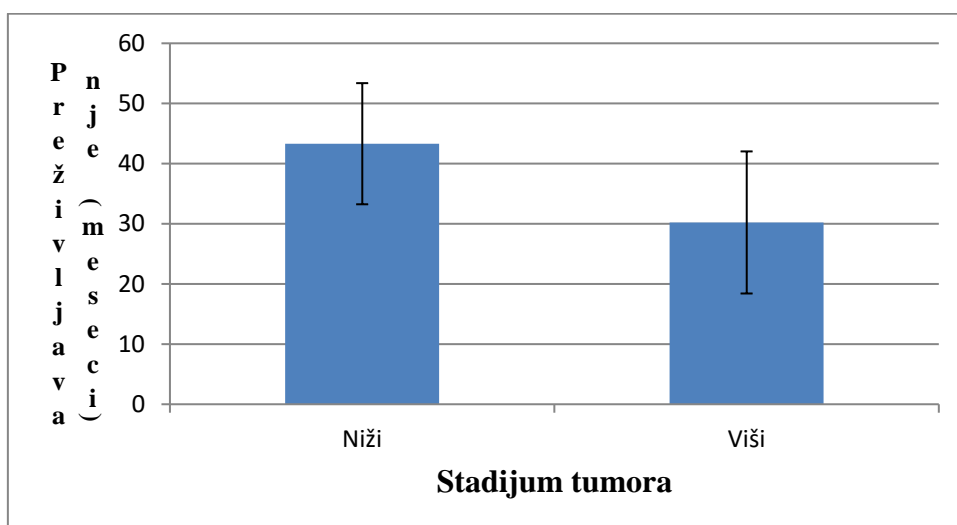
**Grafikon 18.** Odnos stadijuma tumora i ekspresije telomeraze kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 19.** Odnos stadijuma tumora i ekspresije ciklina A kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 20.** Odnos stadijuma tumora i ekspresije Ki67 kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 21.** Odnos stadijuma tumora i preživljavanja kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.14. Odnos gradusa tumora (niži i viši) i starost pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A i Ki67 i preživljavanja (u mesecima) kod pacijenata sa RCC

Kod pacijenata sa RCC praćen je odnos gradusa tumora (niži i viši) i starosti, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A i Ki67 i preživljavanja.

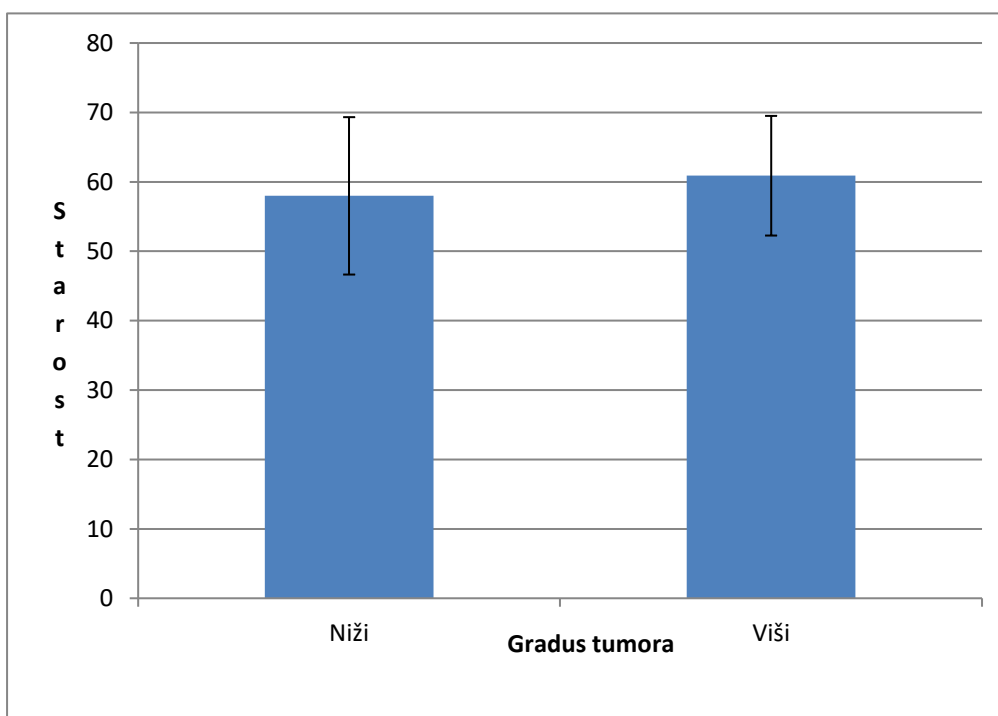
Rezultati istraživanja su pokazali:

- da su pacijenti sa nižim gradusom bili nešto mlađi u odnosu na pacijente sa višim gradusom, ali **nije bilo statistički značajne razlike** ( $t=-1,215$ ;  $p=0,228$ );
- da **nije bilo statistički značajne razlike** kod pacijenata sa nižim gradusom i pacijenata sa višim gradusom u odnosu na veličinu tumora ( $Z=-0,506$ ;  $p=0,613$ ), na procenat telomeraza ( $Z=-0,794$ ;  $p=0,427$ ) kao i na procenat ekspresije Ciklina A ( $Z=-1,379$ ;  $p=0,168$ );
- da je uočeno **statistički značajno** duže preživljavanje kod pacijenata sa nižim gradusom u odnosu na pacijente sa višim gradusom ( $t=2,076$ ;  $p=0,041$ ).

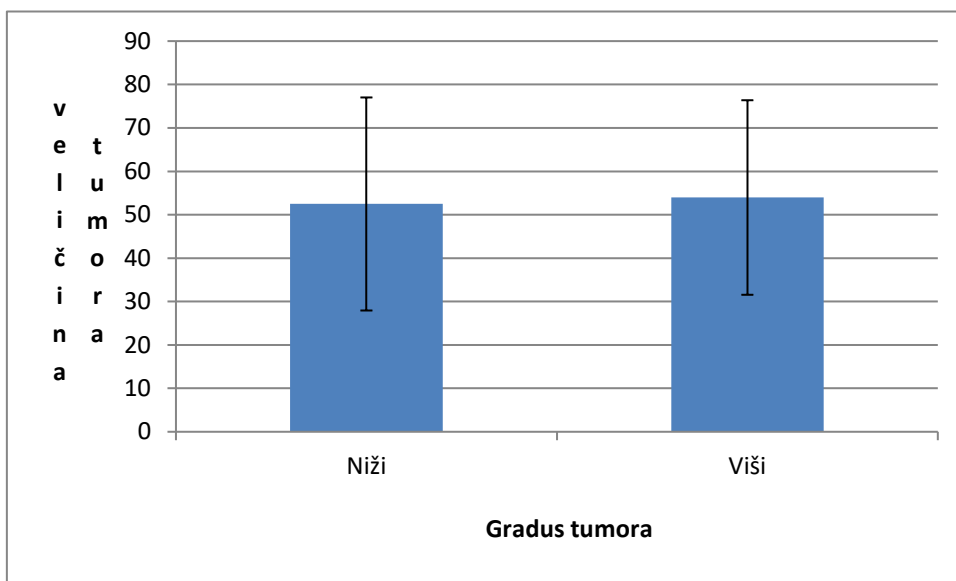
Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 17. i na Grafikonima 22,23,24,25,26,27.

**Tabela 17.** Odnos gradusa tumora (niži i viši) i starosti, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A i Ki67 i preživljavanja kod pacijenata sa RCC

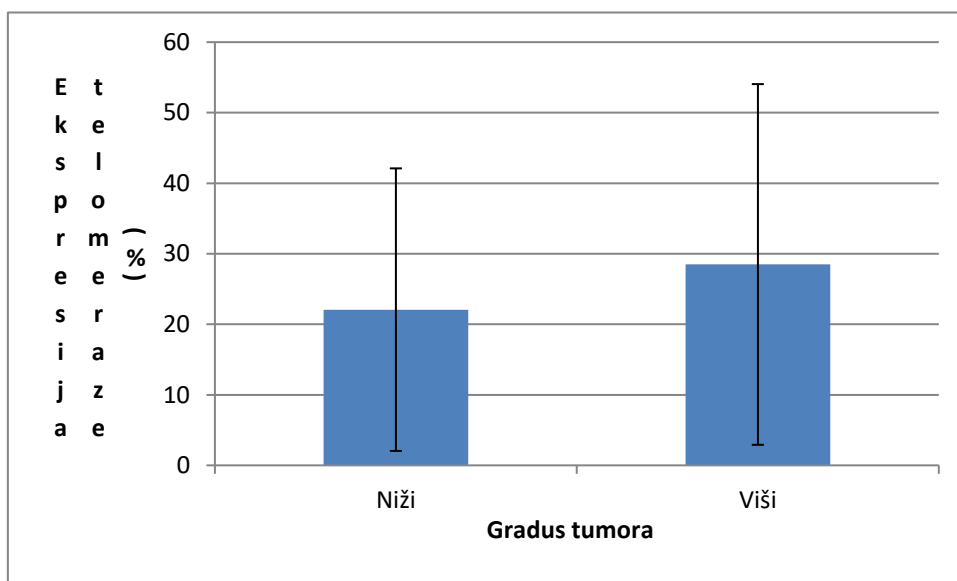
	Gradus tumora	
	Niži	Viši
Starost	57,98 SD= 11,34	60,88 SD=8,62
veličina tumora (mm)	52,48 SD=24,54	53,97 SD= 22,41
Ekspresija telomeraze (%)	22,07 SD= 20,03	28,48 SD=25,57
Ekspresija ciklina A (%)	14,15 SD= 16,35	23,03 SD= 24,87
Ekspresija Ki67(%)	5,00 SD=7,20	8,70 SD=8,90
Preživljavanje (u mesecima)	40,32 SD= 11,49	34,33 SD=13,29



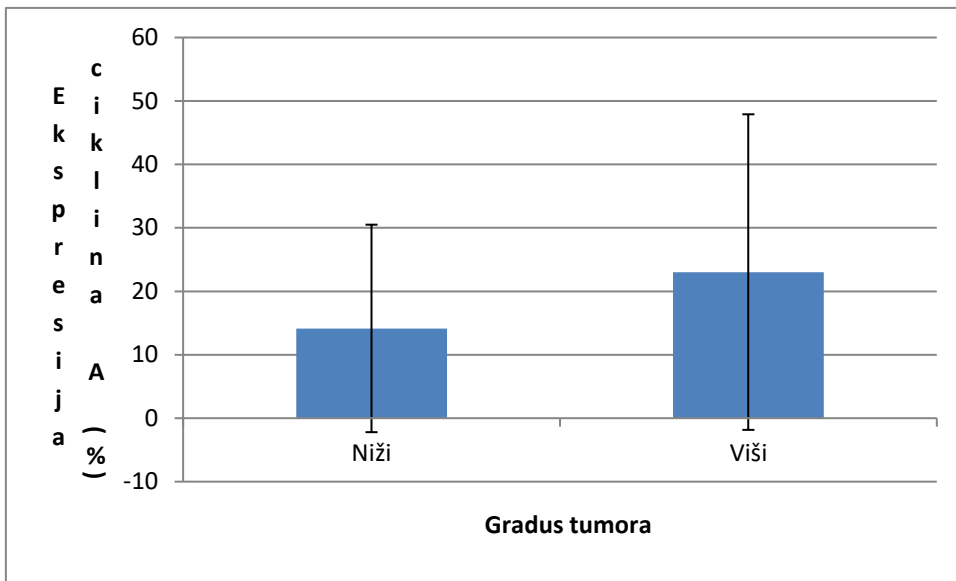
**Grafikon 22.** Odnos gradusa tumora i starosti kod pacijenata sa RCC



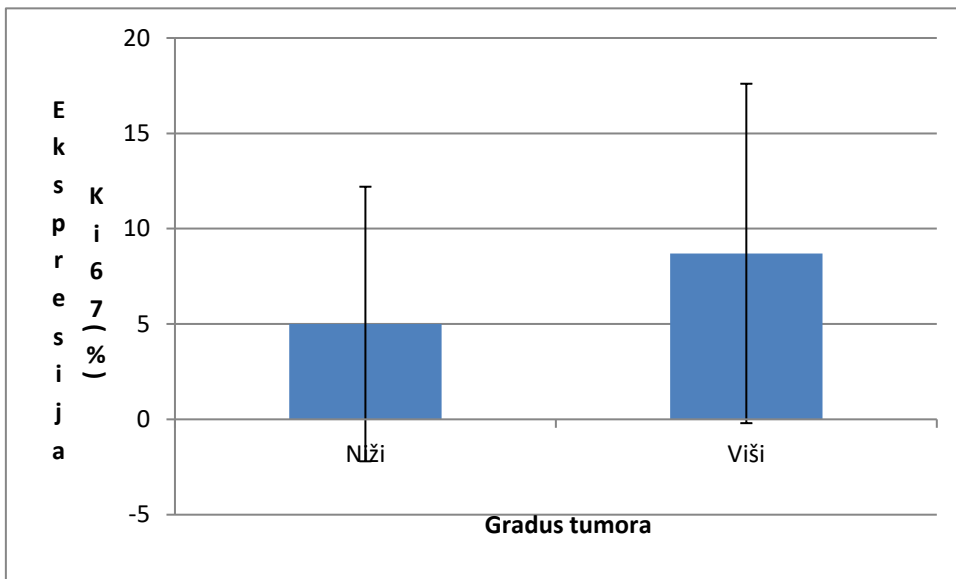
**Grafikon 23.** Odnos gradusa tumora i veličine tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 24.** Odnos gradusa tumora i ekspresije telomeraze kod pacijenata sa RCC

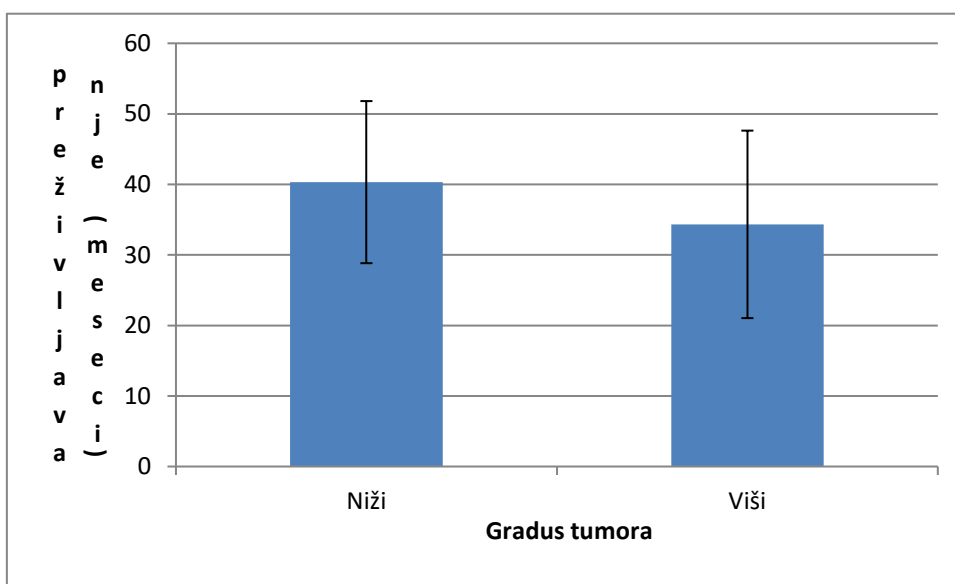


**Grafikon 25.** Odnos gradusa tumora i ekspresije ciklina A kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 26.** Odnos gradusa tumora i ekspresije Ki 67 kod pacijenata sa RCC





**Grafikon 27.** Odnos gradusa tumora i preživljavanja kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.15. Odnos gradusa tumora (niži i viši) i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora i pola kod pacijenata sa RCC

Analiziranjem histopatoloških tipova tumora kod pacijenata sa RCC u odnosu na niži i viši gradus tumora **nije dobijena statistički značajna razlika** ( $X^2=1,167$ ;  $p=0,583$ ).

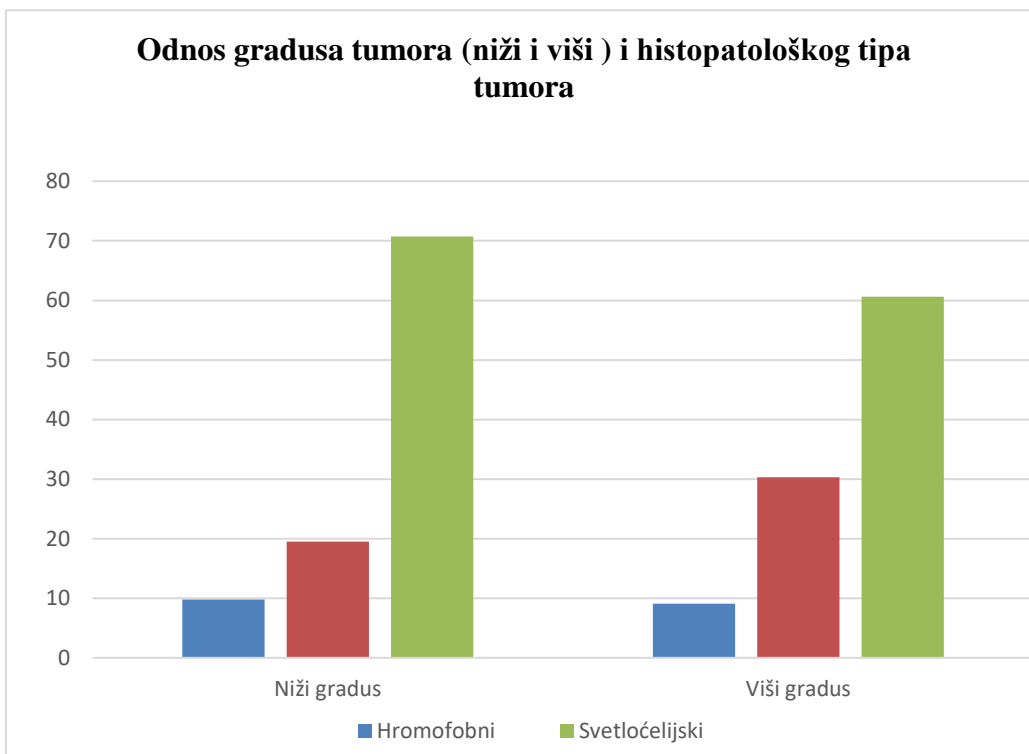
Upoređujući pol pacijenata sa nižim i višim gradusom tumora, **nije nađena statistički značajna razlika** ( $X^2=0,039$ ;  $p=0,843$ ).

Upoređujući stadijum i gradus tumora, primećeno je da najveći broj pacijenata sa RCC pripada grupi sa nižim gradusom i nižim stadijumom tumora, zatim sa višim gradusom i višim stadijumom tumora, dok je znatno manje pacijenata bilo u grupi sa višim stadijumom, a nižim gradusom tumora i sa nižim stadijumom, a višim gradusom tumora. Ova razlika je **statistički značajna** ( $X^2=4,985$ ;  $p=0,026$ ).

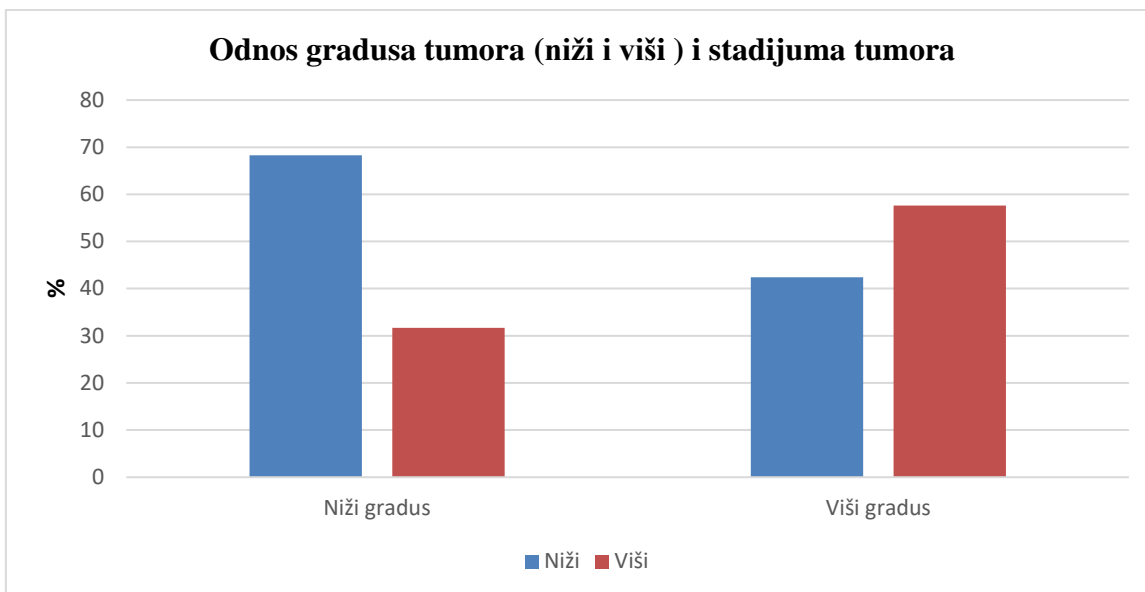
Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 18. i na Grafikonima 28,29,30.

**Tabela 18.** Odnos gradusa tumora (niži i viši) i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora i pola kod pacijenata sa RCC

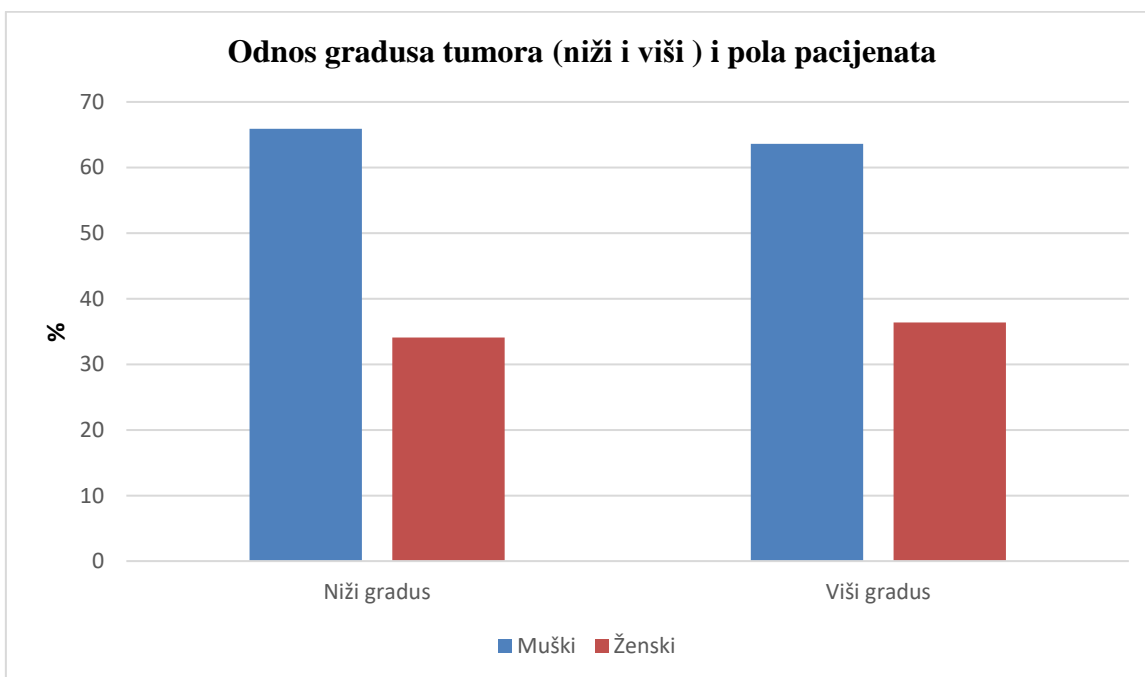
		Gradus tumora		
		Niži	Viši	
Histopatološki tip tumora	Hromofobni	4 (9,8%)	3 (9,1%)	$X^2=1,167$ ; $p=0,583$
	Papilarni	8 (19,5%)	10 (30,3%)	
	Svetloćelijski	29 (70,7%)	20 (60,6%)	
Stadijum tumora	Niži	28 (68,3%)	14 (42,4%)	$X^2=4,985$ ; $p=0,026$
	Viši	13 (31,7%)	19 (57,6%)	
Pol	Muški	27 (65,9%)	21 (63,6%)	$X^2=0,039$ ; $p=0,843$
	Ženski	14 (34,1%)	12 (36,4%)	



**Grafikon 28.** Odnos gradusa tumora (niži i viši) i histopatološkog tipa tumora, kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 29.** Odnos gradusa tumora (niži i viši) i stadijuma tumora, kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 30.** Odnos gradusa tumora (niži i viši) i pola kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.16. Odnos veličine (dimenzija) tumora i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

Kod pacijenata sa RCC praćen je odnos veličine tumora i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola.

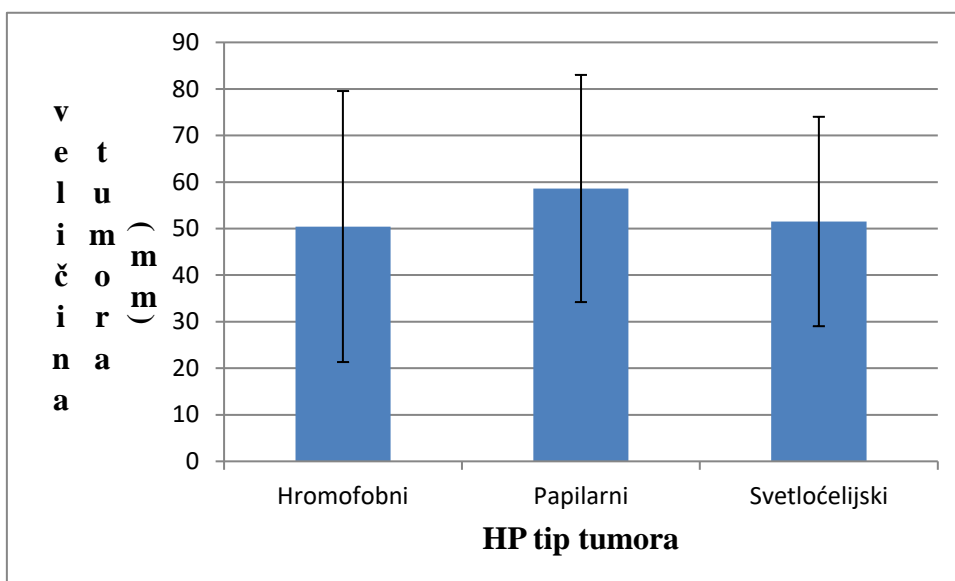
Rezultati istraživanja su pokazali:

- da **nema statistički značajne razlike** po histopatološkom tipu tumora ( $X^2=1,752$ ;  $p=0,416$ ), prema gradusu tumora ( $t=-0,269$ ;  $p=0,788$ ), a ni po polu pacijenta ( $t=0,011$ ;  $p=0,991$ ),
- ali da **ima statistički značajne razlike** prema stadijumu tumora ( $t= -4,316$ ;  $p<0,001$ ).

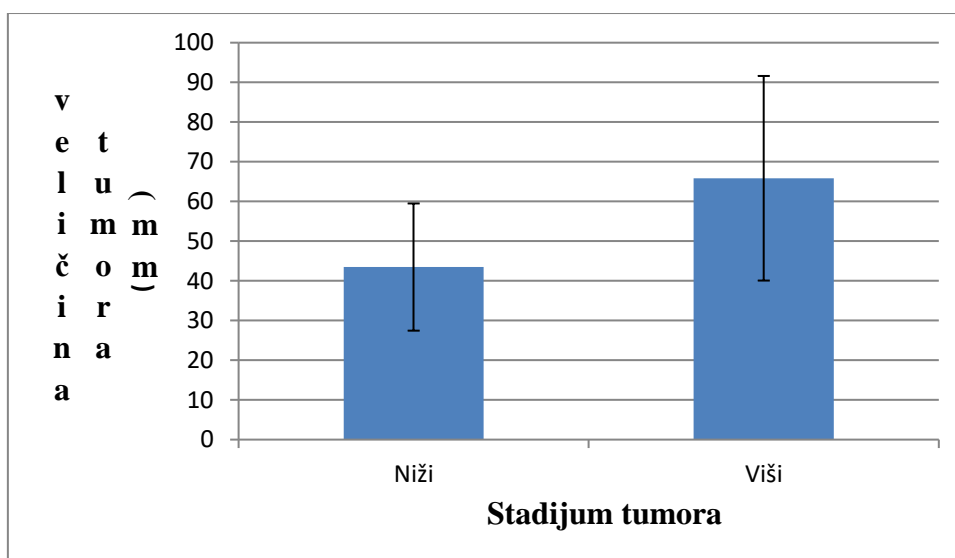
Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 19. i na Grafikonima 31,32,33,34.

**Tabela 19.** Odnos veličine tumora i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

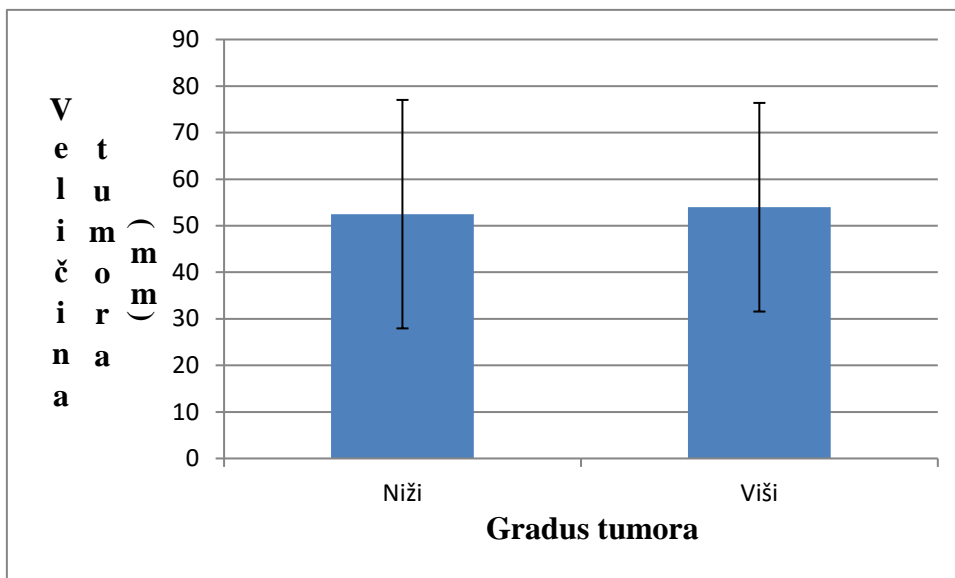
Veličina tumora (mm)			
		Aritmetička sredina	SD
Histopatološki tip tumora	Hromofobni	50.44	29.11
	Papilarni	58.61	24.40
	Svetloćelijski	51.52	22.49
Stadijum tumora	Niži	43.47	16.02
	viši	65.84	25.77
Gradus tumora	niži	52.48	24.54
	viši	53.97	22.41
Pol	Muški	53.16	22.26
	Ženski	53.10	26.01



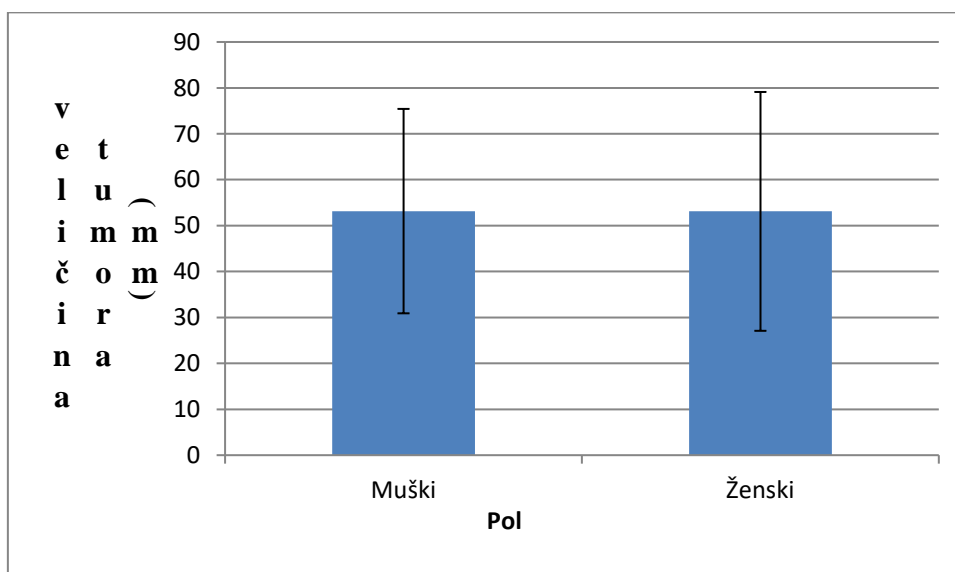
**Grafikon 31.** Odnos veličine tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 32.** Odnos veličine tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 33.** Odnos veličine tumora i gradusa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 34.** Odnos veličine tumora i pola kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.17. Odnos preživljavanja i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC

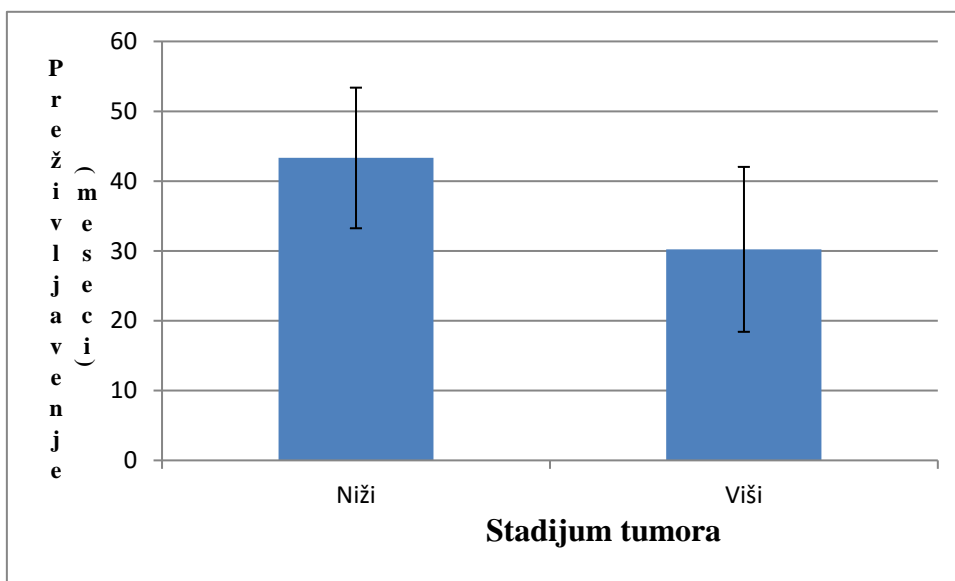
Rezultati istraživanja odnosa preživljavanja i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC su pokazala da su pacijenti sa nižim stadijumom tumora imali duže preživljavanje u odnosu na pacijente sa višim stadijumom tumora.

T testom je potvrđeno da je ova **razlika statistički značajna** ( $t=5,141$ ;  $p<0,001$ ).

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 20. i na Grafikonu 35.

**Tabela 20.** Stadijum tumora kod pacijenata sa RCC

Stadijum tumora	N	Aritmetička sredina	SD
Niži	42	43,31	10,069
Viši	32	30,22	11,810
Ukupno	74	37,65	12,602



**Grafikon 35.** Odnos preživljavanja i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.18. Odnos preživljavanja i gradusa tumora kod pacijenata sa RCC

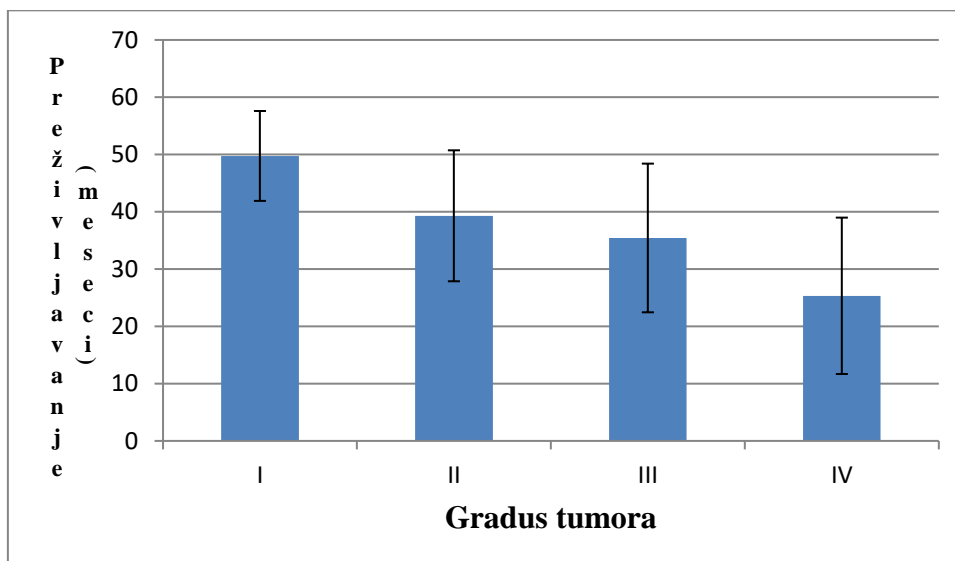
Istraživanje kod pacijenata sa RCC je pokazalo da su pacijenti sa gradusom I imali najduže preživljavanje, a najmanje preživljavanje su imali pacijenti sa gradusom IV.

Spirmanovom korelacionom analizom je utvrđeno da postoji statistički značajna negativna povezanost gradusa tumora i preživljavanja pacijenta obolelih od RCC ( $\rho = -0,276$ ;  $p = 0,017$ ).

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 21. i na Grafikonu 36.

**Tabela 21.** Gradus tumora kod pacijenata sa RCC

Gradus tumora	N	Aritmetička sredina	SD
I	4	49,75	7,848
II	37	39,30	11,431
III	30	35,43	12,977
IV	3	23,33	13,650
Ukupno	74	37,65	12,602



**Grafikon 36.** Odnos preživljavanja i gradusa tumora kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.19. Odnos preživljavanja i gradusa tumora (niži i viši) kod pacijenata sa RCC

Istraživanje kod pacijenata sa RCC je pokazalo da je prosečno preživljavanje daleko veće kod pacijenata sa nižim gradusom tumora u odnosu na pacijente sa višim gradusom tumora. ( $40,32 \pm 11,49$ ).

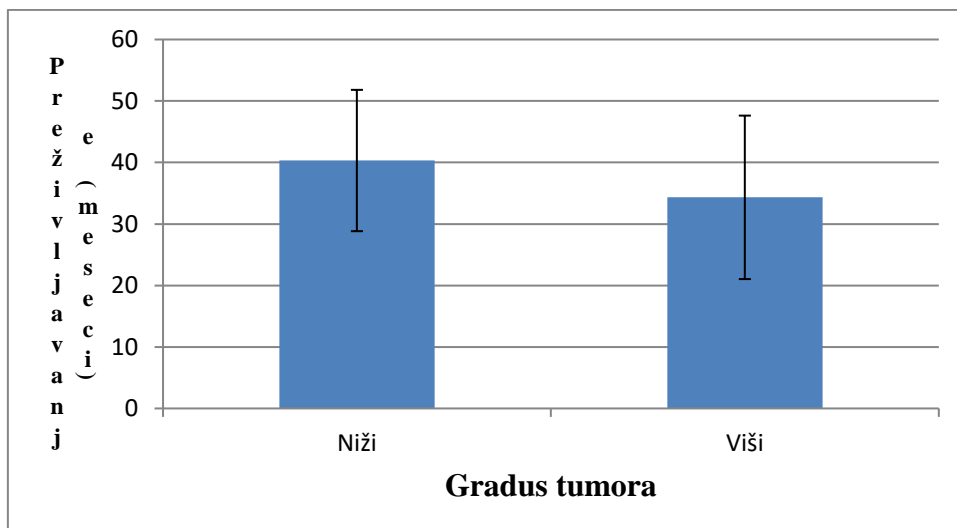
T testom je potvrđeno da je ova **razlika statistički značajna** ( $t=2,076$ ;  $p=0,041$ ).

Rezultati istraživanja su prikazani su u Tabeli 22. i na Grafikonu 37.

**Tabela 22.** Gradus tumora (niži i viši) kod pacijenata sa RCC

Gradus tumora	N	Aritmetička sredina	SD
Niži	41	40,32	11,492
Viši	33	34,33	13,294
ukupno	74	37,65	12,602





**Grafikon 37.** Odnos preživljavanja i gradusa tumora (niži i viši) kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.20. Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

Kod pacijenata sa RCC praćen je odnos histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

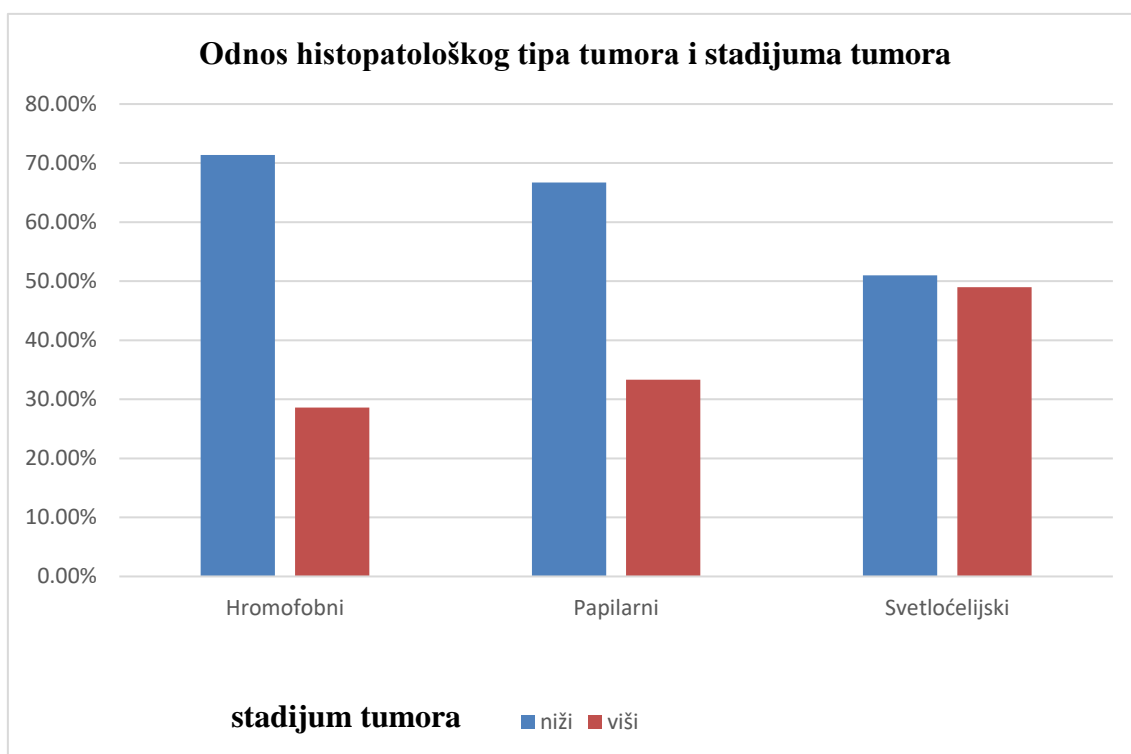
Rezultati istraživanja su pokazali:

- da u odnosu histopatološki tip tumora i stadijum tumora **ne postoji statistički značajna razlika** ( $X^2=1,991$ ;  $p = 0,406$ ).
- da u odnosu histopatološki tip tumora i gradus tumora **postoji statistički značajna razlika** ( $X^2=1,167$ ;  $p = 0,583$ ).
- da u odnosu histopatološki tip tumora i pol pacijenata sa RCC **postoji statistički značajna razlika** ( $X^2=4,511$ ;  $p = 0,125$ ).

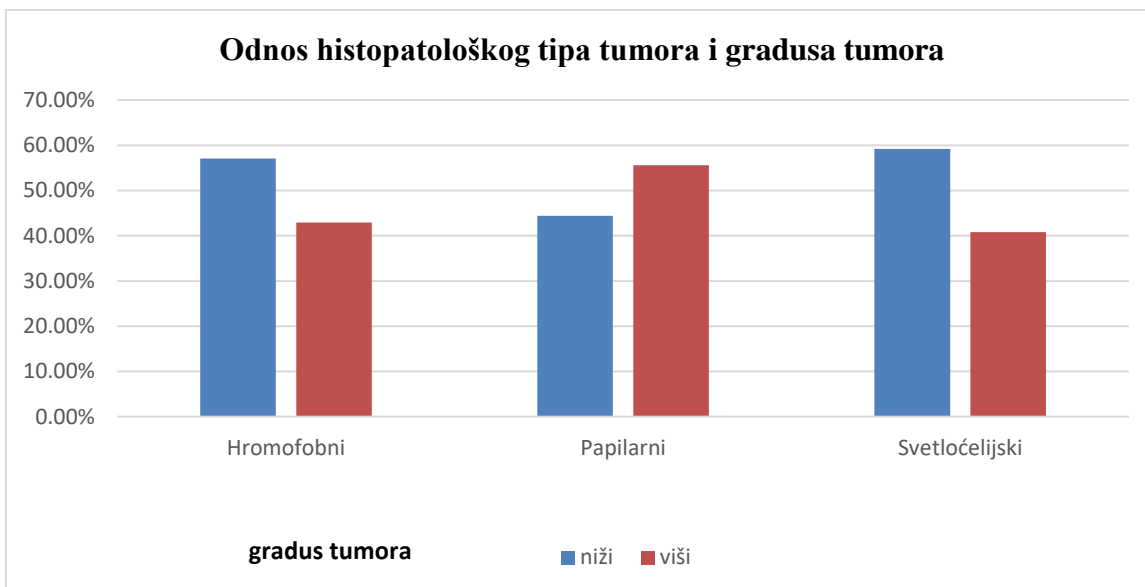
Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 23. i na Grafikonima 38,39,40.

**Tabela 23.** Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora, gradusa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

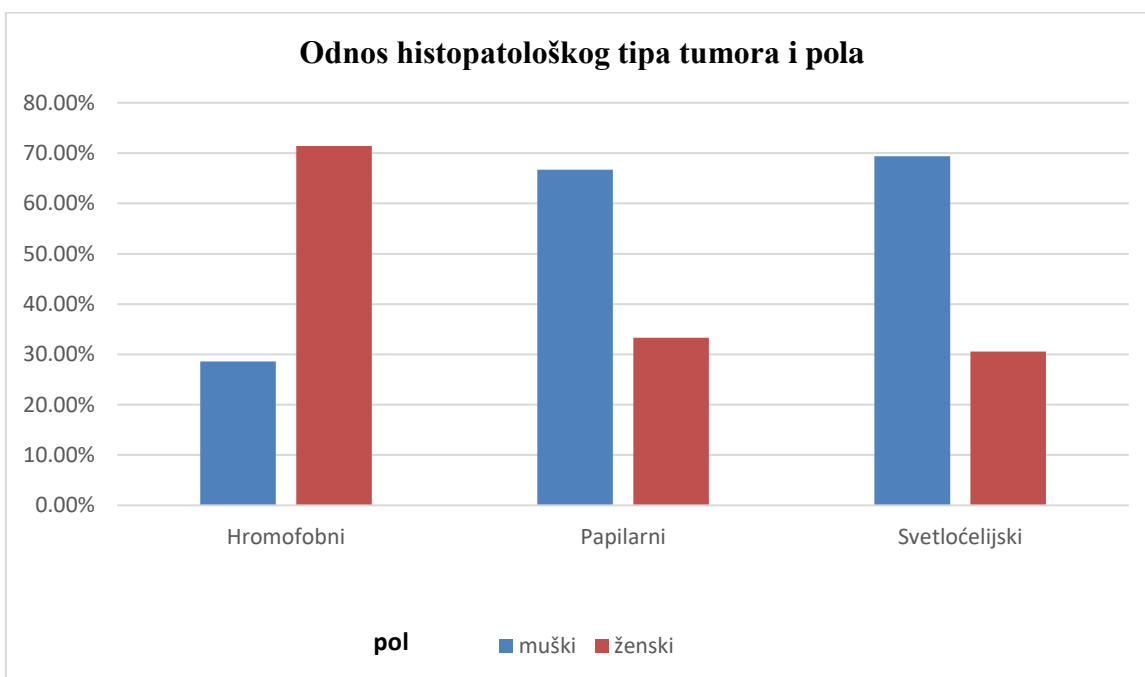
		Histopatološki tip tumora					
		Hromofobni		Papilarni		Svetloćelijski	
		N	%	N	%	N	%
Stadijum tumora	niži	5	71,4%	12	66,7%	25	51,0%
	viši	2	28,6%	6	33,3%	24	49,0%
Gradus tumora	niži	4	57,1%	8	44,4%	29	59,2%
	viši	3	42,9%	10	55,6%	20	40,8%
Pol	muški	2	28,6%	12	66,7%	34	69,4%
	ženski	5	71,4%	6	33,3%	15	30,6%



**Grafikon 38.** Odnos histopatološkog tipa tumora i stadijuma tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 39.** Odnos histopatološkog tipa tumora i gradusa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 40.** Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.21. Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC

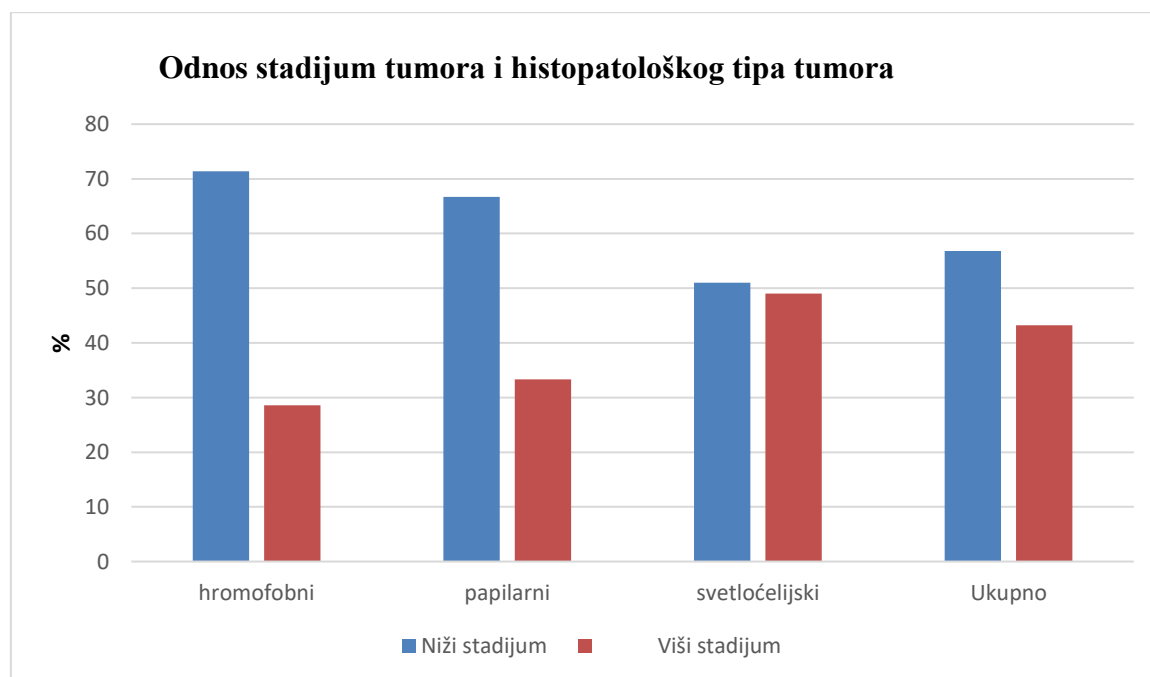
Analiziranje odnosa stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC, pokazalo je da **nije bilo statistički značajne razlike** ( $X^2=1,991$ ;  $p=0,406$ ).

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 24. i na Grafikonu 41.

**Tabela 24.** Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC

			Stadijum tumora		Ukupno
			Niži	Viši	
Histopatološki tip tumora	hromofobni	N %	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100,0%)
	papilarni	N %	12 (66,7%)	6 (33,3%)	18 (100,0%)
	svetloćelijski	N %	25 (51,0%)	24(49,0%)	49 (100,0%)
Ukupno		N %	42 (56,8%)	32 (43,2%)	74 (100,0%)

nema statistički značajne razlike ( $X^2=1,991$ ;  $p=0,406$ ).



**Grafikon 41.** Odnos stadijuma tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.22. Odnos gradusa tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC

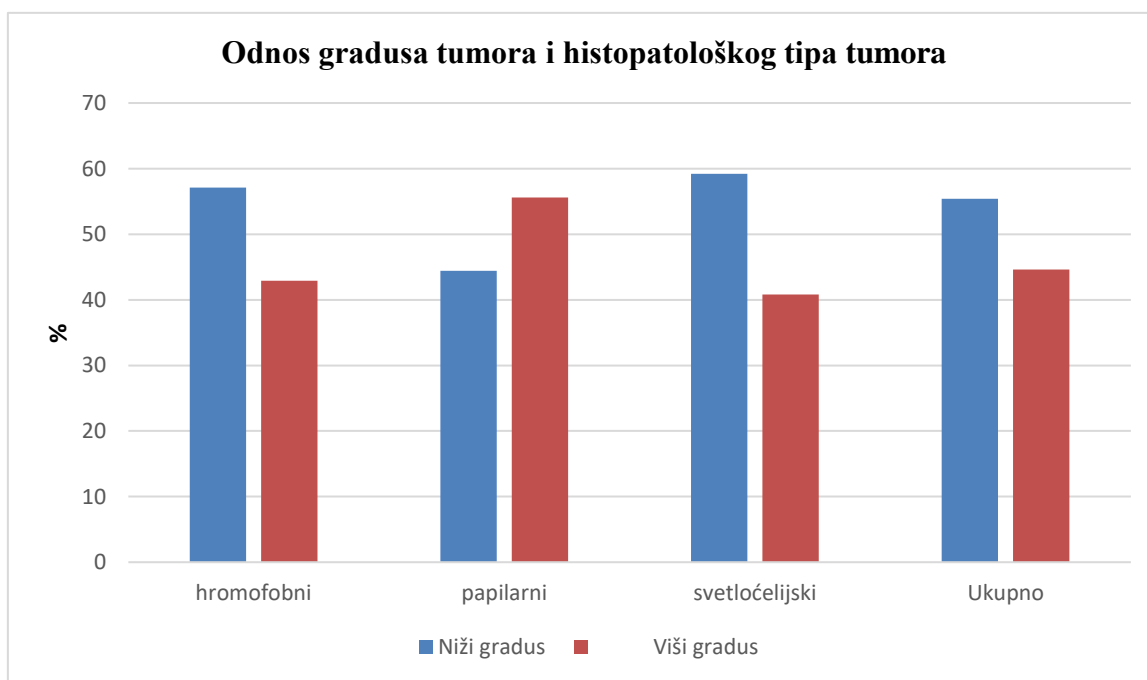
Analiziranje odnosa gradusa tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC, pokazalo je da je **razlika statistički značajna** ( $X^2=1,167$ ;  $p=0,583$ ).

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabela 25. i na Grafikonu 42.

**Tabela 25.** Odnos gradusa tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC

			Gradus tumora		Ukupno
			Niži	Viši	
Histopatološki tip tumora	hromofobni	N %	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7 (100,0%)
	papilarni	N %	8 (44,4%)	10 (55,6%)	18 (100,0%)
	svetloćelijski	N %	29 (59,2%)	20(40,8%)	49 (100,0%)
Ukupno		N %	41 (55,4%)	33 (44,6%)	74 (100,0%)

razlika je statistički značajna ( $X^2=1,167$ ;  $p=0,583$ ).



**Grafikon 42.** Odnos gradusa tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.23. Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

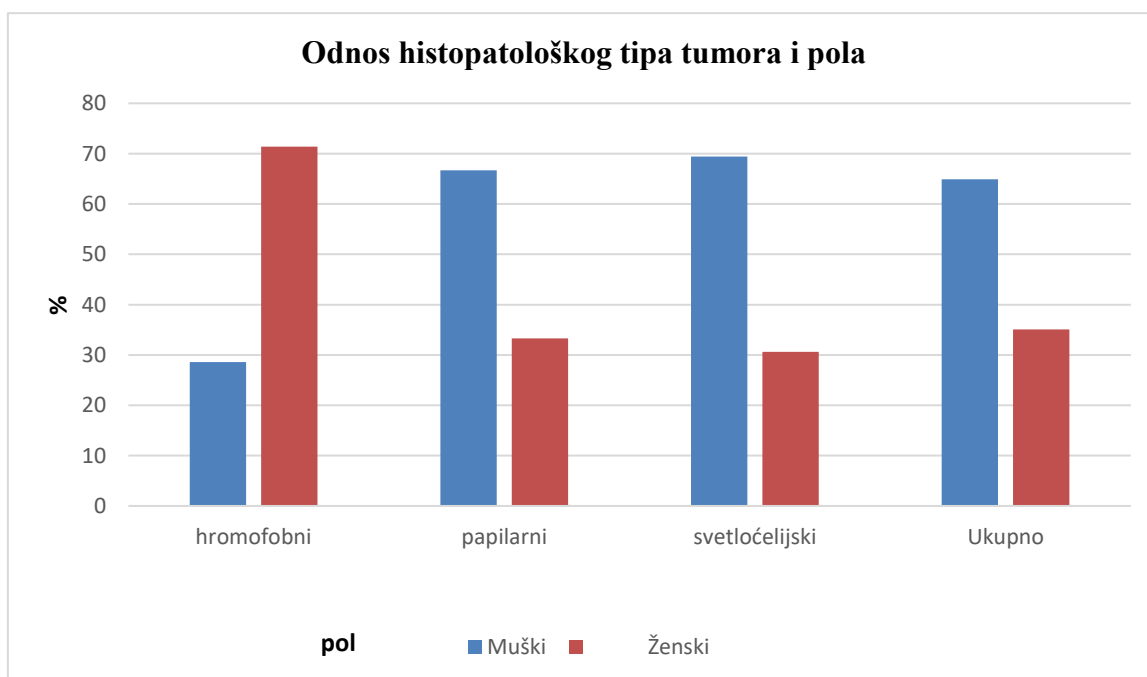
Analiziranje odnosa histopatološkog tipa tumora i pola, kod pacijenata sa RCC, pokazalo je da je **razlika statistički značajna** ( $X^2=4,511$ ;  $p=0,125$ ).

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabela 26. i na Grafikonu 43.

**Tabela 26.** Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

			Pol		Ukupno
			Muški	Ženski	
Histopatološki tip tumora	hromofobni	N %	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7 (100,0%)
	papilarni	N %	12 (66,7%)	6 (33,3%)	18 (100,0%)
	svetloćelijski	N %	34 (69,4%)	15 (30,6%)	49 (100,0%)
Ukupno		N %	48 (64,9%)	26 (35,1%)	74 (100,0%)

razlika je statistički značajna ( $X^2=4,511$ ;  $p=0,125$ ).



**Grafikon 43.** Odnos histopatološkog tipa tumora i pola kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.24. Odnos histopatološkog tipa tumora i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomerase, ciklina A i Ki67 i preživljavanja (meseći) kod pacijenata sa RCC

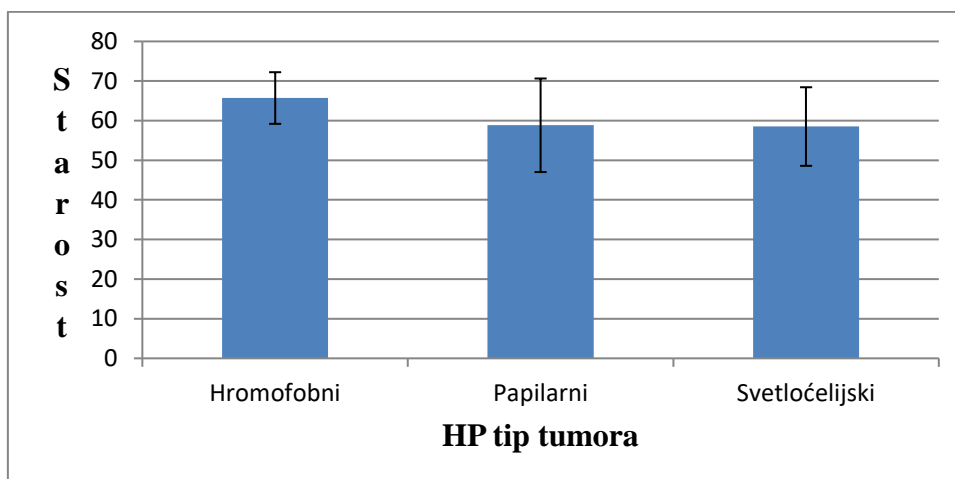
Analiziranje odnosa histopatološkog tipa tumora i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomerase, ciklina A i Ki67 i preživljavanja, kod pacijenata sa RCC, pokazalo je:

- da **nema statistički značajne razlike** između starosti pacijenta ( $F=1,557$ ;  $p=0,218$ ) i preživljavanja pacijenta. ( $F=0,225$ ;  $p=0,799$ ),
- da **nema statistički značajne razlike** po dimenzijama tumora ( $X^2=1,752$ ;  $p=0,416$ ),
- da **postoji statistički značajna razlika** po ekspresiji telomeraza ( $X^2=35,497$ ;  $p<0,001$ ) i po ekspresiji ciklina A ( $X^2=19,460$ ;  $p<0,001$ ),
- da je kod ekspresije telomeraza utvrđeno, da je **razlika statistički značajna** između hromofobnog vs. papilarnog ( $p<0,001$ ), svetloćelijskog i papilarnog ( $p<0,001$ ), ali je nema između hromofobnog vs. svetloćelijskog ( $p=1,000$ ),
- da kod ekspresije ciklina A, **postoji statistički značajna razlika** između hromofobnog vs. papilarnog ( $p=0,140$ ), svetloćelijskog i papilarnog ( $p<0,001$ ), ali je **nema statistički značajne razlike** između hromofobnog vs. svetloćelijskog ( $p=1,000$ ).

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 27. i na Grafikonima 44,45,46,47,48,49.

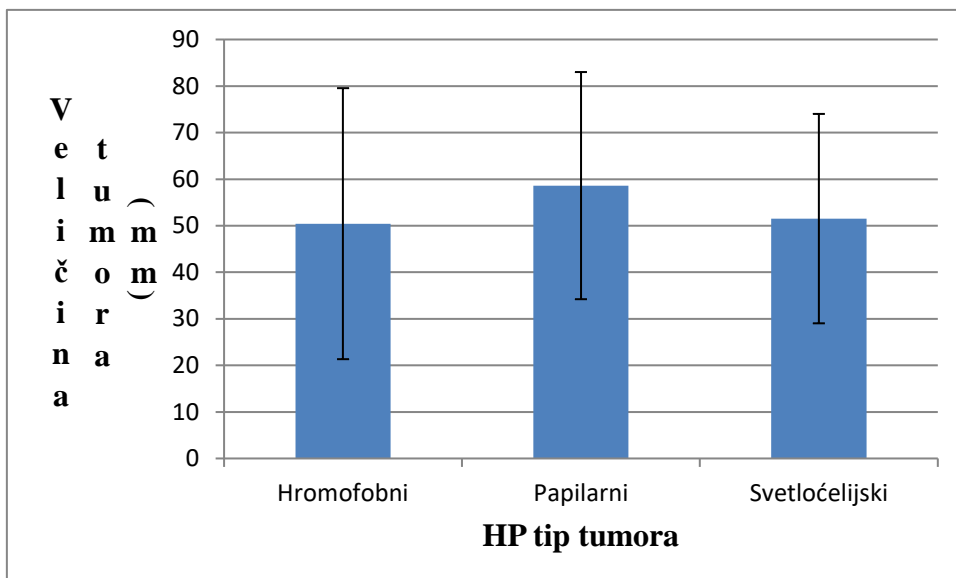
**Tabela 27.** Odnos histopatološkog tipa tumora i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze, ciklina A i Ki67 i preživljavanja kod pacijenata sa RCC

Histopatološki tip tumora			
		Aritmetička sredina	SD
Starost pacijenata	Hromofobni	65.71	6.52
	Papilarni	58.83	11.81
	Svetloćelijski	58.51	9.92
Veličina tumora (mm)	Hromofobni	50.44	29.11
	Papilarni	58.61	24.40
	Svetloćelijski	51.52	22.49
Ekspresija telomeraze (%)	Hromofobni	12.14	11.85
	Papilarni	56.11	14.81
	Svetloćelijski	15.31	14.41
Ekspresija ciklina A (%)	Hromofobni	22.86	35.57
	Papilarni	35.28	17.45
	Svetloćelijski	11.12	15.35
Ekspresija Ki67(%)	Hromofobni	2,90	5,70
	Papilarni	14,80	8,30
	Svetloćelijski	4,20	6,30
Preživljavanje (meseći)	Hromofobni	36.71	11.34
	Papilarni	39.39	12.71
	Svetloćelijski	37.14	12.91

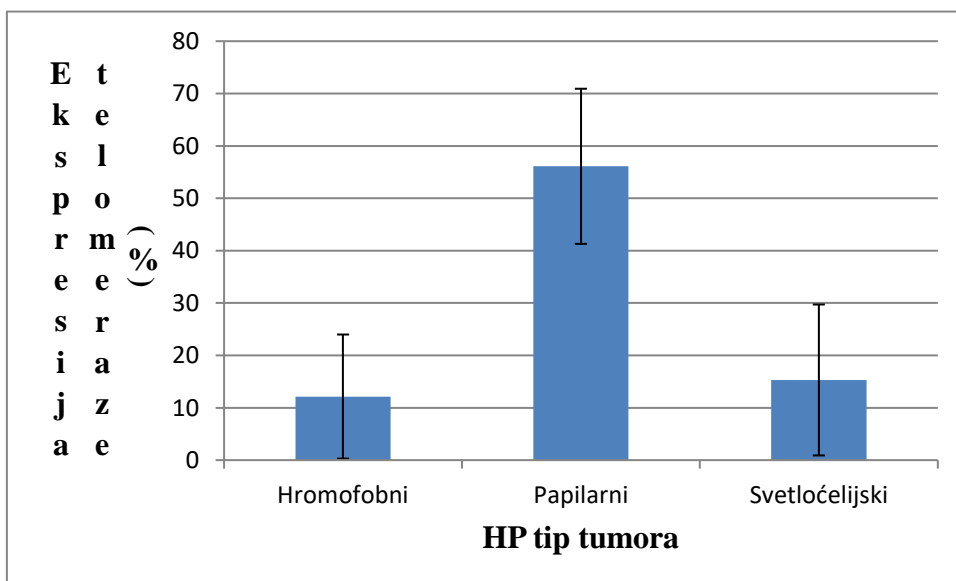


**Grafikon 44.** Odnos starosti i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC

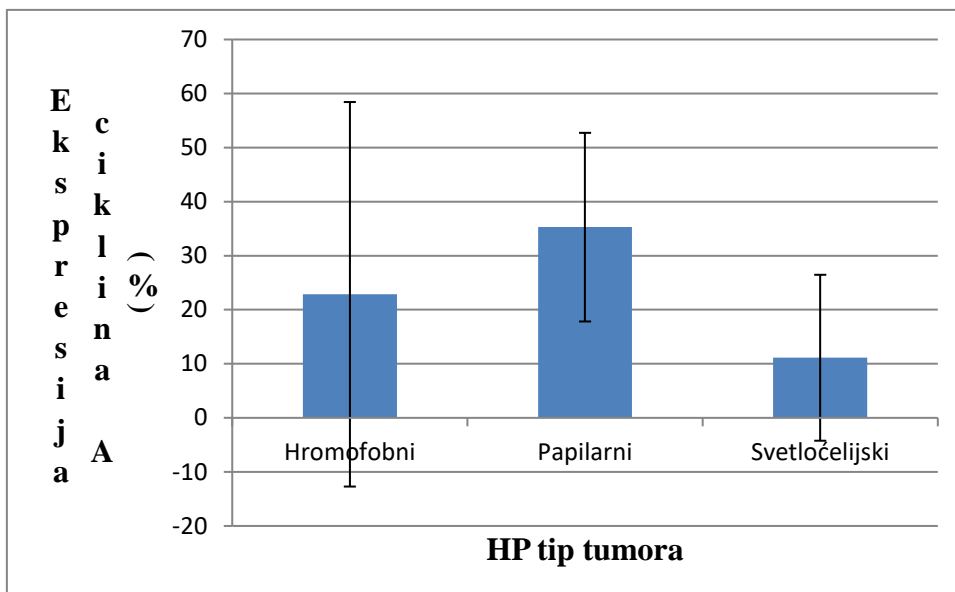




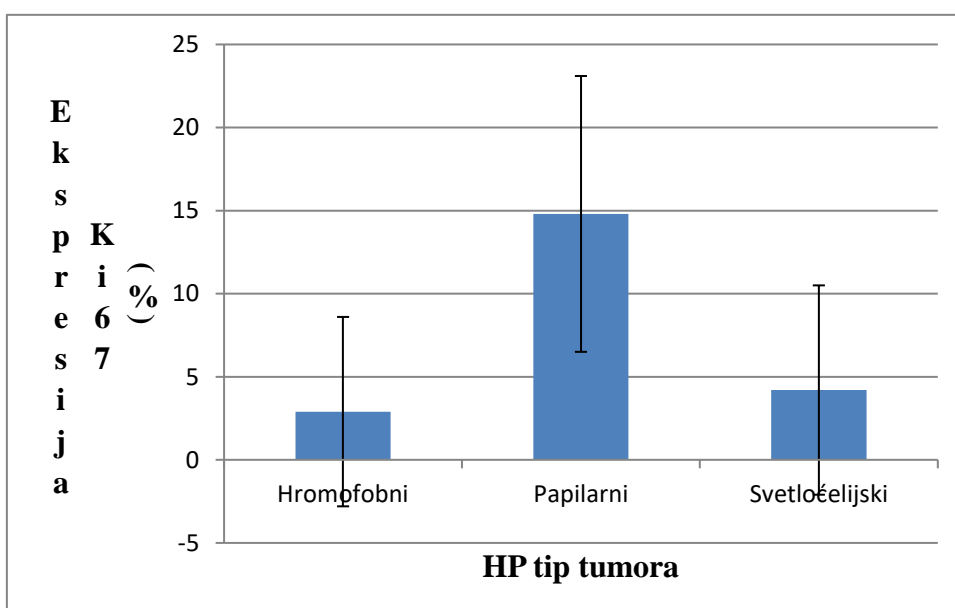
**Grafikon 45.** Odnos veličine tumora i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC



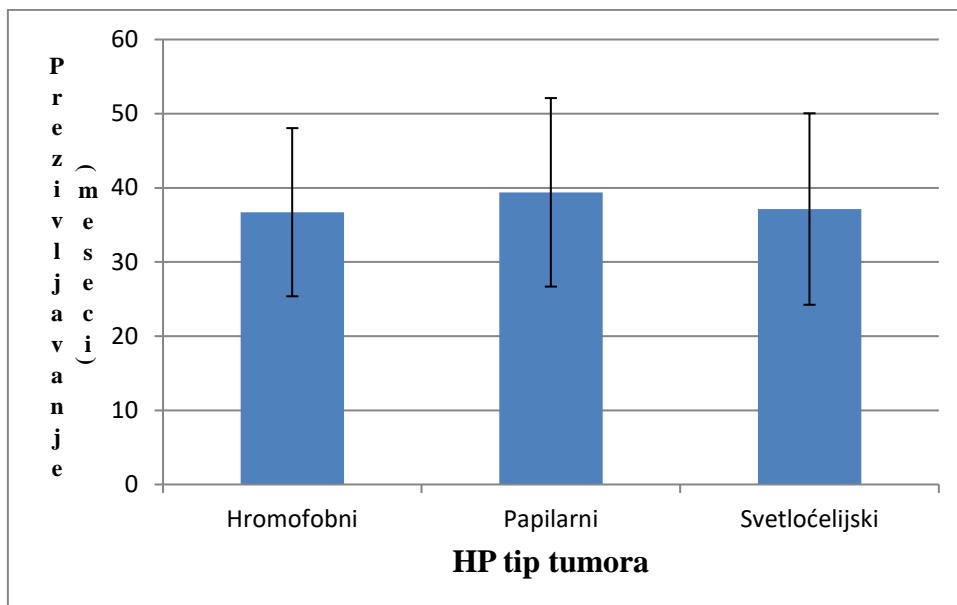
**Grafikon 46.** Odnos ekspresije telomeraze i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 47.** Odnos ekspresije ciklina A i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 48.** Odnos ekspresije Ki67 i histopatološkog tipa tumora kod pacijenata sa RCC



**Grafikon 49.** Odnos preživljavanja i histopatološkega tipa tumora kod pacijenata sa RCC

#### 4.1.25. Korelaciona analiza

Korelaciona analiza kod pacijenata sa RCC pokazuje:

1. da veličina tumora kod pacijenata sa RCC korelira sa preživljavanjem. Što je veći tumor, to je manje preživljavanje,
2. da postoji značajna korelacija starosti i preživljavanja. Što je veća starost, to je manje preživljavanje,
3. da ekspresije telomeraze i ciklin A koreliraju značajno i to pozitivno, odnosno što je veća vrednost ciklina A, veća je i vrednost telomeraze,
4. da ekspresija Ki67 ne korelira sa starošću, veličinom tumora i preživljavanjem, ali postoji korelacija sa telomerazom i ciklinom A.

Rezultati korelacione analize su prikazani u Tabeli 28.

**Tabela 28.** Korelaciona analiza

		Starost	Dimenzije Tu (mm)	Preživljavanje (meseći)	Telomeraze (%)	Ciklin A (%)
Veličina tumora (mm)	Rho	,124				
	p vrednost	,292				
Preživljavanje (meseći)	Rho	-,258*	-,234*			
	p vrednost	,027	,045			
Telomeraze (%)	Rho	,062	,135	,079		
	p vrednost	,600	,252	,503		
Ciklin A (%)	Rho	,153	,126	-,034	,698**	
	p vrednost	,195	,285	,771	<0,001	
Ki67 (%)	Rho	,128	,175	-,058	,705**	,873**
	p vrednost	,277	,137	,625	<0,001	<0,001

\* Korelacija značajna na nivou 0.05

\*\* Korelacija značajna na nivou 0.01

#### 4.1.26. Imunohistohemijska ekspresija telomeraze kod pacijenata sa RCC

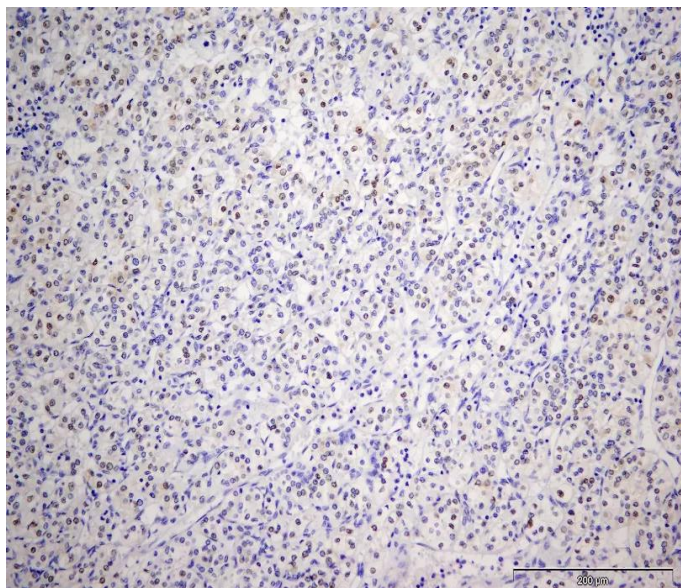
Istraživanja su pokazala da su vrednosti ekspresije telomeraze vrlo slične kada je u pitanju pol pacijenata, gradus tumora i stadijum tumora. Jedino je evidentna razlika po histopatološkom tipu tumora u korist papilarnog histopatološkog tipa, koji je drastično veći od ostala dva histopatološka tipa tumora.

Korelacionom analizom nije pronađena povezanost između ekspresije telomeraze, starosti pacijenta, veličine (dimenzija) tumora i preživljavanja pacijenata.

Rezultati imunohistohemijske ekspresije telomeraze kod pacijenata sa RCC su prikazani u Tabeli 29.

**Tabela 29.** Ekspresija telomeraze (%) kod pacijenata sa RCC

Ekspresija Telomeraze (%)				
		Aritmetička sredina	SD	p vrednost
Pol	muški	24,70	23,00	0,720
	ženski	25,40	22,70	
Gradus tumora	niži	22,10	20,00	0,427
	viši	28,50	25,60	
Stadijum tumora	niži	25,80	24,60	0,917
	viši	23,80	20,30	
Histopatološki tip tumora	Hromofobni	12,10	11,90	<0,001
	Papilarni	56,10	14,80	
	Svetloćelijski	15,30	14,40	



**Slika 27.** Imunohemijska ekspresija telomeraze u tumorskim ćelijama, x200

#### 4.1.27. Imunohistohemijska ekspresija ciklina A kod pacijenata sa RCC

Istraživanja su pokazala da slično ekspresiji telomeraze i ekspresija ciklin A ima slične rezultate.

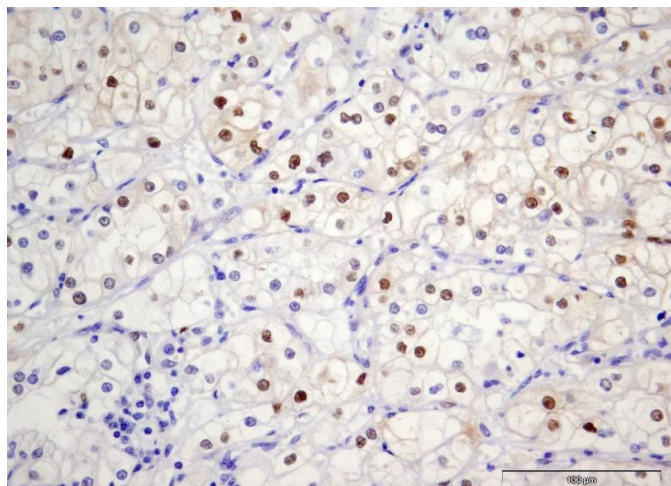
Ni ovde nema značajne razlike po polu pacijenta, gradusu tumora, stadijumu tumora, ali zato postoji razlika prema histopatološkom tipu tumora. I u ovom slučaju najveća vrednost je kada je u pitanju papilarni histopatološki tip tumora.

Korelacija analiza između ekspresije ciklina A i starosti pacijenta, veličine tumora i preživljavanja, kao i kod ekspresije telomeraze ne postoji.

Rezultati imunohistohemijske ekspresije ciklina A kod pacijenata sa RCC su prikazani u Tabeli 30.

**Tabela 30.** Ekspresija ciklina A (%) kod pacijenata sa RCC

Ekspresija ciklina A (%)				
		Aritmetička sredina	SD	p vrednost
Pol	muški	16,70	20,10	0,300
	ženski	20,80	22,60	
Gradus tumora	niži	14,10	16,40	0,168
	viši	23,00	24,90	
Stadijum tumora	niži	19,20	23,10	0,969
	viši	16,70	17,90	
Histopatološki tip tumora	Hromofobni	22,90	35,60	<0,001
	Papilarni	35,30	17,40	
	Svetloćelijski	11,10	15,40	



**Slika 28.** Imunohistohemijska ekspresija ciklina A u tumorskim ćelijama, x400



#### 4.1.28. Imunohistohemijska ekspresija Ki67 kod pacijenata sa RCC

Kao i u prethodnim analizama, istraživanja su pokazala da je jedino statistički značajna razlika između histopatološkog tipa tumora po ekspresiji Ki67, odnosno između papilarnog histopatološkog tipa i preostala dva histološka tipa tumora.

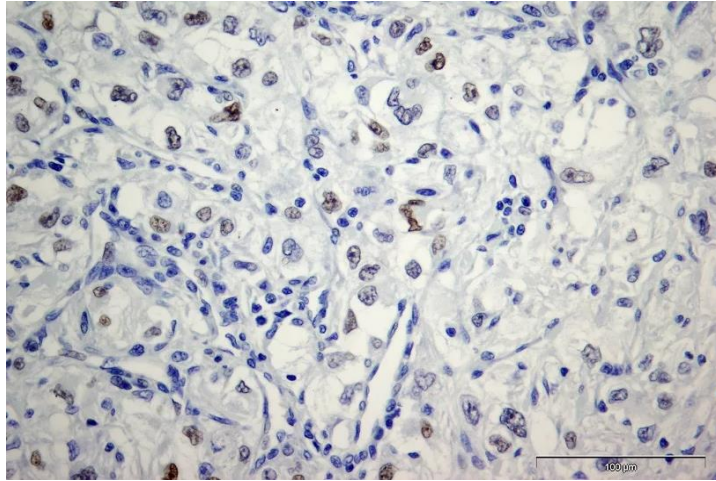
Razlika po gradusu tumora je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05 pa je treba uzeti u razmatranje jer postoji mogućnost da bi se na većem uzorku dobila značajnija razlika.

Ostale razlike i korelacije nisu statistički značajne.

Rezultati imunohistohemijske ekspresije Ki67 kod pacijenata sa RCC su prikazani u Tabeli 31.

**Tabela 31.** Ekspresija Ki67 (%) kod pacijenata sa RCC

Ekspresija Ki67				
		Aritmetička sredina	SD	p vrednost
Pol	muški	6,80	8,80	0,781
	ženski	6,50	6,90	
Gradus tumora	niži	5,00	7,20	0,071
	viši	8,70	8,90	
Stadijum tumora	niži	6,60	8,50	0,986
	viši	6,70	7,90	
Histopatološki tip tumora	Hromofobni	2,90	5,70	<0,001
	Papilarni	14,80	8,30	
	Svetloćelijski	4,20	6,30	



**Slika 29.** Imunohistohemijska ekspresija Ki67 u tumorskim ćelijama, x400

## 4.2. Analiza genetičkih rezultata

Za molekularno-genetičko istraživanja rađena je retrospektivna studija kojom je obuhvaćen 31 uzorak DNK izolovan iz parafinskih kalupa pacijenata sa dijagnostikovanim RCC, prethodno fiksiranim u formalinu i ukalupljenim u parafinu (engl. Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE) i 23 uzorka krvi, uzetih od 54 pacijenata, obolelih od karcinoma bubrežnih ćelija (RCC).

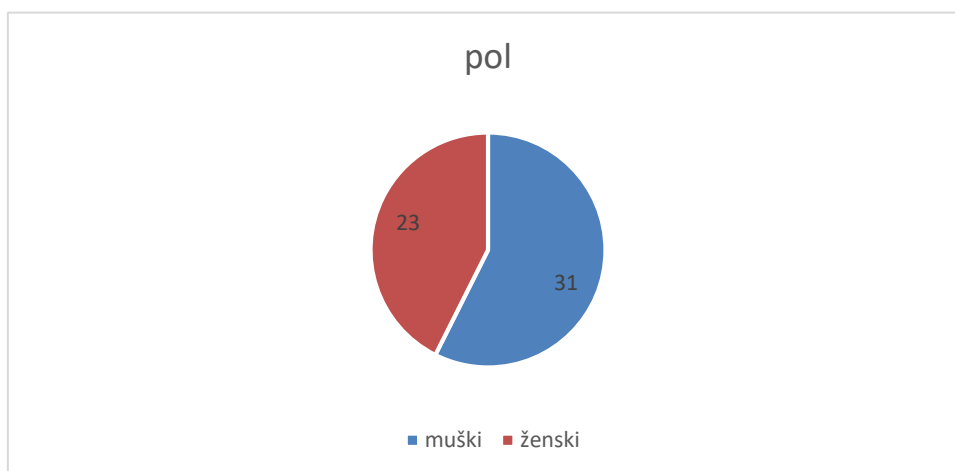
### 4.2.1. Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

U odnosu na pol od ukupno 54 pacijenata obolelih od karcinoma bubrežnih ćelija (RCC), bilo je 31 (57,4%) pacijenata muškog pola i 23 (42,6%) pacijenata ženskog pola. Rezultati istraživanja su pokazali da je incidenca obolelih od RCC češća kod muškaraca, nego kod žena. Prosečna starost svih ispitanika iznosi  $59,1 \pm 10,8$  godina.

Rezultati istraživanja prikazani su u Tabeli 32. i na Grafikonu 50.

**Tabela 32.** Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

Pol pacijenata	N	%
muški	31	57,4
ženski	23	42,6
ukupno	54	100,0



**Grafikon 50.** Distribucija pacijenata sa RCC prema polu

#### **4.2.2. Distribucija pacijenata u odnosu na karakteristike tumora (histopatološki tip tumora, stadijum tumora, gradus tumora i genetske polimorfizme: hTERT polimorfizam, hTERT amplifikacija, hTERT metilacija).**

Istraživanje je pokazalo da je kod najvišeg broja pacijenata dijagnostikovano svetloćelijski histopatološki tip tumora, kod 36 (66,7%) pacijenata.

Najveći broj pacijenata, 25 (46,3%) pacijenata, imao je stadijum tumora 3, a najmanji broj pacijenta, 1 (1,9%) pacijent, imao je stadijum tumora 4.

Najviše pacijenta je pripadalo gradusu tumora II (26 pacijenta, 48,1%) i gradusu tumora III (21 pacijent, 38,9%).

Od ispitivanih genetskih polimorfizama, normalni, nemutirani tip gena (wt alel) i heterozigot bio je prisutan kod 90% pacijenata. Nasuprot tome, genetska amplifikacija je prisutna kod samo 6 (19,4%) pacijenta, ali je zato genetska metilacija bila prisutna u nešto više od polovine pacijenata 17 (54,8%).

Rezultati distribucija pacijenata u odnosu na karakteristike tumora prikazana je u Tabeli 33.

**Tabela 33.** Distribucija pacijenata u odnosu na karakteristike tumora

		N	%
Histopatološki tip	papilarni	13	24.1%
	svetloćelijski	36	66.7%
	hromofobni	5	9.3%
Stadijum tumora (T)	1	19	35.2%
	2	9	16.7%
	3	25	46.3%
	4	1	1.9%
Gradus tumora	I	4	7.4%
	II	26	48.1%
	III	21	38.9%
	IV	3	5.6%
hTERT polimorfizam	wt	28	51.9%
	hetero	22	40.7%
	mut	4	7.4%
hTERT amplifikacija	ne	25	80.6%
	da	6	19.4%
hTERT metilacija	ne	14	45.2%
	da	17	54.8%

#### 4.2.3. Testiranje mutacija i polimorfizma na nivou jednog nukleotida (SNP)

Sekvenciranje 343 bp dugog promotorskog regiona koji se proteže od -278 do +65 unutar hTERT gena, nije ukazalo na aktivaciju mutacija ni u jednom od 31 uzorka RCC. Sekvenciranjem je ipak otkriveno prisustvo tranzicije T/C na poziciji -245 bp (rs2853669) . Da bi se sprovele studija o povezanosti između prisustva tranzicije T/C na poziciji -245 bp i kliničkih parametara, proširen je početni uzorak dodavanjem 23 nove DNK koje dobijene iz krvi još 23 pacijenta obolela od RCC i određen je genotip svakog od njih.

Od 54 analizirana slučaja pacijenata sa RCC, mutirani alel bio je prisutan u homozigotnom obliku (CC) u samo 4 slučaja (7.4%), a u heterozigotnom obliku (CT) u 22 slučaja (40.7%), dok je preostalih 28 slučajeva (51.9%) bilo homozigotno za normalni,

nemutirani tip gena (wt alel). Verovatnoća da postoji RCC nižeg gradusa bila je 3 puta veća kod heterozigota nego kod onih, nemutiranim genotipom (wt alelom) (TT).

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 34.

#### 4.2.4. Analiza hTERT amplifikacije (analiza genske amplifikacije hTERT gena)

Genska amplifikacija uočena je kod 6 (19.4%) od 31 analiziranih uzorka DNK dobijenih iz tumora poreklom iz parafinskih kalupa. Nije uočena povezanost između hTERT amplifikacije i epidemioloških, kliničkih i patoloških nalaza. Nivoi amplifikacije kretali su se u rasponu od 2.60 do 7.61.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 35. i Tabeli 37.

#### 4.2.5. Analiza hTERT metilacije (analiza metilacionog statusa promotora hTERT gena)

Promotor hTERT gena metilovan je u 17 (54.8%) od 31 uzoraka tumora.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 36. i Tabeli 36.

**Tabela 34.** Distribucija hTERT polimorfizma

	hTERT polimorfizam			P value
	wt	hetero	mut	
	N (%)	N (%)	N (%)	
<b>pacijenti</b>	28 (51,9%)	22 (40,7%)	4 (7,4%)	<b>0.289</b>

**Tabela 35.** Distribucija hTERT amplifikacije

	<b>hTERT amplifikacija</b>				<b>P value</b>
	<b>no</b>		<b>yes</b>		
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	
<b>pacijenti</b>	25	80,6 %	6	19,4 %	<b>0.083</b>

**Tabela 36.** Distribucija hTERT metilacije

	<b>hTERT metilacija</b>				<b>P value</b>
	<b>ne</b>		<b>da</b>		
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	
<b>pacijenti</b>	14	42,2 %	17	54,8 %	<b>0.108</b>

**Tabela 37.** Distribucija hTERT polimorfizma na nivou jednog nukleotida (SNP), hTERT genske amplifikacije i hTERT metilacije u odnosu na kliničke i patološke parametre kod pacijenata sa RCC

		hTERT polimorfizam				P value	hTERT amplifikacija				P value	hTERT metilacija				P value
		wt		het/mut			ne		da			ne		da		
		N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
Histopatološki tip	pRCC	8	61.	5	38.	0.28	6	85.	1	14.	0.4	5	71.	2	28.	0.047*
			5	5			7	3		4		6				
	ccRCC	1	52.	1	47.		1	84.	3	15.		9	47.	1	52.	
		9	8	7	2		6	2	8	4		0	6			
	chRCC	1	20	4	80	2	3	60	2	40	41	0	0	5	10	0
Stadijum	Low	1	50	1	50	0.77	1	72.	5	27.	0.1	9	50	9	50	0.54
		4		4			3	2	8							
	High	1	53.	1	46.		1	92.	1	7.7		5	38.	8	61.	
		4	8	2	2		7	2	3	62		5	5	2		
Gradus	Low	1	40	1	60	0.046*	1	83.	3	16.	0.6	8	44.	1	55.	0.92
		2		8			5	3	7			4	0	6		
	High	1	66.	8	33.		1	76.	3	23.		6	46.	7	53.	
		6	7	3	6*		0	9	1	56		2	8	5		
Veličina tumora	< 50 mm	1	46.	1	53.	0.41	1	78.		21.	0.7	28.	1	71.	0.09	
		2	2	4	8		1	6	3	4		4	6	0		4
	≥ 50 mm	1	57.	1	42.		1	82.		17.		1	58.			41.
		6	1	2	9		9	4	4	3		6	91	0		8
Preživljavanje	< 38 meseci	1		1		0.57	1	76.		23.	0.6	38.		61.	0.52	
		4	56	1	44		0	9	3	1		5	5	8		5
	≥ 38 meseci	1	48.	1	51.		1	83.		16.						
		4	3	5	7		1	5	3	3		7	56	9		50

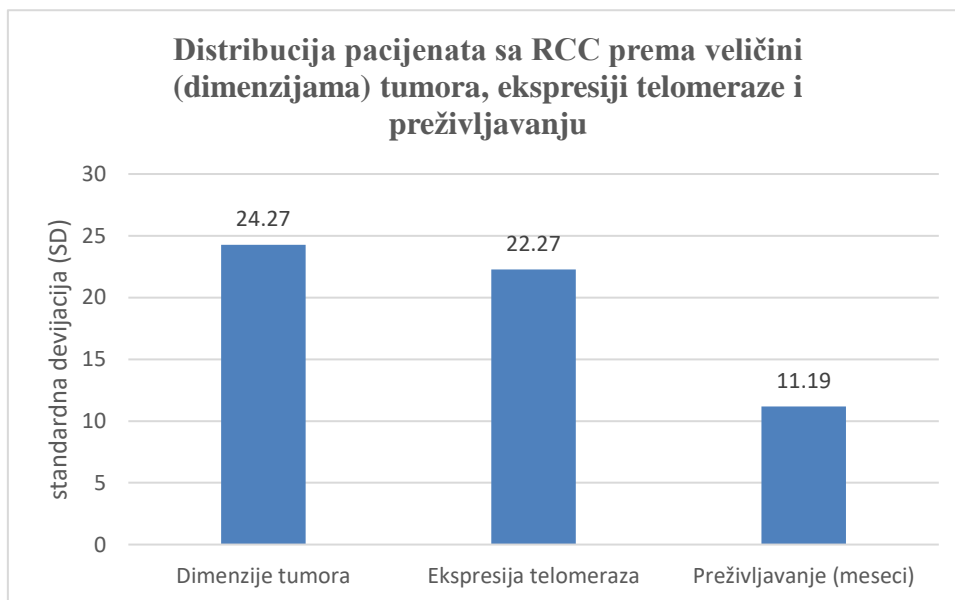


#### 4.2.6. Distribucija pacijenata sa RCC prema veličini (dimenzijama) tumora, procentu ekspresije telomeraze i preživljavanju (u mesecima)

Rezultati distribucije pacijenata sa RCC prema veličini (dimenzijama) tumora, procentu ekspresije telomeraze i preživljavanju, prikazani su u Tabeli 38. i na Grafikonu 51.

**Tabela 38.** Veličina tumora, ekspresija telomeraze i preživljavanje

	N	A.S.	SD	Median
Veličina (dimenzije) tumora (mm)	54	54.24	24.27	50.00
Ekspresija telomeraza (%)	54	23.80	22.27	17.50
Preživljavanje (meseci)	54	36.09	11.19	38.00



**Grafikon 51.** Veličina (dimenzija) tumora, ekspresija telomeraze i preživljavanje

#### 4.2.7. Odnos hTERT polimorfizma i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja (u mesecima).

Istraživanje odnosa hTERT polimorfizma i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja, je pokazalo da **nema statistički značajnih razlika**.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 39.

**Tabela 39.** Odnos hTERT polimorfizma i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja

		hTERT polimorfizam						p vrednost
		N	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Starost pacijenata	wt	28	57.79	10.20	58.50	53.00	63.00	0,575
	hetero	22	59.55	10.93	60.00	54.00	65.00	
	mut	4	65.50	14.98	67.50	53.50	77.50	
Dimenzije tumora	wt	28	53.76	20.43	51.65	38.95	61.75	0,342
	hetero	22	52.80	29.67	47.10	34.30	65.00	
	mut	4	65.55	17.16	69.30	54.30	76.80	
Ekspresija telomeraza	wt	28	26.61	24.12	20.00	7.50	40.00	0,520
	hetero	22	20.00	20.87	12.50	5.00	25.00	
	mut	4	25.00	17.32	20.00	15.00	35.00	
Preživljavanje (meseci)	wt	28	35.86	11.40	37.50	29.00	42.00	0,379
	hetero	22	37.73	10.73	39.00	32.00	45.00	
	mut	4	28.75	11.93	26.00	20.00	37.50	

#### 4.2.8. Odnos hTERT polimorfizma (mut+hetero) i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja (u mesecima)

Istraživanje odnosa hTERT polimorfizma (mut+hetero) i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja, pokazalo je da **nema statistički značajnih razlika**. Analizirajući deskriptivne parametre, evidentno je da su vrednosti

aritmetičke sredine i medijane vrlo slične u obe grupe.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 40.

**Tabela 40.** Odnos hTERT polimorfizma (mut+hetero) i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja

		hTERT polimorfizam						p vrednos t
		N	A.S.	SD	Media n	Perc. 25	Perc. 75	
Starost	wt	2 8	57.7 9	10.2 0	58.50	53.0 0	63.0 0	0,369
	het/mu t	2 6	60.4 6	11.4 9	60.50	54.0 0	66.0 0	
Dimenzije tumora	wt	2 8	53.7 6	20.4 3	51.65	38.9 5	61.7 5	0,881
	het/mu t	2 6	54.7 7	28.2 3	48.30	35.0 0	70.0 0	
Ekspresija telomeraza	wt	2 8	26.6 1	24.1 2	20.00	7.50	40.0 0	0,427
	het/mu t	2 6	20.7 7	20.1 3	15.00	5.00	25.0 0	
Preživljavanj e (mesece)	wt	2 8	35.8 6	11.4 0	37.50	29.0 0	42.0 0	0,874
	het/mu t	2 6	36.3 5	11.1 7	38.50	29.0 0	45.0 0	

#### 4.2.9. Odnos hTERT amplifikacije i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja (u mesecima)

Istraživanje odnosa hTERT amplifikacije i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja, pokazalo je da, iako se radilo o malim uzorcima, **postoji statistički značajna razlika u ekspresiji telomeraze**, odnosno da pacijenti koji imaju hTERT amplifikaciju imaju gotovo 3x (tri puta) manju ekspresiju telomeraza.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 41.

**Tabela 41.** Odnos hTERT amplifikacije i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja

		hTERT amplifikacija						p vrednost
		N	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Starost	ne	25	61.24	12.11	59.00	55.00	69.00	0,799
	da	6	58.67	9.05	62.00	48.00	64.00	
Dimenzije tumora	ne	25	59.02	25.38	53.30	42.50	70.00	0,721
	da	6	52.18	15.58	51.60	41.60	68.30	
Ekspresija telomeraza	ne	25	27.80	22.69	20.00	10.00	50.00	0,044
	da	6	10.83	12.42	7.50	5.00	10.00	
Preživljavanje (meseći)	ne	25	34.64	13.16	38.00	22.00	41.00	0,516
	da	6	39.17	10.38	40.00	29.00	45.00	

#### 4.2.10. Odnos hTERT metilacije i starosti pacijenata, veličine (dimenzija) tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja ( u mesecima)

Istraživanje odnosa hTERT metilacije i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja, pokazalo je da ni ovde **ne postoji statistički značajna razlika**. Radi se o sličnim vrednostima aritmetičke sredine i medijanama, osim kada je u pitanju ekspresija telomeraze, ali je očigledno da je varijabilitet dosta veliki, što je možda i razlog izostanka statističke značajnosti.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 42.

**Tabela 42.** Odnos hTERT metilacije i starosti pacijenata, veličine tumora, procenta ekspresije telomeraze i preživljavanja

		hTERT metilacija						p vrednost
		N	A.S.	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Starost	ne	14	57.50	12.91	56.00	50.00	62.00	0,157
	da	17	63.41	9.76	63.00	58.00	69.00	
Dimenzije tumora	ne	14	57.98	13.58	59.30	43.30	70.00	0,950
	da	17	57.46	30.11	47.60	39.60	68.30	
Ekspresija telomeraza	ne	14	31.79	24.54	20.00	10.00	55.00	0,128
	da	17	18.53	18.27	10.00	5.00	25.00	
Preživljavanje (meseći)	ne	14	37.64	14.58	38.50	24.00	50.00	0,301
	da	17	33.76	10.95	38.00	27.00	39.00	

#### 4.2.11. Odnos hTERT polimorfizma i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

Istraživanje odnosa hTERT polimorfizma i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola, pokazalo je da se radilo o velikom broju kategorija hTERT polimorfizama pa je i očekivano da se ne dobije statistička značajnost sa ovako malim brojevima.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 43.

**Tabela 43.** Odnos hTERT polimorfizma i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

		hTERT polimorfizam						p vrednost
		wt		hetero		mut		
		N	%	N	%	N	%	
Histopatološki tip tumora	papilarni	8	28.6%	4	18.2%	1	25.0%	0,384
	svetloćelijski	19	67.9%	14	63.6%	3	75.0%	
	hromofobni	1	3.6%	4	18.2%	0	0.0%	
T stadijum tumora	1	9	32.1%	9	40.9%	1	25.0%	1,000
	2	5	17.9%	4	18.2%	0	0.0%	
	3	13	46.4%	9	40.9%	3	75.0%	
	4	1	3.6%	0	0.0%	0	0.0%	
Gradus tumora	1	2	7.1%	2	9.1%	0	0.0%	0,455
	2	10	35.7%	14	63.6%	2	50.0%	
	3	15	53.6%	4	18.2%	2	50.0%	
	4	1	3.6%	2	9.1%	0	0.0%	
Pol	muški	18	64.3%	11	50.0%	2	50.0%	0,632
	ženski	10	35.7%	11	50.0%	2	50.0%	

#### 4.2.12. Odnos hTERT polimorfizma (hetero i mut) i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

Istraživanje odnosa hTERT polimorfizma (hetero i mut) i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola, pokazalo je da se i nakon sažimanja dve kategorije hTERT polimorfizam (hetero i mut), takođe radilo o velikom broju kategorija pa je i očekivano da se ne dobije statistička značajnost sa ovako malim brojevima.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 44.

**Tabela 44.** Odnos hTERT polimorfizma (hetero i mut) i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

		hTERT polimorfizam				p vrednost
		wt		het/mut		
		N	%	N	%	
Histopatološki tip tumora	papilarni	8	28.6%	5	19.2%	0,309
	svetloćelijski	19	67.9%	17	65.4%	
	hromofobni	1	3.6%	4	15.4%	
T stadijum tumora	1	9	32.1%	10	38.5%	0,665
	2	5	17.9%	4	15.4%	
	3	13	46.4%	12	46.2%	
	4	1	3.6%	0	0.0%	
Gradus tumora	1	2	7.1%	2	7.7%	0,261
	2	10	35.7%	16	61.5%	
	3	15	53.6%	6	23.1%	
	4	1	3.6%	2	7.7%	
Pol	muški	18	64.3%	13	50.0%	0,289
	ženski	10	35.7%	13	50.0%	

#### 4.2.13. Odnos hTERT amplifikacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

Istraživanje odnosa hTERT amplifikacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola, pokazalo je da ni ovde **nema značajnih razlika**. Razlike između grupa su samo evidentne kada je u pitanju pol pacijenata, ali i ovde je to **bez statističke značajnosti**.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 45.

**Tabela 45.** Odnos hTERT amplifikacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

		hTERT amplifikacija				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Histološki tip	papilarni	6	24.0%	1	16.7%	0,567
	svetloćelijski	16	64.0%	3	50.0%	
	hromofobni	3	12.0%	2	33.3%	
T stadijum	1	9	36.0%	4	66.7%	0,169
	2	4	16.0%	1	16.7%	
	3	11	44.0%	1	16.7%	
	4	1	4.0%	0	0.0%	
Gradus	1	2	8.0%	0	0.0%	1,000
	2	13	52.0%	3	50.0%	
	3	8	32.0%	3	50.0%	
	4	2	8.0%	0	0.0%	
Pol	muški	14	56.0%	1	16.7%	0,172
	ženski	11	44.0%	5	83.3%	

#### 4.2.14. Odnos hTERT metilacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

Istraživanje odnosa hTERT metilacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola, pokazalo je da je evidentna razlika po histopatološkom tipu tumora, koja je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, kao i razlika po polu pacijenata, ali **bez statističke značajnosti**.

Rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 46.



**Tabela 46.** Odnos hTERT metilacije i histopatološkog tipa tumora, stadijuma tumora, gradusa tumora i pola

		hTERT metilacija				p vrednost
		ne		da		
		N	%	N	%	
Histopatološki tip tumora	papilarni	5	35.7%	2	11.8%	0,063
	svetloćelijski	9	64.3%	10	58.8%	
	hromofobni	0	0.0%	5	29.4%	
T stadijum tumora	1	5	35.7%	8	47.1%	0,857
	2	4	28.6%	1	5.9%	
	3	4	28.6%	8	47.1%	
	4	1	7.1%	0	0.0%	
Gradus tumora	1	1	7.1%	1	5.9%	0,626
	2	7	50.0%	9	52.9%	
	3	4	28.6%	7	41.2%	
	4	2	14.3%	0	0.0%	
Pol	muški	9	64.3%	6	35.3%	0,108
	ženski	5	35.7%	11	64.7%	

## 5. DISKUSIJA

RCC čini oko 2-3% svih karcinoma bubrega kod odraslih osoba oba pola. Najčešće se javlja kod osoba između 60 i 70 godine starosti, češće kod muškaraca nego kod žena (odnos 1,5:1). U poslednje vreme se uočava porast incidence javljanja ovog oboljenja kod osoba oba pola (6-10). Ova pojava se objašnjava korišćenjem imidžing tehnike poput ultrazvuka i kompjuterizovane tomografije kojom se povećala detekcija asimptomatskih bolesnika sa karcinomom bubrega, ali isto tako i etiološkim faktorima rizika koji doprinose njegovoj pojavi kao što su stil života, pušenje, gojaznost, hipertenzija, alkohol, profesionalna izloženost teškim metalima i naftnim derivatima, koji utiču na pojavu ove bolesti (6,11,12,13).

Učestalost RCC je povećana kod ljudi koji imaju hroničnu bubrežnu bolest. Oko 2% karcinoma bubrežnih ćelija vezano je za nasledne sindrome od kojih su najznačajniji Von Hippel-Lindau sindrom (VHL), nasledni papilarni karcinom bubrega, RCC udružen sa hereditarnom leiomiomatozom, Birt-Hogg-Dube sindrom i tuberozna skleroza. (6,13,29,30). Najčešći nasledni sindrom je Von Hippel-Lindau sindrom za čiji su nastanak bitne mutacije VHL i MET gena (6,29,30).

Značajni prognostički faktori kod RCC su lokalizacija tumora, veličina tumora, stadijum tumora, gradus tumora, histopatološki tip tumora, da li je tumor invadirao nadbubrežnu žlezdu, postojanje udaljenih metastaza, prisustvo paraneoplastičnog sindroma i opšte stanje pacijenata. U zavisnosti od prognostičkih faktora pacijenti se svrstavaju u grupe visokog, srednjeg i niskog rizika od kojih u velikoj meri zavisi terapija i prognoza bolesti (6).

U našem istraživanju analiziran je operativni materijal 74 pacijenta, kod kojih je dijagnostikovano RCC. Analiza je obuhvatila distribuciju pacijenata u odnosu na pol, godine starosti, veličinu (dimenzije) tumora, stadijum tumora, nuklearni gradus tumora, histopatološki tip tumora i preživljavanje pacijenata u mesecima.

U analiziranoj grupi pacijenata obolelih od RCC, u odnosu na pol, rezultati našeg istraživanja su pokazali da je registrovana prevalenca RCC iznosila 1,8:1 u korist muškog pola, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje su se bavile istraživanjem distribucija pacijenata obolelih od RCC u odnosu na pol (203,204,205,206,207,208).

U odnosu na godine starosti, pacijenti sa RCC, koji su bili predmet našeg istraživanja, podeljeni su u 4 starosne grupe. Prosečna starost pacijenata analiziranih u našem istraživanju bila je  $59.27 \pm 10.25$  i kretala se u rasponu od 33 do 85. godina. Najmlađi pacijent je imao 33 godine, a najstariji 85 godina. Rezultati istraživanja su pokazali da je najveća učestalost pacijenata obolelih od RCC, njih 48,7%, pripadalo starosnoj grupi preko 61 godine, a najmanje pacijenata, njih 6,8%, pripadalo starosnoj grupi od 31-40 godina starosti. Naši rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima dobijenim od drugih istraživača koji su se bavili istraživanjem distribucije pacijenata obolelih od RCC u odnosu na godine starosti pacijenata (203,204,205,206,208,209).

Analizom rezultata u odnosu na veličinu tumora, naše istraživanje je pokazalo da je najveći broj pacijenata, njih 33,8% imalo tumor veličine 40,1 do 60,0 mm, a najmanji broj pacijenata, njih 2,8%, tumore veličine preko 100,1 mm, što je saglasno sa rezultatima dobijenim u najvećem broju studija koje su se bavile ovim istraživanjem (204,208,210-213).

Stadijum bolesti je način na koji se opisuje gde je tumor smešten, da li se proširio u okolinu zahvaćenog organa i da li se proširio na druge organe u telu i dao udaljene metastaze. Stadijum tumora je na osnovu veličine tumora i obima lokalne invazije najvažniji prognostički pokazatelj. Sistemom TNM, stadijum tumora definiše lokalno proširenje primarnog tumora (T), uključivanje regionalnih limfnih čvorova (N) i prisustvo udaljenih metastaza (M) (214,215). Analizom rezultata u odnosu na stadijum tumora naše istraživanje je pokazalo da je niži stadijum imalo 56,8% pacijenata, a viši stadijum 43,2% pacijenata, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u najvećem broju drugih studija koje su se bavile ovim istraživanjem (204,205,215, 216,217,218,219)

U odnosu na histopatološki tip tumora, svetloćelijski tip RCC čini 70% svih RCC i predstavlja najčešći i najagresivniji histopatološki tip RCC sa najvišom stopom lokalne invazije, metastazama i smrtnošću (6). Prema rezultatima našeg istraživanja, svetloćelijski histopatološki tip RCC imalo je 66,2% pacijenata, papilarni histopatološki tip RCC imalo je 24,3% pacijenata, a hromofobni histopatološki tip RCC imalo je 9,5% pacijenata, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u najvećem broju drugih studija koje su se bavile ovim istraživanjem (203,204,208,214,215).

Analizom rezultata u odnosu na gradus tumora, rezultati našeg istraživanja pokazali su da je 5,4% pacijenata imalo tumor gradusa I, 50% tumor gradusa II, 40,5% tumor gradusa

III i 4,1% pacijenata tumor gradusa IV. Zbog relativno malog broja slučajeva, koji su bili predmet našeg istraživanja, gradusi I i II označeni su kao niži gradus i on je dijagnostikovao kod 55,4% pacijenata, a gradusi III i IV su označeni kao viši gradus i on je dijagnostikovao kod 44,5% pacijenata sa RCC, što je u skladu sa rezultatima u najvećem broju drugih studija koje su se bavile ovim istraživanjem (204,205,217,218,219). Određivanje gradusa tumora je u korelaciji sa ishodom kod svetloćelijskog tipa RCC, dok je za druge histopatološke tipove od manjeg značaja (217). Prema rezultatima našeg istraživanja, kod pacijenata sa RCC, preživljavanje (u mesecima), kretalo se od 11 do 58 meseci ( $37,65 \pm 12,6\%$ ), što je u okvirima rezultata koji su dobijeni u većem broju studija, a koje su se bavile ovim istraživanjem (205,218,219,220).

### **Imunohistohemijska ekspresija ciklina A u RCC**

Dokazano je da proliferacija tumorskih ćelija predstavlja važan prognostički faktor u različitim tipovima malignih tumora, kao i to da se proliferativni indeks koristi za procenu osetljivosti tumorskog tkiva na hemoterapiju. Imunohistohemijska ekspresija ciklina A je jedna od brojnih metoda koje mogu da se koriste u tu svrhu. Ciklin A određuje frakciju tumorskih ćelija u S i G2 fazi ćelijskog ciklusa, a to su kritične tačke za delovanje hemoterapije na tumorske ćelije (221). S obzirom da u literaturi postoje značajne razlike u određivanju graničnih vrednosti imunohistohemijske ekspresije ciklin A (222), u našem istraživanju nije određen „cut off” za ovaj marker. Svaku jedarnu pozitivnost tumorskih ćelija smatrali smo povećanom ekspresijom bez obzira na intenzitet.

U našem istraživanju ekspresija ciklina A kretala se od 0% do 70% pozitivnih ćelija, sa srednjom vrednošću od 18,11 i standardnom devijacijom od 20,92, dok je medijana imala vrednosti od 10,00. Odnos ekspresije ovog markera u odnosu na histopatološki tip RCC pokazao je statističku značajnost, za razliku od ostalih kliničko-patoloških parametara. Naime, pacijenti sa papilarnim RCC imali su veće srednje vrednosti ekspresije ciklina A u odnosu na hromofobni i svetloćelijski RCC.

Slično našim rezultatima, u studiji u kojoj je ispitivan 71 slučaj malignih tumora pluća pokazano je da planocelularni histološki tip tumora pluća ima značajno veću ekspresiju ciklina A u odnosu na adenokarcinome pluća, kao i niži stadijumi tumora (223). *Dobashi*

*Y i saradnici* u svojoj studiji, ukazuju takođe na značajnu povezanost ekspresije ciklina A u odnosu na histološki tip tumora. Navode i da je povećana ekspresija ovog markera bila značajno veća kod tumora sa metastazama u regionalnim limfnim nodusima, ali i kod loše diferentovanih karcinoma bez obzira na histološki tip (224). *Boström P i saradnici* su u svojoj studiji, analizirali ekspresiju ciklina A u karcinomu dojke i ukazali su na statistički značajnu povezanost između povećane ekspresije ciklina A i gradusa tumora (225). Značajnost povećane ekspresije u odnosu na gradus, ali i u odnosu na infiltrativan način rasta, uočena je kod ispitivanih slučajeva urotelijalnog karcinoma (226), kao i kod miksofibrosarkoma (227) i invazivnih karcinoma dojke (228).

Ograničen je i broj studija u literaturi koje ukazuju na prognostički značaj ekspresije ciklina A kod sarkoma (227). U studiji koja obuhvata seriju od 126 mekotkivnih sarkoma, ekspresija ciklina A se pokazala kao značajan prognostički pokazatelj, pri čemu je srednja vrednost ove ekspresije iznosila 11% pozitivnih tumorskih ćelija. Od ispitivanih kliničko-patoloških parametara jedino su gradus tumora i lokalizacija korelirali sa visokom ekspresijom ciklina A. Tumori su bili većeg gradusa i dublje lokalizacije (222). Kod istog tipa maligniteta ovu ekspresiju je ispitivao i *Engellau J.* u svojoj studiji. On je analizirao ukupno 140 različitih histoloških tipova sarkoma i prikazao da je kod 60% tumora bila povećana imunoreaktivnost ciklina A. Ova povećana imunoreaktivnost je bila u značajnoj meri u korelaciji sa pojavom lokalnih recidiva, kao i sa tumorima kod kojih postoje genetske abnormalnosti (pozitivni fuzioni status) (227).

U literaturi je nađeno da su mnogi autori analizirali uticaj ekspresije ciklina A na preživljavanje pacijenata sa tumorima različitog fenotipa. U većini tih slučajeva visoka ekspresija ovog markera povezana je sa lošim prognostičkim faktorima. Tako je i uočeno smanjeno ukupno preživljavanje kod karcinoma dojke (225,228), nesitnoćelijskog karcinoma pluća (224), karcinoma prelaznog epitela (226), kao i kod sarkoma (222). Suprotno ovim rezultatima, u literaturi postoje dokazi da je niska ekspresija ciklina A povezna sa lošijim preživljavanjem što je prikazano kod obolelih od karcinoma ovarijuma (229) i non-Hodgkin limfomim (230).

U našem istraživanju, ciklin A je imao prognostički značaj, a što je u saglasnosti i sa radovima nekih autora (223-230).

*Engellau J.* u svojoj studiji nije pokazao značaj povećane ekspresije ovog proteina kao nezavisnog prognostičkog parametra kod 61 slučaja miksofibrosarkoma sa „cut off-om”

od >10% pozitivnih ćelija, u multivarijantnoj analizi (227). Isto tako i *Naguchi T i saradnici* nisu našli povezanost između ukupnog preživljavanja pacijenata sa leiomiosarkomom i ekspresije ciklina A (231), kao ni autori koji su ekspresiju istog markera ispitivali na nesitnoćelijskom karcinomima pluća (223,232,233).

Različiti rezultati mogu biti posledica nedostatka konsenzusa u vezi sa metodologijom procene ekspresije ciklina A, a naročito pri definisanju „cut off” vrednosti za visok/nizak proliferativni indeks u tumorskim ćelijama. Neke od ranijih studija su za graničnu vrednost postavljali srednju vrednost ekspresije za celu kohortnu studiju. Drugi autori su procenjivali ekspresiju semikvantitativno pa su rezultat podelili u kvartile, pri čemu je „cut off” vrednost bila ona koja je prevazilazila ekspresiju ovog proteina u normalnom tkivu (233).

### **Imunohistohemijska ekspresija Ki67 u RCC**

U našem istraživanju ekspresija Ki67 kretala se od 0% do 30% pozitivnih ćelija sa srednjom vrednošću od 6,68 i standardnom devijacijom od 8,16, dok je medijana imala vrednosti od 2,00.

Odnos ekspresije ovog markera u odnosu na histopatološki tip RCC pokazao je statističku značajnost, odnosno između papilarnog histopatološkog tipa RCC i preostala dva analizirana histopatološka tipa. Razlika po nuklearnom gradusu je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05, pa je treba uzeti u razmatranje jer je moguće da bi se većim uzorkom dobila značaja razlika. Ostale razlike i korelacije nisu statistički značajane.

Imunohistohemijsko bojenje antitelom Ki-67 (klon MIB-1) predstavlja neizostavni deo svakodnevne rutinske prakse u patologiji. Ki-67 je izražen u proliferativnim ćelijama u kasnim G1, S, G2 i M fazama, ali ne i ćelijama koje miruju u G0 fazi. Bojenje je uobičajeno nuklearno-jedarno ili perinuklearno. Bojenje je nuklearno i može biti ili difuzno ili granulirano ili kombinovano. Postoje dobre korelacije između imunoreaktivnosti pomoću monoklonskih Ki-67 u smrznutim preparatima, poliklonalna antitela u parafinskih blokovima i ostali indeksi proliferacije ćelija (234).

U studiji *Jovanović MP i saradnika* u kojoj su ispitivani novodijagnostikovani bolesnici sa difuznim B-limfomom (DBKL) koji su lečeni imunoterapijom, imali su duge remisije i bolje ukupno preživljavanje. Otkrivani su bolesnici sa visokim rizikom kojima je

primena efikasnijeg terapijskog pristupa mogla pomoći. Tu je bilo 50 novodijagnostikovanih pacijenata sa DBKL lečenih protokolom CHOP/R-CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon sa ili bez rituksimaba). Analizirana je ekspresija Ki67 i bcl-2 u trenutku postavljanja dijagnoze, uključujući i kliničke parametre: internacionalni prognozni indeks (IPI), voluminozna tumorska masa, ektranodalna lokalizacija bolesti, nivo laktat-dehidrogenaze. Njihova značajnost tretirana je u odnosu na terapijski odgovor i ukupno preživljavanje. Univalentna analiza preživljavanja pokazala je da visok IPI ima statistički značajan negativan uticaj na *event-free survival* i ukupno preživljavanje (*logrank* test,  $p < 0,01$ ). Analiza *logrank* testom pokazala je da bolesnici sa DBKL koji su imali visok proliferativni indeks ( $Ki67 > 60\%$ ), imaju lošije ukupno preživljavanje u odnosu na one sa niskom proliferacijom ( $Ki67 < 60\%$ ) ( $40\%:80\%$ ,  $p < 0,01$ ). Multivarijantna analiza izvedena prema Koksovom modelu pokazala je da  $IPI > 3$ , visoka Ki67 i bcl-2 pozitivnost, imaju značaj nezavisne prognostičke varijable u pogledu ukupnog preživljavanja ( $p < 0,05$ ). Visoka vrednost IPI u trenutku postavljanja dijagnoze, udružena sa visokim vrednostima Ki67 i bcl-2+ potencijalno mogu predstavljati faktore lošije prognoze koji mogu pomoći u otkrivanju visokorizičnih bolesnika sa DBKL dijagnozom (235).

U studiji *Marković O i saradnika* u kojoj su opisana ispitivanja proliferativne aktivnosti mijelomskih ćelija i njene povezanosti sa kliničko-histološkim parametrima i prognozom kod 59 bolesnika sa novootkrivenim multiplim mijelomom (MM). Proliferativna aktivnost je određena imunohistohemijskom metodom na parafinskim isečcima kostne srži uz korišćenje Ki67 kao primarnog antitela. Proliferativni indeks je određen prema modifikovanim kriterijumima *Laia i saradnika* i definisan kao nizak u slučaju kada je procenat Ki67 bio manji od 10%, a intermedijaran/visok ukoliko je procenat Ki67 bio jednak ili veći od 10% (235). Procenat Ki67 mijelomskih ćelija se kretao u opsegu od 1 do 36% (medijana 7%). Kod 39 bolesnika (66,1%) procenat proliferativnih ćelija je bio manji od 10%, a kod 20 bolesnika (33,9%) je registrovano više ili jednako 10% Ki67 ćelija. Bolesnici sa povećanom proliferativnom aktivnošću ( $Ki67$  ćelija  $> 10\%$ ) su imali značajno kraće preživljavanje, nego oni sa niskom proliferativnom aktivnošću (14 meseci naspram 36 meseci,  $p = 0,023$ ). Međutim, proliferativna aktivnost se nije pokazala kao prognostički nezavistan parametar u multivarijantnoj analizi, što je protumačeno visoko

značajnom povezanošću morfologije mijelomskih ćelija i stepena infiltracije kostne srži sa jedne strane i proliferativne aktivnosti sa druge strane (236).

*Kramer E i saradnici* u svojoj studiji analizirali su karcinom bazalnih ćelija (BCC) koji je jedan od najpoznatijih maligniteta kod ljudi. Postoji više faktora koji su u vezi sa biološkim ponašanjem ovih tumora, uključujući histopatološki tip, dubinu i tumorsku invaziju, perineuralnu invaziju i ekspresiju više bioloških markera, uključujući i Ki67 kao proliferativni marker. Prethodna istraživanja odnosa između proliferativnog indeksa izraženog pomoću Ki67 i histoloških varijeteta BCC, kao i njegove povezanosti sa tendencijom da se ponovo pojavi, nisu pokazala značajnu statističku korelaciju. U ovoj retrospektivnoj studiji analiziran je 51 pacijent sa BCC. Za svakog pacijenta su analizirani demografski podaci, pol i godine, anatomska lokalizacija tumora, veličina lezije, kliničko praćenje. Svaka lezija je bojena imunohistohemijski sa Ki67 antigenom (MIB-1) i za svaki je određen proliferativni indeks. Histološke analize su vršene da bi se dobili sledeći podaci: prisustvo ulceracije, intezitet inflamatornog infiltrata, histološkog podtipa, broj mitozu u vidnom polju, i prisustva perineuralne invazije. BCC je pokazao visok stepen varijacija u proliferativnom indeksu, u rasponu od 1% do 61% (medijana 12,3%) među različitim histološkim tipovima. Nizak proliferativni indeks nađen je kod benignih tumora ili biološki tihih („biological silent“), kao što je karcinoid (237). Viši proliferativni indeks ukazuje na veći malignitet (238). Ovakav širok spektar proliferativne aktivnosti ukazuje na činjenicu da BCC pokazuje širok spektar biološke aktivnosti (237).

Značajna statistička korelacija je primećena između proliferativnog indeksa i mitotske aktivnosti, tumorske ulceracije i brisk-tumor-infiltrating limfocita. Ovako široka varijacija u stepenu proliferacije (od neaktivnih do visoko proliferativnih tumora) ukazuje da BCC ispoljava širok spektar bioloških karakteristika. Ulcerativne lezije se karakterišu visokim proliferativnim indeksom. Nema prave korelacije između proliferativnog indeksa i agresivnog histološkog podtipa, što znači da su drugi faktori biološki značajniji. Stepenu proliferacije takođe pokazuje značajnu statističku korelaciju sa stepenom tumorske limfocitne infiltracije (237).

U studiji *Rao S i saradnika*, kod meningioma su procenjivali ekspresiju proliferativnog indeksa i p53 antigena i to se koreliralo sa histološkim gradusom i kliničkom tokom. Analizirano je 123 slučajeva meningioma, dijagnostikovanih od januara 2000. do avgusta 2007. Imunohistohemijsko bojenje na Ki67 i p53 protein urađeno je kod 68 slučajeva koji



su izabrani za studiju. 6 od 68 slučajeva je prezentovano kao slučajevi sa recidivom. Medijana za Ki67 (prognostički indeks) bila je 3,8%, 13,7%, 19,4% za graduse I, II i III, i 8,6% za slučajeve sa recidivom. Multivarijantnom analizom medijane Ki67 pokazana je statistički značajna razlika između podgrupa. Neki od meningioma pokazivali su visok Ki67 samo u glavnim delovima tumora. Značaj markera proliferacije u kombinaciji sa histopatološkim osobenostima pomažu u identifikaciji podtipova biološke agresivne morfologije benignih meningioma (239).

U studiji *Jadali F i saradnika* je kod meduloblastoma određivan procenat Ki67 pozitivnih ćelija koji odražava proliferaciju ćelija i predstavlja jedan je od kritičnih faktora koji determinišu rast tumora. Monoklonalno MIB-1 antitelo je posmatrano u odnosu na rekombinovani Ki67 i onda predstavljeno imunohistohemijskim metodama. 18 pedijatrijskih pacijenata sa meduloblastomom, od januara 2003. do decembra 2008. godine su podvrgnuti Ki67 (MIB-1) imunohistohemijskim analizama. Proliferativni indeks se koristio u tumorskim ćelijama da determiniše obim proliferacije. Srednja vrednost MIB-1 je bila  $53\% \pm 21\%$  (odnos od 25% do 85%,  $SD=21\%$ ). Pacijenti sa MIB-1 vrednostima od 25% do 85% imali su verovatnoću preživljavanja od 44% na godišnjem nivou. Svi pacijenti sa MIB-1 nižim od 53% bili su živi na kraju praćenja. Pacijenti sa MIB-1 višim od 53% pokazivali su verovatnoću preživljavanja od 33% na godišnjem nivou. U ovoj studiji je predloženo da MIB-1 da bude korišćen kao pomoćni prognostički faktor u predviđanju preživljavanja pacijenata sa pedijatrijskim meduloblastomom (240).

*Meurer RT i saradnici* su u svojoj studiji ispitivali imunohistohemjsku ekspresiju Ki67, NeuN, synaptophysin, HER2 i p53 kod 40 pacijenata sa meduloblastomom i njihovu korelaciju sa kliničko-patološkim parametrima i preživljavanjem. Kod 29 pacijenata (72,5%), preko 20% ( $>20\%$ ) ćelija je bilo Ki67 pozitivno. Kod muškaraca je bila prisutna veća Ki67 ekspresija ( $p=0,02$ ) i manja stopa preživljavanja (241).

U studiji *Viswanathan V i saradnika* analizirane su oralne skvamozne ćelijske lezije, kao najčešće dijagnostikovane lezije u Indiji, a sa njima su često zajedno prisutne i premaligne i maligne lezije. U ovoj studiji ispitivali su ulogu i značaj apoptotičkog indeksa (AI) i proliferativnog indeksa (PI) u premaligim i malignim skvamoznim ćelijskim lezijama usne duplje. Analizirane su 62 histološki dokazane premaligne i maligne oralne skvamozne ćelijske lezije. Biopsije su bojene Hematoksin-Eozinom (HE) i takođe monoklonalnim Ki67 antitelom. Proliferativne ćelije su se identifikovale po njihovoj

Ki67 ekspresiji. Antitelo Ki67 prepoznaje antigen što je u vezi sa nuklearnom komponentom ćelije. AI i PI su ocenjeni korišćenjem svetlosnog mikroskopa. AI je utvrdio da se postepeno povećanje razvija od normalnog preko displazije do karcinoma. Najveći AI je zapažen kod dobro diferentovanog skvamoznog ćelijskog karcinoma (SCCs). Pomoću PI je takođe utvrđeno da se postepeno povećanje razvija značajno od normalnog preko displazije do karcinoma. Najveći PI zapažen je kod loše diferentovanog skvamoznog ćelijskog karcinoma (SCCs). AI u vezi sa PI nudi tačnu predstavu o prirodi i toku lezije i može pomoći da se planira blagovremena hirurška intervencija koja rezultira boljom kliničkom prognozom i ishodom. PI je determinisan brojanjem ukupnog broja Ki67 pozitivnih ćelija na 3000 ćelija i predstavlja se u procentima (242).

Cilj studije *Nabi U i saradnika* bio je da se proceni odnos histološkog tipa, gradusa i statusa kolorektalnog karcinoma sa proliferativnom aktivnošću merenom pomoću Ki67 proliferativnog indeksa. Ova deskriptivna studija je sprovedena na Univerzitetu u Lahori. U ovoj studiji, Ki67 je izražavan kod 50 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, a posmatran je korišćenjem imunohistohemijskim monoklonalnim antitelom MIB-1.

Što se tiče veze između medijane Ki67 proliferativnog indeksa i gradusa kolorektalnog karcinoma, Ki67 proliferativni indeks je bio visok u 10 slučajeva dobro diferentovanog adenokarcinoma (grade I) (medijana Ki67 bila je  $392,50 \pm 56,58$ ) i 29 slučajeva srednje diferentovanog adenokarcinoma (grade II) (medijana Ki67 bila je  $342,24 \pm 96,84$ ) i 11 slučajeva slabo diferentovanog adenokarcinoma (grade III) (medijana Ki67 bila je  $250,00 \pm 113,46$ ). Značajna razlika uočena je između Ki67 proliferativnog indeksa i gradusa kolorektalnog karcinoma ( $p=0,004$ ).

Veza između medijane Ki67 proliferativnog indeksa i različitih histoloških tipova kolorektalnog karcinoma pokazuje da je medijana Ki67 bila  $393,93 \pm 55,91$  kod 33 slučajeva ne-mucinoznog adenokarcinoma; dok je kod 10 slučajeva mucinoznog adenokarcinoma bila  $220,00 \pm 49,72$ , kao i  $200,00 \pm 79,05$  kod 7 slučajeva „signet-ring cell“ adenokarcinoma. Značajna razlika je uočena između Ki67 proliferativnog indeksa i histoloških tipova kolorektalnog karcinoma ( $p=0,000$ ). Značajna razlika Ki67 proliferativnog indeksa nađena je između mucinoznog i „signet-ring cell“ adenokarcinoma ( $393,93 \pm 55,91$  vs  $200,00 \pm 79,05$ ) ( $p=0,000$ ). Nije uočena značajna razlika u srednjoj vrednosti Ki67 između mucinoznog i „signet-ring cell“ adenokarcinoma ( $220,00 \pm 49,72$  vs  $200,00 \pm 79,05$ ) ( $p=0,767$ ). Što se tiče veze između

srednje vrednosti Ki67 proliferativnog indeksa i stadijuma po Dukes kolorektalnog karcinoma, izračunato je da je srednja vrednost Ki67 bila  $360,13 \pm 90,03$  i  $241,66 \pm 101,31$  u Dukes stadijumima B, odnosno C. Značajna razlika je uočena između Ki67 proliferativnog indeksa i Dukes stadijuma B i C kolorektalnog karcinoma ( $p=0,001$ ). Što se tiče određivanja stadijuma po Dukes-u, Ki67 proliferativni indeks bio je viši u kolorektalnom karcinomu kod Dukes stadijuma B, nego kod karcinoma koji su odgovarali Dukes stadijumu C (srednja vrednost Ki67 Dukes stadijum B:  $360,13 \pm 90,03$  vs Dukes stadijum C:  $241,66 \pm 101,31$ ).

Samo je 1 slučaj odgovarao Dukes stadijumu A, i njegova srednja vrednost Ki67 nije se računala. Prolifertativna aktivnost merena pomoću Ki67 antitelom povezana je sa histološkim tipom, gradusom i stadijumom (243).

Prema studiji *Park D i saradnika*, proliferativna aktivnost tumorskih ćelija koja se ocenjivala imunohistohemijskom Ki67 ekspresijom jedan je od više prognostičkih indikatora kod karcinoma dojke. Glavni cilj ove studije je bio je da istraži uticaj Ki67 proliferativne aktivnosti u metastazama u aksilarnom limfnom čvoru i u odgovarajućem primarnom karcinomu dojke kod 194 pacijenata. Postojala je statistički značajna regulacija Ki67 proteina u metastatskim depozitima u poređenju sa tim gde je primarni tumor nađen ( $p=0,001$ ). Nizak Ki67 indeks na oba mesta, primarni tumor i metastatski tumor, bio je povoljan prognostički faktor. Visok indeks na oba mesta, primarna i metastatska lezija, i regulacija od niskog indeksa kod primarnog tumora ka visokom indeksu u metastatskim depozitima, predstavlja nepovoljni prognostički faktor. Srednja vrednost procenta pozitivnih ćelija bila je 11,4% u primarnom tumoru dojke i 18,1% u metastazama. Ekspresija Ki67 u primarnim tumorima i u metastazama u korelaciji je sa višim histološkim gradusom (sve Ki67 cut-off vrednosti,  $p < 0,001$ ) i sa negativnim ER/PgR statusom ( $p=0,05 \sim p < 0,001$ ). Nije nađena korelacija sa starosnom dobi, vrstom karcinoma, veličinom tumora ili brojem uključenih limfnih nodusa. Sve cut-off vrednosti za Ki67 ekspresiju u metastazama u aksilarnom limfnom čvoru u korelaciji su sa veličinom metastaza. Multivarijantne analize pokazale su da je ekspresija Ki67 u metastazama bila veoma značajan nezavisni prognostički faktor kliničkog ishoda u poređenju sa primarnim tumorom. Ekspresija Ki67 u 10% ćelija karcinoma u primarnim tumorima i 15% u nodalnim metastazama po svemu sudeći predstavlja optimalnu cut-off vrednost. Ki67 je značajan kao nezavisni prognostički faktor u karcinomu dojke. Veliki

broj slučajeva ima sličnu ekspresiju Ki67 u primarnim tumorima (10% cut-off) i njihovim odgovarajućim metastazama (275).

U jednoj studiji slučaja, *Kase S i saradnici* govori se o crevnom gastrointestinalnom stromalnom tumoru (GIST-u) sredovečnog muškarca starog preko 40 godina. Histološki je ličio na drugi tumor detektovan 2 godine posle prve operacije. Primarni GIST bio je dimenzija 5,5x6,0cm, sastavljen od vretenastih ćelija sa većim brojem mitozama i Ki67 je bio oko 20%, nego ćelije drugog tumora, što ukazuje na *de novo* GIST. Primarni tumor je nađen u transverzalnom kolonu, a sekundarni tumor je nađen u ascendentnom kolonu. Oba tumora su dijagnostikovana kao GIST, sa stanovišta kako histopatoloških, tako i imunohistohemijskih nalaza. U primarnom tumoru, nuklearna imunoreaktivnost na Ki67 posmatrana je približno u 20% tumorskih ćelija. S druge strane, samo 5% tumorskih ćelija bilo je pozitivno u sekundarnom tumoru, što je potvrdilo sličan patološki nalaz kao kod primarnog tumora, osim u veličini tumora, mitotskim figurama i Ki67 indeksu (245).

*Nikolić M i saradnici* su u svojoj studiji prikazali slučaj 20-godišnjeg muškarca koji je imao gastrointestinalno krvarenje i anemiju. Endoskopijom gornjeg gastrointestinalnog trakta otkrivena je submukozna lezija, a CT-om je otkriven nodus blizu jetre. EUS-FNA imunohistohemijom nađene su CD-117 pozitivne ćelije koje su ukazivale na GIST i pacijent je bio operisan. Dijagnoza je potvrđena histopatologijom sa imunobojenjem. Prognostička procena je odrađena uzimajući u obzir veličinu tumora i Ki67 indeks sa brojem mitozama u vidnom polju. Makroskopski tumor je bio bledolik pojedinačan čvor. Histološki su preovlađivale ćelije ovalnog oblika, sa relativno malim procentom vretenastih ćelija u muscularis propria i subseroznom sloju. Bilo je retkog mikroskopskog krvarenja bez nekroza, viđeno je 5 mitozama u vidnom polju, a indeks Ki67 bio je 5%. Imunohistohemijski tumor je bio pozitivan na c-kit, CD117, CD34, a negativan na SMA i S100. Histopatološka evaluacija ukazivala je na nisko rizični agresivni GIST. Pacijent je praćen ambulantno tri godine. Rutinskim kliničkim pregledom, pokazalo se da nema dokaza da se bolest vratila, a anemija je rešena upotrebom oralnih suplemenata Fe. Gastroskopija i abdominalni ultrazvuk pokazao je povoljan lokalni postoperativni rezultat. Prognostička procena je urađena uzimajući u obzir veličinu tumora i Ki67 indeks sa brojem mitozama u vidnom polju (246).

*Lebe B i saradnici* su u svojoj studiji opisivali raznovrsne genetske alteracije uključujući inaktivaciju tumor supresornih gena i aktivaciju onkogenih u različitim tipovima

neoplazmi kao i kod mekotkivnih tumora. Svrha njihove studije bila je da se proceni ekspresija mdm2 i p53, kao i Ki67 proliferativne aktivnosti i da se istraže njihovi međusobni odnosi sa kliničko-patološkim parametrima kod fibrocističkih mekotkivnih tumora. Proučavano je 43 pacijenata kod kojih su dijagnostikovani fibrocistički tumori, uključujući 30 fibrocističkih neoplazmi i 13 nediferentovanih pleomorfni sarkoma. Svi isecci su bili bojani na mdm2, p53 antitela i Ki67, primenom standardnog biotin imunoperoksidnog metoda. Nuklearno bojenje je prikazano semikvantitativno za svaki pojedinačni slučaj. Ekspresija p53 i mdm2 je primećena u 47,5% i 20% za sve tumore. Nije nađena povezanost između p53 i mdm2 ekspresije i kliničko-patoloških parametara, a postojala je statistički značajna razlika između fibroblastičnih neoplazmi i nediferentovanih pleomorfni sarkoma u smislu ekspresije p53 i mdm2. Vrednost Ki67 značajno se razlikovala između fibroblastičnih neoplazmi i nediferentovanih pleomorfni sarkoma. Srednja vrednost proliferativnog indeksa kod fibroblastičnih neoplazmi bila je  $12,13 \pm 5,26$ , a kod nediferentovanih pleomorfni sarkoma bila je  $51,25 \pm 20,96$ . Postojala je statistički značajna razlika između fibroblastičnih neoplazmi i nediferentovanih pleomorfni sarkoma u smislu srednje vrednosti proliferativnog indeksa ( $p=0,000$ ). Kada je izvršena statistička analiza tumorskih gradusa, srednja vrednost proliferativnog indeksa za gradus 1 ( $n=6$ ), gradus 2 ( $n=9$ ), i gradus 3 ( $n=3$ ) bila je:  $10,00 \pm 2,75$ ,  $53,77 \pm 18,64$  i  $59,33 \pm 10,59$ , ovim redom. Srednja vrednost proliferativnog indeksa tumora bila je značajno drugačija između različitih tumorskih gradusa. Srednja vrednost proliferativnog indeksa gradusa 1 tumora bila je značajno niža nego kod gradusa 2 i gradusa 3 tumora ( $p=0,000$ ). Međutim nije nađena značajna razlika između tumora gradusa 2 i gradusa 3 u smislu proliferativnog indeksa. Ekspresija p53 i mdm2 proteina i Ki67 proliferativnog indeksa kod fibrocističkih tumora predstavlja koristan marker za diferencionalnu dijagnozu (247).

Studija *Tiwari E i saradnika* sprovedena je s ciljem da ukaže na prednosti imunohistohemije, što uključuje ne samo njenu izuzetnu osetljivost i specifičnost, već i njenu promenljivost u rutinskom formalinskom fiksiranju materijala. Pacijentima iz studije uzete su endoskopske biopsije gastričnih lezija. Sve ove biopsije su bojene imunohistohemijski. Studija je obuhvatila 30 gastričnih endoskopskih biopsija. Benignih lezija je bilo 10 (33,3%), a malignih je bilo 20 (66,6%). Relativna incidenca bila je 10,2%. Sve endoskopske biopsije su obrađene imunohistohemijski na p53 i Ki67. Značajni

zaključci pokazali su pozitivne vrednosti p53 i Ki67 u samo 30% benignih gastričnih tumora. Međutim, interesantno je bilo zapaziti da su maligni gastrični tumori bili visoko pozitivni na p53 (80%), a Ki67 imao je jako visoko pozitivan indeks (85%). Senzitivnost i specifičnost p53 kod gastričnih karcinoma iznosili su 80%, odnosno 70%. Senzitivnost i specifičnost Ki67 kod gastričnih karcinoma bio je 85%, odnosno 70%. Većina gastrointestinalnih tumora mogu se razlikovati po njihovom imunohistohemijskom profilu. P53 i Ki67 pokazivali su mnogo više pozitivnosti u slučajevima malignih gastričnih tumora (248).

U studiji *Al Khafaji B. i saradnika* proučavani su različiti gastrointestinalni neuroendokrini tumori. Proliferativni indeks Ki67 je bio <1% u 50% slučajeva, 1-10% u 43% slučajeva i 10-50% kod „atipičnih“ neuroendokrinih tumora. Ovde su dobijeni nažalost samo semikvantitativni rezultati i kriterijumi za pozitivnost (249).

*Lee CH i saradnici* su u svojoj studiji proučavali 245 slučajeva leiomiosarkoma (102 ginekološka) sa podacima o preživljavanju, i 49 slučajeva leiomiosarkoma uterusa. Ispitivali su sposobnost odabranog imuno markera (ER i WT1) da napravi razliku između ginekoloških leiomiosarkoma i leiomiosarkoma drugog porekla. Pored toga, ispitali su da li se bojenje na p16, p53 i Ki67 može koristiti za razlikovanje malignog od benignog tumora glatkih mišića. Nuklearno pozitivne vrednosti ER zapažene su u 3% i 50% neginekoloških i ginekoloških leiomiosarkoma, odnosno ( $p < 0,001$ ). Nuklearno pozitivne vrednosti WT1 zapažene su u 0% i 8% neginekoloških i ginekoloških leiomiosarkoma, odnosno ( $p < 0,001$ ). 87% primarnih ginekoloških leiomiosarkoma i 2% leiomiosarkoma uterusa pokazivali su difuznu p16 obojenost ( $\geq 50\%$  ćelija), ( $p < 0,001$ ). 23% ginekoloških leiomiosarkoma pokazivali su p53 imunopozitivnost ( $\geq 50\%$  ćelija), a nijedan od leiomioma nije bio pozitivan na p53 ( $p < 0,001$ ). Difuzna p16 i p53 imunopozitivnost i visok Ki67 proliferativni indeks, pojedinačno ili u kombinaciji, ukazivali su na opštu senzitivnost od 92% i specifičnost od 98% za razlikovanje između ginekoloških leiomiosarkoma i leiomioma i mogli su da se koriste kao indikator maligniteta za ginekološke glatkomišićne tumore. Ki67 imunobojenje je procenjeno kako vizuelnom, tako i automatskom metodom. Pozitivno Ki67 bojenje primećeno je u 64% primarnih ginekoloških leiomiosarkoma i 0% kod leiomioma uterusa ( $p < 0,001$ ), što je dobijeno automatskom analizom. Vizuelna analiza je dala skoro identične rezultate tako što je pozitivno Ki67 bojenje zapaženo u 65% primarnih ginekoloških leiomiosarkoma i 0% u

leiomioma uterusa ( $p < 0,001$ ). Pozitivnost sa najmanje jednim od p16, p53 ili Ki67 imunomarkera viđena je u 81 od 88 (92%) ginekoloških leiomiosarkoma (senzitivnost 92%, specifičnost 98%). Takođe, pozitivne vrednosti ER pomogle su da se odredi ginekološko poreklo leiomiosarkoma, a nuklerano WT1 bojenje je bilo od velike koristi (250).

### **Imunohistohemijaska ekspresija telomeraze u RCC**

U našem istraživanju ekspresija telomeraze kretala se od 0% do 80% pozitivnih ćelija, sa srednjom vrednošću od 24,93 i standardnom devijacijom od 22,73 dok je medijana imala vrednosti od 20,00.

U grupi pacijenata sa RCC koju smo mi analizirali, ispitivanja imunohistohemijske ekspresije telomeraze su pokazala da su vrednosti ekspresije telomeraze vrlo slične kada je u pitanju pol pacijenata, nuklearni gradus tumora i stadijum tumora. Jedino je evidentna razlika između histopatoloških tipova tumora i to u korist papilarnog histopatološkog tipa kod koga je ekspresija telomeraze drastično veća od ostala dva histopatološka tipa tumora. Korelacionom analizom nije pronađena povezanost između ekspresije telomeraze, starosti pacijenata, veličine tumora i preživljavanja pacijenata.

Aktivnost telomeraze primarno je regulisana na nivou transkripcije katalitičke podjedinice (hTERT) (251,252). Poznato je da tumor supresorski gen p53 snižava ekspresiju katalitičke podjedinice hTERT smanjujući proliferacijsko stanje ćelije, dok c-myc aktivira transkripciju katalitičke podjedinice hTERT vežući se direktno za promotorsku regiju (251,253-255).

Telomeraza je ribonukleoproteinski enzim koji sintetiše telomere posle svake ćelijske deobe i tako održava dužinu i stabilnost hromozoma. Aktivnost telomeraze prisutna je u reproduktivnim ćelijama, tkivima sa brzom proliferacijom ćelija, besmrtnim ćelijama i ćelijama karcinoma, ali nije prisutna u normalnim diferenciranim somatskim ćelijama. Telomerazna aktivnost u malignoj progresiji, verovatno odlaže odlazak ćelije u mirovanje, što ima za posledicu nakupljanje multiplih genskih promena u malignoj ćeliji. Aktivnost telomeraze prisutna je u više od 80% malignih tumora različite lokalizacije kao što su pluća, dojka, pankreas, žučni putevi, želudac i drugi (252).

Telomeraza u tumorskoj ćeliji ima ulogu u održavanju hromozomske stabilnosti i kapaciteta neograničenog deljenja tumorskih ćelija odnosno besmrtnosti tumorske ćelije. Prisutnost telomerazne aktivnosti u tkivima može biti ispitivana na različite načine. Prisutnost gena katalitičke proteinske podjedinice i kalupa RNA može se određivati pomoću RT-PCR ili tehnikama *in situ* hibridizacije (256).

U većini studija koje su rađene ovim tehnikama aktivnost telomeraze bila je prisutna u 80-90% kod karcinoma dojke. Aktivnost telomeraze nije pronađena u benignim promenama, kao ni u zdravom tkivu dojke u većini studija. Neki autori u svojim studijama su pokazali prisutnu aktivnost telomeraze u 43-50% fibrocističnih promena i fibroadenoma (257). Aktivnost telomeraze prisutna je u normalnim tkivima dojke tokom luteinske faze, ali ne i za vreme folikulske faze menstrualnog ciklusa, a to govori u prilog da telomerazna aktivnost može biti regulisana i u normalnom tkivu dojke. Različite studije pokazale su različitu povezanost između aktivnosti telomeraze i patohistoloških pokazatelja karcinoma dojke (257).

*Rha SY i saradnici* su u jednoj studiji našli da je aktivnost telomeraze u tkivu karcinoma dojke povezana s metastazama u limfnim čvorovima, ali ne i s veličinom tumora i sadržajem ER i PR receptora (258,259), dok su *Hoos A i saradnici* su svojoj studiji, pokazali značajnu povezanost između telomerazne aktivnosti i veličine tumora, metastaza u limfnim čvorovima i stadijuma bolesti (260).

U studiji *Papadopoulou A i saradnika* nije nađena povezanost između telomerazne aktivnosti i kliničko-patoloških parametara kod karcinoma dojke (261). Karcinomi dojke u kojima nije prisutna aktivnost telomeraze imaju učestalije hromozomske promene u odnosu na one karcinome u kojima je prisutna aktivnost telomeraze. Svi ovi rezultati pokazuju da je aktivnost telomeraze verovatno povezana s agresivnošću bolesti (262).

Određivanje aktivnosti telomeraze u tumorskom tkivu može biti značajno i za određivanje terapije maligne bolesti. Mogući su terapijski postupci koji uključuju potiskivanje aktivnosti telomeraze. U terapiji tumora mogu biti uključeni antisens oligonukleotidi za RNA kalup, dominantno negativna proteinska podjedinica telomeraze, analozi nukleotida, polifenoli kao i mali inhibitorni molekuli (263-265).

U terapiji se takođe mogu koristiti promotori telomeraze (aktivni u karcinomima) (266,267), a koji mogu biti cilj genske terapije ili onkogeni virusi za tumore. Za inhibiciju telomerazne aktivnosti razvijena su i monoklonska antitela koja su specifična za hTERT,



a koja ne prepoznaju hTERT u nativnim ćelijama, već samo deluju na aktivnost telomeraze. Rezultati terapije rađeni su uglavnom *in vitro* probama, tako da dalja istraživanja treba da obuhvataju i *in vivo* ispitivanja (210,211).

Međutim i potencijalno prisustvo aktivnosti telomeraze u normalnim tkivima i visoko proliferacijskim tkivima može biti problem specifičnosti ove terapije. U nekim studijama pokazana je povezanost aktivnosti telomeraze u tumorskom tkivu i odgovora na hemoterapiju (210,212,213).

U ćelijskim kulturama kod ezofagealnog karcinoma pokazana je veća osetljivost onih ćelija na terapiju cisplatinom kod kojih je bila prisutna aktivnost telomeraze (268).

U *disertaciji Kulić A.* bilo je uključeno 102 uzorka tkiva karcinoma dojke, 40 uzoraka benignih promena tkiva dojke i 20 uzoraka zdravih tkiva dojke koja su se nalazila u Banci tumora na Zavodu za patofiziologiju i znanstveno istraživanje, KBC Rebro Zagreb. U ovoj disertaciji ispitivala se aktivnost telomeraze kod 20 zdravih tkiva dojke, u fibrocističnim promenama tkiva dojke i telomerazna aktivnost nije bila prisutna ni u jednom uzorku, dok je u tkivima dojke sa fibroadenomom aktivnost telomeraze bila negativna. Aktivnost telomeraze u malignim tumorima dojke bila je prisutna u 77 tumora (75,49%), dok u 25 tumora (24,51%) nije bila prisutna aktivnost telomeraze (269).

U *disertaciji Čarkić J.* ispitivana je imunohistohemijska analiza ekspresije telomeraze na 34 uzorka oralnih planocelularnih karcinoma (OPCK). Od 34 uzorka, kod 25 (74%) uzorka je pokazalo ekspresiju telomeraze, od toga 6 (18%) uzoraka nuklearnu, a 19 (56%) uzoraka citoplazmatsku ekspresiju. Za potrebe statističke analize, zbog malog broja uzoraka, nuklearna i citoplazmatska ekspresija spojene su u jednu grupu (pozitivna ekspresija). Ekspresija telomeraze nije bila povezana sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora, osim kod tumora sa recidivom, koji su imali veću ekspresiju ( $p < 0.05$ ;  $\chi^2$  test) (270).

U studiji *Sakurai S i saradnika* pokazano je da je telomerazna aktivnost uočena kod 80-90% karcinoma; prisutna je kod 29% GIST-a i 100% metastaza GIST-a, a korelirala je sa veličinom tumora i izrazito sa proliferacionim indeksom i znak je loše prognoze, a nije korelirala sa p53 pozitivnošću u tumorskim ćelijama (271).

*Sakurai S i saradnici* su pokazali da je telomerazna aktivnost mogla biti značajan pokazatelj malignog potencijala GIST-a, ali i terapijski modus telomeraznim inhibitorima (272).

U studiji *Kovkarova E i saradnika*, analizirana je telomerazna aktivnost kod pacijenata sa karcinomom pluća, kao markera za detekciju karcinoma pluća. Korišćenjem TRAP (telomeric repeat amplification protocol) određena je telomerazna aktivnost u materijalu dobijenom bronhobiopsijom (60 pacijenata sa karcinomom pluća poredilo se sa 20 ispitanika iz kontrolne grupe) i ispirkom dobijenom tehnikom transtorakalne aspiracije tankom iglom koja je izvedena kod 10 bolesnika sa perifernim tumorima pluća. Telomerazna aktivnost je ovde otkrivena u 75% materijala karcinoma pluća, dobijenog bronhobiopsijom i u 100% materijala dobijenog transtorakalnom aspiracijom tankom iglom (273).

U studiji *Segawa N i saradnika*, telomerazna aktivnost je ispitivana kod 23 slučaja RCC, kao i u susednom normalnom tkivu bubrega, gde je procenjena povezanost sa kliničkim i patološkim varijetetima bolesti. Srednja vrednost telomerazne aktivnosti RCC bila je  $(1987,889 \pm 1232,801)$ . Telomerazna aktivnost otkrivena kod RCC ipak nije bila u vezi sa kliničkim i patološkim varijetetima, kao što su klinički stadijum, gradus ili patološki podtip. Rezultati su pokazali da telomeraze mogu da imaju ključnu ulogu u početnoj fazi razvoja RCC, ali ne i u progresiji bolesti (252).

U studiji *Yoshida K i saradnika*, telomerazna aktivnost je kvantifikovana u 50 slučajeva RCC i u 21 slučaju normalnog tkiva bubrega korišćenjem tehnike *fluorescence-based telomeric repeat amplification*. Ona je detektovana kod 28 od 50 slučajeva RCC  $(35,03 \pm 18,47)$ , a nije bilo telomerazne aktivnosti u 21 slučaju normalnog tkiva bubrega. Telomerazna aktivnost klasifikovana kao pT4 i bila je značajno veća nego u tumorima klasifikovanim kao pT1 i pT3. Telomerazna aktivnost bila je takođe u korelaciji sa godinama pacijenta. Rasla je kod slučajeva sa RCC u poređenju sa normalnim tkivom bubrega. Takođe, značajne veze su uočene između telomerazne aktivnosti i kliničko-patoloških parametara, a dalja istraživanja su bila potrebna kako bi se odredili efekti telomerazne aktivnosti bioloških i kliničkih ponašanja RCC (274).

U studiji *Fujioka T i saradnika*, telomerazna aktivnost je ispitivana kod 30 slučajeva sa RCC. I ovde je 18 (60%) slučajeva pokazivalo telomeraznu aktivnost, a nijedan od slučajeva normalnog tkiva bubrega nije pokazao telomeraznu aktivnost. Podela tumora na osnovu telomerazne aktivnosti nije pokazivala vidljivu razliku u distribuciji u odnosu na veličinu tumora, histocitološki podtip, ili DNA-ploidiju. Međutim, utvrđen je statistički značajan odnos između učestalosti telomerazno pozitivne aktivnosti, sa jedne

strane, i nivoa imunosupresivnih kiselih proteina u serumu kod pacijenta i tumorskog gradusa ( $p < 0,05$ ). Nije bilo značajne razlike preživljavanju kod pacijenata kod kojih nije bilo recidiva i onih sa pozitivnom i negativnom telomeraznom aktivnošću (275).

U uzastopnim serijama od 245 pacijenata sa RCC, u studiji *Schlichter A i saradnika*, svi uzorci sa nefrektomijom su ispitivani u smislu prisustva dodatnih multifokalnih lezija. Zato su sečenja vršena na 3 mm i uzorci su analizirani mikroskopskim i histopatološkim pregledima. Ovim postupkom je nađeno 26 multifokalnih tumora kod 19 uzoraka. Da bi se detaljnije okarakterisala biološka aktivnost ovih multifokalnih lezija, analizirana je njihova telomerazna aktivnost. 14 od 23 istraženih multifokalnih tumora (60,9%) pokazuje telomeraznu aktivnost. U 3 slučaja isecci tkiva bili su isuviše mali za dalja istraživanja. Telomerazna aktivnost je takođe otkrivena u 10 od 15 (66,7%) uparenih primarnih RCC. S druge strane, celokupno odgovarajuće normalno tkivo bubrežnog korteksa, korišćeno kao kontrolni materijal bilo je telomerazno negativno. Na osnovu ovih rezultata je zaključeno da može očekivati da male tumorske lezije RCC imaju maligni potencijal sličan onima kod primarnih karcinoma (276).

Prema studiji *Trbojević B. i saradnika* postoje brojni markeri za dijagnostikovanje maligniteta tiroidne žlezde. Među njima je i aktivnost telomeraze. Procena aktivnosti telomeraza u tiroidei otkriva defekte telomeraze u 14-38% folikularnih adenoma i u 75% folikularnih karcinoma. Studija je pokazala da ispitivanje telomeraze nije dostiglo stepen senzitivnosti koju ima procena tiroperoksidaze (277).

### **Analiza genetičkih rezultata**

Uloga telomera i telomeraze u početnom stadijumu i razvoju maligniteta je veoma značajna (278,279). Većina karcinoma aktivira prisustvo telomeraze tako što omogućava malignim ćelijama da se neograničeno dele (280). Izraženost reverzne transkriptaze ljudske telomeraze reguliše se na različitim molekularnim nivoima, ali izgleda da je najvažniji na nivou transkripcije. Na transkripciju utiče veći broj genetskih i epigenetskih faktora, među kojima su mutacije promotera, genske amplifikacije i preraspoređivanje gena, prisustvo polimorfizma na nivou nukleotida, metilacija, itd., i oni mogu da utiču i na prisustvo i funkciju hTERT (281).

O ulozi hTERT gena u nastanku RCC uopšte, još uvek postoje brojne kontroverze, posebno kad govorimo o učestalosti somatskih mutacija u promoteru, nivou aktivnosti (ekspresije) telomeraze kod različitih podtipova RCC koji utiču na polimorfizam na nivou jednog nukleotida (SNP), itd (282).

U našem istraživanju sekvencionisali smo promotorski region hTERT gena kod 31 uzorka pacijenata obolelih od RCC i nismo identifikovali ni jednu aktivaciju mutacija na mestima na kojima smo ih očekivali. Postoji mali broj studija koje su se bavile mutacijama hTERT kod RCC, i u kojima se došlo do zaključka da je pojava mutacija relativno retka, od 6 do 13% (282-284), što je u skladu s našim rezultatima. Mala učestalost hTERT mutacija kod RCC u oštroj je suprotnosti sa rezultatima do kojih se došlo u slučaju urotelijalnih tumora mokraćnog trakta kod kojih se i do 100% slučajeva opažaju hTERT mutacije (285,286). Dalje je analizirana učestalost genske amplifikacije i došlo se do zaključka da kod skoro 20% pacijenata obolelih od RCC postoji ova genska promena. Slična učestalost TERT genske amplifikacije otkrivena je i u slučajevima lentigo malignog melanoma i bila je u korelaciji sa lošim ishodom (287). Visoke vrednosti učestalosti hTERT amplifikacija (79%), opisane su kod Merkelovog karcinoma (MCC) i kod njih, prognoza isto tako nije dobra (288).

U našem uzorku, hTERT amplifikacija nije se pokazala dovoljno informativnom da bismo mogli da predvidimo ishod bolesti pošto nismo mogli da ustanovimo nikakvu povezanost između te amplifikacije i ponašanja tog specifičnog tumora.

Metilacija promotera hTERT gena ranije nije istraživana kod različitih podtipova RCC. Naše istraživanje je prvo u kojem se posmatra moguća povezanost ove epigenetske pojave sa ponašanjem RCC. Interesantno je da je metilacija promotera hTERT gena bila čest slučaj, što ukazuje na značaj ovog mehanizma hTERT genske regulacije kod nekih podtipova RCC. Ukupno, u više od polovine uzoraka DNK pacijenata obolelih od RCC, bila je prisutna metilacija promotera, što se u velikoj meri poklapa sa nalazima kod urotelnih karcinoma mokraćne bešike. Metilacija je, ipak, u velikoj meri zavisila od histološkog tipa; vrednosti učestalosti metilacije iznosile su 29%, 53% i 100% kod pRCC, ccRCC i chRCC ovim redom, tako da je izgledalo da je to odrednica za hromofobni RCC, s obzirom da je metilacija bila prisutna u svim uzorcima. Ovaj zaključak se, međutim, mora uzeti s oprezom imajući u vidu da je broj analiziranih uzoraka mali. Ovako visoka

učestalost metilacije promotera (100%) nije uobičajena pojava, ali jeste ranije opisana u slučajevima različitih tumora i različitih gena (289).

Na primer, kod mukoepidermoidnih karcinoma pljuvačnih žlezda gen p14 gen je bio metilovan u 100% slučajeva (290). hTERT je takođe bio metilovan u 100% slučajeva kod oralnih planocelularnih karcinoma (291). U nedavnoj obimnoj studiji genomske slike hromofobnog RCC, utvrđeno je da je u ovom retkom tipu RCC prisutan veći broj pojava slučajeva hipometilacije nego hipermetilacije u poređenju sa svetloćelijskim RCC, ali autori nisu pomenuli hTERT. Oni su takođe zapazili značajne razlike u obrascu metilacije DNK između ova dva tipa (292).

Sekvenciranje promotera u tumorskim uzorcima DNK, otkrilo je relativno veliku učestalost polimorfizma rs2853669. Stoga je, da bi se povećao značaj studije o povezanosti, odlučili smo da analiziramo dodatne uzorke DNK iz krvi pacijenata, a s ciljem da odredimo odnos između prisustva polimorfizma na nivou jednog nukleotida (SNP) i karakteristika tumora. I zaista, pokazalo se da prisustvo varijantnog alela ima zaštitni efekat. Naime, tumor kod pacijenata kod kojih je nađen bar jedan varijantni alel (bilo heterozigotni ili homozigotni) uglavnom je bio tumor niskog gradusa. U studiji o \ takođe je pokazala da je srednji period preživljavanja kod CC genotipa značajno duži (293). Opširna meta-analiza nije potvrdila ulogu ovog polimorfizma na nivou jednog nukleotida (SNP), ni kao rizik, ni kao zaštitni faktor kod ljudskog karcinoma, osim u slučaju TT genotipa praćenog hTERT mutacijama, gde je ukazivala da je verovatnoća preživljavanja mala (294).

Da zaključimo, izgleda da hTERT, putem metilacije svog promotera i polimorfizma funkcionalnog promotera ima svoju ulogu u biologiji karcinoma bubrežnih ćelija kod pacijenata u Srbiji. Da bi se ovi zaključci potvrdili potrebno je proučiti veći uzorak pacijenata.

## 6. ZAKLJUČCI

1.

- Imunohistohemijska ispitivanja ekspresije ciklina A u tkivu RCC pokazala su da postoji statistički značajna razlika ekspresije ciklina A kod različitih histopatoloških tipova RCC. Najintenzivnija ekspresija ciklina A uočena je u slučajevima papilarnog histopatološkog tipa (u odnosu na hromofobni i svetloćelijski histopatološki tip što bi ukazalo na njegov prognostički značaj).

- Korelacionom analizom nije nađena povezanost između ekspresije ciklina A i stadijuma tumora, nuklearnog gradusa tumora, starosti pacijenata, veličine tumora i vremena preživljavanja pacijenata.

2.

- Imunohistohemijska ispitivanja ekspresije Ki67 u tkivu RCC pokazala je da je dobijena statistički značajna razlika jedino između histopatološkog tipa tumora, tj. kod papilarnog RCC dobijena je izrazita pozitivnost u odnosu na preostala dva analizirana histopatološka tipa RCC, što ukazuje na najnepovoljniju varijantu ovog tipa RCC.

- Razlika u ekspresiji Ki67 u odnosu na stadijum tumora, veličinu tumora, starost pacijenata i vreme preživljavanje pacijenata, nisu pokazala statističku značajnost.

- Razlika po nuklearnom gradusu tumora je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05, pa je treba uzeti u razmatranje jer je moguće da bi na većem uzorku dobili značajniju razliku.

3.

- Imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije telomeraze u tkivu RCC je pokazalo da su vrednosti ekspresije telomeraze vrlo slične kada je u pitanju pol, starost pacijenata, nuklearni gradus tumora, stadijum tumora, veličina tumora i vreme preživljavanja pacijenata.

- Evidentna je razlika zapažena između histopatoloških tipova tumora, i to u korist papilarnog histopatološkog tipa kod koga je ekspresija telomeraze drastično veća u odnosu na ostala dva histopatološka tipa, što takođe ukazuje na najnepovoljniju prognozu ovog histopatološkog tipa.

4.

-Sekvenciranjem 343 bp dugog segmenta u okviru promotorskog regiona hTERT gena, koji se proteže od pozicije -278 do +65, nije pokazano prisustvo mutacija ni u jednom od ispitivanih uzorka RCC.

- Sekvenciranjem je ipak otkriveno prisustvo tranzicije T/C na poziciji -245 bp (polimorfizam pojedinačnog nukleotida koji u bazama podataka nosi oznaku rs2853669).

- Od 54 analizirana slučaja pacijenata sa RCC, mutirani alel bio je prisutan u homozigotnom obliku (CC) u samo 7,4%, a u heterozigotnom obliku (CT) u 40,7%, dok je preostalih 51.9% bilo homozigotno za nemutirani tip gena (wt alel). Verovatnoća da se razvije RCC nižeg gradusa bila je 3 puta veća kod osoba koje su bile heterozigoti, nego kod onih sa nemutiranim genotipom (wt genotipom, TT).

5.

Analizom hTERT gena na prisustvo genske amplifikacije kod ispitivanih pacijenata sa RCC, genska amplifikacija je uočena je kod 19.4% pacijenata. Nije uočena povezanost između hTERT amplifikacije i epidemioloških, kliničkih i patoloških nalaza. Nivoi amplifikacije kretali su se u rasponu od 2.60 do 7.61.

6.

Analizom metilacionog statusa promotorskog regiona hTERT gena kod ispitivanih pacijenata sa RCC, utvrđeno je da je hTERT promotor metilovan u 54,8% uzoraka. Značajna razlika zapažena je između histopatoloških tipova tumora, pošto je kod hromofobnog histopatološkog tipa RCC kod svih 5 pacijenata hTERT promotor bio metilovan.

## 7. Literatura:

1. Draganić V. Bubrež. In: Mijač M, Draganić V, Radonjić V, editors. Anatomija čoveka. Abdomen i karlica. 3rd ed. Beograd: Savremena administracija; 2005. p. 142-58.
2. Clapp WL, Croker BP. Kidney. In: Mills SE, editors. Histology for pathologists. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 839-95.
3. Anđelković Z, Somer Lj, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A. Urinarni sistem. Bubrež. In: Anđelković Z, et al, editors. Histološka građa organa. 1st ed. Niš: Bonafides; 2001. p. 79-88.
4. Junqueira LC, Carneiro J. Mokraćni sustav. Bubrež. In: Junqueira LC, Carneiro J, editors. Osnove histologije. 10th ed. Zagreb: Školska knjiga; 2005. p. 383-98.
5. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Bubrež i sabirni sastav bubrežga. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, editors. Robinsovi osnovi patologije. 8th ed. Beograd: Data Status; 2010. p. 541-77.
6. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Tumours of the kidney. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2004. p. 9-87.
7. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. In: IARC CancerBase. Lyon: IARC Press; 2001;5.
8. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. In: IARC Scientific Publications. Lyon: IARC Press; 2003;155.
9. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. JAMA. 1999;281:1628-31.
10. Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H. Trends in cancer incidence and mortality. IARC Sci Publ. 1993;121:1-806.
11. Volgezang NJ, Stadler WM. Kidney Cancer. Lancet. 1998;352:1691-6.
12. Dhote R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trecan G. Review. Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. BJU Int. 2000;86:20-7.



13. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2010;7:245–57.
14. Parkin DM, Pisani P, Lopez AD, Masuyer E. At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985. *Int J Cancer.* 1994;59:494-504.
15. Parker AS, Cerhan JR, Janney CA, Lynch CF, Cantor KP. Smoking cessation and renal cell carcinoma. *Ann Epidemiol.* 2003;13:245-51.
16. Parkin DM, Pisani P, Lopez AD, Masuyer E. At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985. *Int J Cancer.* 1994;59:494-504.
17. Liehr JG. Hormone-associated cancer: mechanistic similarities between human breast cancer and estrogen-induced kidney carcinogenesis in hamsters. *Environ Health Perspect.* 1997;105:565-9.
18. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Jarvholm B. Obesity, hypertension and the risk of Kidney cancer in men. *N Engl J Med.* 2000;343:1305-11.
19. Bergstrom A, Lindblad P, Wolk A. Birth weight and risk of renal cell cancer. *Kidney Int.* 2001;59:1110-3.
20. Yuan JM, Castela JE, Gago-Dominiguez M, Ross RK, Yu MC. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1998;77:1508-13.
21. Grossman E, Messerli FH, Boyko V, Goldbourt U. Is there association between hypertension and cancer mortality? *Am J Med.* 2002;112:479-86.
22. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A, 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.
23. Chow WH, Devesa SS, Fraumeni Jr JF. Epidemiology of renal cell carcinoma. In: Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Coffey DS, editors. *Comprehensive textbook of genitourinary oncology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 1011-5.
24. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2010;7:245-57.
25. Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer.* 1975;15:617-31.

26. Lambe M, Lindblad P, Wu J, Remler R, Hsieh CC. Pregnancy and risk of renal cancer: a population-based study in Sweden. *Br J Cancer*. 2002;86:1425-9.
27. Whang YE, Godley PA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2003;15:213-6.
28. Enterline PE, Hartley J, Henderson V. Asbestos and cancer: a cohort follow-up to death. *Br J Ind Med*. 1987;44:396-401.
29. Cohen HT, McGovern FJ. Renal cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2477-90.
30. Neumann HP, Bender BU, Berger DP, Laubenberger J, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, et al. Prevalence morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. *J Urol*. 1998;160:1248-54.
31. Zbar B, Glenn G, Lubensky I, Choyke P, Walther MM, Magnusson G, et al. Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *J Urol*. 1995;153:907-12.
32. Schmidt LS, Nickerson ML, Angeloni D, Glenn GM, Walther MM, Albert PS, et al. Early onset hereditary papillary renal carcinoma: germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the met proto-oncogene. *J Urol*. 2004;172:1256-61.
33. Birt AR, Hogg GR, Dube WJ. Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons. *Arch Dermatol*. 1977;113:1674-7.
34. Khoo SK, Bradley M, Wong FK, Hedblad MA, Nordenskjold M, The BT. Birt-Hogg-Dube syndrome: mapping of a novel hereditary neoplasia gene to chromosome 17p12-q11.2. *Oncogene*. 2001;20:5239-42.
35. Lendvay TS, Marshall FF. The tuberous sclerosis complex and its highly variable manifestations. *J Urol*. 2003;169:1635-42.
36. Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol*. 1998;13:624-8.
37. Agochukwu N, Shuch B. Clinical management of renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *World J Urol*. 2014;32:581-9.
38. Michealson MD. Renal Cell Carcinoma. In: Chabner BA, Lynch, Jr. T, Longo DL, editors. *Harrison's Manual of Oncology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Education; 2014. p. 1168-87.
39. Ng CS, Wood CG, Silverman PM, Tannir NM, Tamboli P, Sandler CM. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging and Surveillance. *AJR*. 2008;191:1220-32.

40. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2477-90.
41. Martel CL, Lara PN. Renal cell carcinoma: current status and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;45:177-90.
42. Gibbons RP, Monte JE, Correa RJ Jr, Mason JT. Manifestations of renal cell carcinoma. *Urology.* 1976;8:201-6.
43. Cherukuri SV, Johenning PW, Ram MD. Systemic effects of hypernephroma. *Urology.* 1977;10:93-7.
44. Donmez T, Kale M, Ozyurek Y, Atalay H. Erythrocyte sedimentation rates in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 1992;21:51-2.
45. Vanatta PR, Silva FG, Taylor WE, Costa JC. Renal cell carcinoma and systemic amyloidosis: demonstration of AA protein and review of the literature. *Hum Pathol.* 1983;14:195-201.
46. Coakley FV, Hricak H, Presti JC, Small EJ. Diffuse retroperitoneal amyloidosis due to renal cell carcinoma. *Br J Radiol.* 1999;72:412-3.
47. Laski ME, Vugrin D. Paraneoplastic syndromes in hypernephroma. *Semin Nephrol.* 1987;7:123-30.
48. Maldazys JD, deKernion JB. Prognostic factors in metastatic renal carcinoma. *J Urol.* 1986;136:376-9.
49. Muggia FM. Overview of cancer-related hypercalcemia: epidemiology and etiology. *Semin Oncol.* 1990;17:3-9.
50. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol.* 1996;14:216-22.
51. Golde DW, Schambelan M, Weintraub BD, Rosen SW. Gonadotropin secreting renal carcinoma. *Cancer.* 1974;33:1048-53.
52. Turkington RW. Ectopic production of prolactin. *N Engl J Med.* 1971;285:1455-8.
53. Riggs BL, Sprague RG. Association of Cushing's syndrome and neoplastic disease: observations in 232 cases of Cushing's syndrome and review of the literature. *Arch Intern Med.* 1961;108:841-9.
54. Palgon N, Greenstein F, Novetsky AD, Lichter SM, Rosen Y. Hyperglycemia associated with renal cell carcinoma. *Urology.* 1986;28:516-7.

55. Jobe BA, Bierman MH, Mezzacappa FJ. Hyperglycemia as a paraneoplastic endocrinopathy in renal cell carcinoma: a case report and review of the literature. *Nebr Med J.* 1993;78:349-51.
56. Rosenblum SL. Paraneoplastic syndromes associated with renal cell carcinoma. *J S C Med Assoc.* 1987;83:375-8.
57. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guille F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003;44:226-32.
58. Novick AC, Campbell SC. Renal tumours. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editors. *Campbell's urology.* Philadelphia: WB Saunders; 2002. p. 2672-731.
59. Herts BR, Baker ME. The current role of percutaneous biopsy in the evaluation of renal masses. *Semin Urol Oncol.* 1995;13:254-61.
60. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol.* 2010;58:398-406.
61. Hélénon O, Correas JM, Balleyguier C, Ghouadni M, Cornud F. Ultrasound of renal tumors. *Eur Radiol.* 2001;11:1890-901.
62. Campbell SC, Fichtner J, Novick AC, Steinbach F, Stöckle M, Klein EA, et al. Intraoperative evaluation of renal cell carcinoma: a prospective study of the role of ultrasonography and histopathological frozen sections. *J Urol.* 1996;155:1191-5.
63. Heidenreich A, Ravery V; European Society of Oncological Urology. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World J Urol.* 2004;22:307-15.
64. Mileto A, Nelson RC, Paulson EK, Marin D. Dual-Energy MDCT for Imaging the Renal Mass. *AJR Am J Roentgenol.* 2015;W1-W8.
65. Ferda J, Hora M, Hes O, Ferdová E, Kreuzberg B. Assessment of the kidney tumor vascular supply by two-phase MDCT-angiography. *Eur J Radiol.* 2007;62:295–301.
66. Volpe A, Kachura JR, Geddie WR, Evans AJ, Gharajeh A, Saravanan A, et al. Techniques, safety and accuracy of sampling of renal tumors by fine needle aspiration and core biopsy. *J Urol.* 2007;178:379-86.
67. Wunderlich H, Hindermann W, Al Mustafa AM, Reichelt O, Junker K, Schubert J. The accuracy of 250 fine needle biopsies of renal tumors. *J Urol.* 2005;174:44-6.
68. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *Eur Urol.* 2016;69:660-73.

69. Oto A, Herts BR, Remer EM, Novick AC. Inferior vena cava tumor thrombus in renal cell carcinoma: staging by MR imaging and impact on surgical treatment. *AJR Am J Roentgenol.* 1998;171:1619-24.
70. Heidenreich A, Ravery V. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World J Urol.* 2004;22:307-15.
71. Zambrano NR, Lubensky IA, Merino MJ, Linehan WM, Walther MM. Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *J Urol.* 1999;162:1246-58.
72. McGregor DK, Khurana KK, Cao C, Tsao CC, Ayala G, Krishnan B, et al. Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: the use of the monoclonal antibody "Renal cell carcinoma marker". *Am J Surg Pathol.* 2001;25:1485-92.
73. Yoshida SO, Imam A, Olson CA, Taylor CR. Proximal renal tubular surface membrane antigens identified in primary and metastatic renal cell carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 1986;110:825-32.
74. Wick MR, Cherwitz DL, Manivel JC, Sibley R. Immunohistochemical findings in tumors of the kidney. In: Eble JN, editors. *Tumor and tumor-like conditions of the kidneys and ureters.* New York:Churchill Livingstone; 1990. p. 207-47.
75. Pitz S, Moll R, Storkel S, Thoenes W. Expression of intermediate filament proteins in subtypes of renal cell carcinomas and in renal oncocytomas. Distinction of two classes of renal cell tumors. *Lab Invest.* 1987;56:642-53.
76. Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL. Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:203-10.
77. Fleming S, Lindop GB, Gibson AA. The distribution of epithelial membrane antigen in the kidney and its tumours. *Histopathology.* 1985;9:729-39.
78. Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, et al. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology.* 2002;40:450-7.
79. McGregor DK, Khurana KK, Cao C, Tsao CC, Ayala G, Krishnan B, et al. Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: the use of the monoclonal antibody 'Renal Cell Carcinoma Marker'. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:1485-92.
80. del Vecchio MT, Lazzi S, Bruni A, Mangiavacchi P, Cevenini G, Luzi P. DNA ploidy pattern in papillary renal cell carcinoma. Correlation with clinicopathological parameters and survival. *Pathol Res Pract.* 1998;194:325-33.

81. Amin MB, Corless CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kubus J, Schultz DS. Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *Am J Surg Pathol.* 1997;21:621-35.
82. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol.* 1997;10:537-44.
83. Galatica Z, Kovatich A, Miettinen M. Consistent expression of cytokeratin 7 in papillary renal cell carcinoma. *J Urol Pathol.* 1995;3:205-11.
84. Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases. *J Urol.* 1995;154: 964-7.
85. Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S. Chromophobe cell renal carcinoma and its variants-a report on 32 cases. *J Pathol.* 1988;155:277-87.
86. de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:275-84.
87. Martignoni G, Pea M, Chilosi M, Brunelli M, Scarpa A, Colato C, et al. Parvalbumin is constantly expressed in chromophobe renal carcinoma. *Mod Pathol.* 2001;14:760-7.
88. Srigley JR, Eble JN. Collecting duct carcinoma of kidney. *Semin Diagn Pathol.* 1998;15:54-67.
89. Rumpelt HJ, Storkel S, Moll R, Scharfe T, Thoenes W. Bellini duct carcinoma: further evidence for this rare variant of renal cell carcinoma. *Histopathology.* 1991;18:115-22.
90. Argani P, Antonescu CR, Couturier J, Fournet JC, Sciot R, Debiec-Rychter M, et al. PRCC-TFE3 renal carcinomas: morphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular analysis of an entity associated with the t(X;1) (p11.2;q21). *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1553-66.
91. Argani P, Antonescu CR, Illei PB, Lui MY, Timmons CF, Newbury R, et al. Primary renal neoplasms with the ASPL-TFE3 gene fusion of alveolar soft part sarcoma: a distinctive tumor entity previously included among renal cell carcinomas of children and adolescents. *Am J Pathol.* 2001;159:179-92.
92. Kennelly MJ, Grossman HB, Cho KJ. Outcome analysis of 42 cases of renal angiomyolipoma. *J Urol.* 1994;152:1988-91.

93. Mukai M, Torikata C, Iri H, Tamai S, Sugiura H, Tanaka Y, et al. Crystalloids in angiomyolipoma. 1. A previously unnoticed phenomenon of renal angiomyolipoma occurring at a high frequency. *Am J Surg Pathol.* 1992;16:1-10
94. Bonetti F, Chiopera PL, Pea M, Martignoni G, Bosi F, Zamboni G, et al. Transbronchial biopsy in lymphangiomyomatosis of the lung. HMB45 for diagnosis. *Am J Surg Pathol.* 1993;17:1092-102.
95. Eble JN, Warfel K. Early human renal cortical epithelial neoplasia. *Mod Pathol.* 1991;4:45A.
96. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol.* 1997;10:537-44.
97. Reese AJM, Winstanley DP. The small tumor-like lesions of the kidney. *Br J Cancer.* 1958;12:507-16.
98. Yu-Hua Fan, Yen-Hwa Chang, William J.S. Huang, Hsiao-Jen Chung, Kuang-Kuo Chen. Renal Oncocytoma: Clinical Experience of Taipei Veterans General Hospital. *J Chin Med Assoc.* 2008;5:254-8.
99. Klein MJ, Valensi QJ. Proximal tubular adenomas of kidney with so-called oncocytic features. A clinicopathologic study of 13 cases of a rarely reported neoplasm. *Cancer.* 1976;38:906-14.
100. Davis CJ Jr, Mostofi FK, Sesterhenn IA, Ho CK. Renal oncocytoma. Clinicopathological study of 166 patients. *J Urogen Pathol.* 1991;1:41-52.
101. Israeli RS, Wise GJ, Bansal S, Gerard PS, Castella A. Bilateral renal oncocytomatosis in a patient with renal failure. *Urology.* 1995;46:873-5.
102. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982;6:655-63.
103. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol.* 2001;19:1649-57.
104. Quereda V, Malumbres M. Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol.* 2009;42:75-86.
105. Fedele M, Fusco A. Role of the high mobility group A proteins in the regulation of pituitary cell cycle. *J Mol Endocrinol.* 2010;44:309-18.

106. Thunnissen FB, Ambergen AW, Koss M, Travis WD, O'Leary TJ, Ellis IO. Mitotic counting in surgical pathology: sampling bias, heterogeneity and statistical uncertainty. *Histopathology*. 2001;39:1-8.
107. Gal R, Rath-Wolfson L, Rosenblatt Y, Halpern M, Schwartz A, Koren R. An improved technique for mitosis counting. *Int J Surg Pathol*. 2005;13:161-5.
108. Tapia C, Kutzner H, Mentzel T, Savic S, Baumhoer D, Glatz K. Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:83-9.
109. Besana-Ciani I, Boni L, Dionigi G, Benevento A, Dionigi R. Outcome and long term results of surgical resection for gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Scand J Surg*. 2003;92:195-9.
110. Megyesi M, Berta M, Khoor A. Endobronchial large cell neuroendocrine carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2003;9:198-200.
111. Can B, Sokmensuer C. Clinicopathologic features, cellular differentiation, PCNA and P53 expressions in gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterology*. 2003;50:ccxliii-ccxlviii.
112. Zanelli M, Cortecchia S, Folicaldi S, Pasquinelli G, Bondi A. Cellular fibroma of the ovary: description of a case. *Pathologica*. 2002;94:196-200.
113. Frincu DL, Francu LL, Chirana A, Calin D, Nitescu A, Crisan-Dabija R. Quantitative histopathological criteria in predicting the giant bone cell tumors's grading. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2002;106:147-53.
114. Bayazit Y, Bakir K, Ucak R, Mumbuc S, Ozer E, Kanlikama M. Clinical and histopathological correlates of the proliferative activity in squamous cell laryngeal carcinoma. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2002;123:43-6.
115. Sawair FA, Irwin CR, Gordon DJ, Leonard AG, Stephenson M, Napier SS. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2003;32:1-9.
116. Alkushi A, Abdul-Rahman ZH, Lim P, Schulzer M, Coldman A, Kalloger SE, et al. Description of a novel system for grading of endometrial carcinoma and comparison with existing grading systems. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29:295-304.
117. Smilek P, Dusek L, Vesely K, Rottenberg J, Kostrica R. Prognostic significance of mitotic and apoptotic index and the DNA cytometry in head and neck cancer. *Neoplasma*. 2005;52:199-207.
118. Langer C, Gunawan B, Schuler P, Huber W, Fuzesi L, Becker H. Prognostic factors influencing surgical management and outcome of gastrointestinal stromal tumours. *Br J Surg*. 2003;90:332-9.



119. Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, Xue WC, Cheng DK, Ng TY, et al. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer*. 2001;37:1104-10.
120. Sehouli J, Drescher FS, Mustea A, Elling D, Friedmann W, Kühn W, et al. Granulosa cell tumor of the ovary: 10 years follow-up data of 65 patients. *Anticancer Res*. 2004;24:1223-9.
121. Hoekstra AV, Keh P, Lurain JR. Placental site trophoblastic tumor: a review of 7 cases and their implications for prognosis and treatment. *J Reprod Med*. 2004;49:447-52.
122. Malmstrom H, Schmidt H, Persson PG, Carstensen J, Nordenskjöld B, Simonsen E. Flow cytometric analysis of uterine sarcoma: Ploidy and S-phase rate as prognostic indicators. *Gynecologic Oncology*. 1992;44:172-7.
123. Oestreicher N, White E, Malone KE, Porter PL. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. *Ann Surg Oncol*. 2004;11:426-33.
124. Rodallec M, Vilgrain V, Couvelard A, Rufat P, O'Toole D, Barrau V, et al. Endocrine pancreatic tumours and helical CT: Contrast enhancement is correlated with microvascular density, histoprognostic factors and survival. *Pancreatology*. 2006;6:77-85.
125. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*. 2005;131:29-38.
126. Beer TW, Carr NJ, Whittaker MA, Pullinger N. Mitotic and in situ end-labeling apoptotic indices as prognostic markers in malignant mesothelioma. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2000;4:143-8.
127. Prayson RA, Mohan DS, Song P, Suh JH. Clinicopathologic study of forty-four histologically pure supratentorial oligodendrogliomas. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2000;4:218-27.
128. Williams NP, Williams E, Fletcher H. Smooth muscle tumours of the vulva in Jamaica. *West Indian Med J*. 2002;51:228-31.
129. de Silva MV, McMahon AD, Reid R. Prognostic factors associated with local recurrence, metastases, and tumor-related death in patients with synovial sarcoma. *Am J Clin Oncol*. 2004;27:113-21.
130. Ogawa K, Tada T, Takahashi S, Sugiyama N, Inaguma S, Takahashi SS, et al. Malignant solitary fibrous tumor of the meninges. *Virchows Arch*. 2004;444:459-64.

131. Kanthan R, Torkian B. Recurrent solitary fibrous tumor of the pleura with malignant transformation. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128:460-2.
132. Susnik B, Frkovic-Grazio S, Bracko M. Occult micrometastases in axillary lymph nodes predict subsequent distant metastases in stage I breast cancer: a case-control study with 15-year follow-up. *Ann Surg Oncol.* 2004;11:568-72.
133. Kumarasinghe MP, Weng EK. Pathological features and their prognostic implications in colorectal endocrine cell tumors: a long-term follow-up study. *Pathology.* 2005;37:204-10.
134. van-Diest PJ, Baak JP. The morphometric prognostic index is the strongest prognosticator in premenopausal lymph node-negative and lymph node-positive breast cancer patients. *Hum Pathol.* 1991;22:326-30.
135. Noguchi M, Kinjyo H, Miyazaki A, Kubota H, Kohama G. Control of cell proliferation kinetics of tumor in neoadjuvant chemotherapy for advanced oral squamous cell carcinoma and its prognostic implications. *Int J Clin Oncol.* 2002;7:138-44.
136. Farczadi E, Kaszas I, Baki M, Szende B. Changes in apoptotic and mitotic index, bcl2, and p53 expression in rectum carcinomas after short-term cytostatic treatment. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:780-3.
137. Louwman WJ, van Diest PJ, van Beek MW, Schapers RF, Nolthenius-Puylaert MB, Baak JP, et al. Trends in breast cancer aggressiveness before the introduction of mass screening in southeastern Netherlands 1975-1989. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;73:199-206.
138. Taylor WR. FACS-based detection of phosphorylated histone H3 for the quantitation of mitotic cells. *Methods Mol Biol.* 2004;281:293-9.
139. Bossard C, Jarry A, Colombeix C, Bach-Ngohou K, Moreau A, Loussouarn D, et al. Phosphohistone H3-labeling for histoprognostic grading of breast adenocarcinoma and computer-assisted determination of mitotic index. *J Clin Pathol.* 2006;59:706-710.
140. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Oncologist.* 2000;5:510-13.
141. Wolgemuth DJ, Lele KM, Jobanputra V, Salazar G. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. *Int J Androl.* 2004;27:192-9.
142. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:149-60.
143. den Elzen N, Pines J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol.* 2001;153:121-36.

144. Wolthuis R, Clay-Farrace L, van Zon W, Yekezare M, Koop L, Ogink J, et al. Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A. *Mol Cell Biol*. 2008;30:290-302.
145. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:149-60.
146. Parry DH, O'Farrell PH. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr Biol*. 2001;11:671-83.
147. Sullivan M, Morgan DO. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:894-903.
148. Wong JV, Dong P, Nevins JR, Mathey-Prevot B, You L. Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry. *Cell Cycle Georget Tex*. 2011;10:3086-94.
149. Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Moll Life Sci*. 2002;59:1317-26.
150. Chen HM, Yen-Ping Kuo M, Lin KH, Lin CY, Chiang CP. Expression of cyclin A is related to progression of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*. 2003;39:476-82.
151. Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, et al. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol*. 2004;4:22.
152. Handa K, Yamakawa M, Takeda H, Kimura S, Takahashi T. Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin A as an indicator of poor prognosis. *Int J Cancer*. 1999;84:225-33.
153. Saarilahti K, Kajanti M, Kouri M, Aaltonen LM, Franssila K, Joensuu H. Cyclin A and Ki-67 expression as predictors for locoregional recurrence and outcome in laryngeal cancer patients treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*. 2003;57:986-95.
154. Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Bird K, Vowler SL, et al. Immunohistochemical estimation of cell cycle phase in laryngeal neoplasia. *Br J Cancer*. 2006;95:314-21.
155. Tran TA, Ross JS, Carlson JA, Mihm MC Jr. Mitotic cyclins and cyclin-dependent kinases in melanocytic lesions. *Hum Pathol*. 1998;29:1085-90.
156. Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, et al. Expression of G2-M modulators in thyroid neoplasms: correlation of cyclin A, B1 and cdc2 with differentiation. *Pathol Res Pract*. 2002;198:397-402.

157. Dobashi Y, Jiang SX, Shoji M, Shojiroh M, Kameya T. Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas. *J Pathol.* 2003;199: 208-20.
158. Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy B, Sutherland RL, Lee CS. Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small lung cell carcinoma. *Histopathology.* 2009;55:28-36.
159. Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2005;153:1166-75.
160. Tarasova MV, Pozharisskii KM, Ten VP, Arzumanov AA, Kudaibergenova AG. The proliferative properties and regulators of the mitotic cell cycle of prostate adenocarcinoma. *Arh Patol.* 2009;71:20-3.
161. Boström P, Söderström M, Palokangas T, Vahlberg T, Collan Y, Carpen O, et al. Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. *BMC Res Notes.* 2009;2:140.
162. Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H, Shuin T, Yamamoto A, Terao N, et al. Cyclin A overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter including dysplasia: immunohistochemical findings in relation to prognosis. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1399-1404.
163. Wang A, Yoshimi N, Suzui M, Yamauchi A, Terao M, Mori H. Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122:122-26.
164. Davidson B, Risberg B, Berner A, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB, et al. Expression of cell cycle proteins in ovarian carcinoma cells in serous effusions-biological and prognostic implications. *Gynecol Oncol.* 2001;86:249-56.
165. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology.* 2000;182:311-22.
166. Prayson RA. Cell proliferation and tumors of the central nervous system, Part II: Radiolabeling, cytometric, and immunohistochemical techniques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:663-72.
167. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: Evaluation of different Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 1997;50:198-200.
168. Lindboe CF, von-der-Ohe G, Torp SH. Determination of proliferation index in neoplasms using different Ki-67 equivalent activity. *APMIS.* 2003;111:567-70.
169. van-Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol.* 2004;57:675-81.

170. Geller JI, Santana VM. Tumor rupture and mitotic index in pediatric sex cord-stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2004;22:2032-3.
171. Wong NA, Young R, Malcomson RD, Nayar AG, Jamieson LA, Save VE, et al. Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology.* 2003;43:118-26.
172. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature.* 1991;350:569-73.
173. Blackburn EH . Telomeres: no end in sight. *Cell.* 1994;77:621-23.
174. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol.* 1972;239:197-201.
175. Shay JW. Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection? *Mol Med Today.* 1995;1:378-84.
176. Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol.* 1999;180:10-8.
177. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay J. Correlation telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med.* 1995;1:249-55.
178. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:895-902.
179. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, et al. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:2696-701.
180. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, et al. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res.* 1995;55:3258-62.
181. Hiyama E, Gollahan L, Kotaoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:116-22.
182. Hiyama E, Kodama T, Sinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res.* 1997;57:326-31.
183. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay JW, et al. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behavior? *Eur J. Cancer.* 1997;33:1932-36.

184. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. Immunohistochemical Detection of Telomerase ( hTERT ) Protein in Human Cancer Tissues and a Subset of Cells in Normal Tissues. *Neoplasia*. 2001;1:17-26.
185. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nature genetics*. 1997;17:498-502.
186. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Linger J, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*. 1997;277:955-959.
187. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 1997;90:785-95.
188. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, et al. A mammalian telomerase-associated protein. *Science*. 1997;275:973-7.
189. Holt SE, Aianer DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev*. 1999;13:817-26.
190. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*. 1997;17:498-502.
191. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase ( hTERT ) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*. 1998;58:4168-72.
192. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Fukuba I, Yamaoka H, Shay JW, et al. Rapid detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5:601-9.
193. Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*. 1999;232:97-106.
194. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18:173-9.
195. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 1995;155:3711-15.

196. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Chaffins M, Piatyszek MA, Shay JW. Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin condition. *J Invest Dermatol.* 1996; 106:756-65.
197. Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N, Kodama T, Shay JW, Yokoyama T. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol.* 1996;9:453-8.
198. Kyo S, Takakura M, Khama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res.* 1997;57:610-14.
199. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 1973;41:181–90.
200. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 1985;43:405-13.
201. Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, Jack W. Szostak. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009 [Internet]. Stockholm: The Nobel Foundation; 2009 [cited 2009 Oct 5].
- Available from:  
[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2009/press.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/press.html)
202. Dahse R, Fiedler W, Junker K, Schlichter A, Schubert J, Claussen U. Telomerase activity and telomere lengths: Alterations in renal cell carcinomas. *Kidney Int.* 1999;56:1289-90.
203. Protzel C, Maruschke M, Hakenberg OW. Epidemiology, aetiology, and Pathogenesis of renal cell carcinoma. *European Urology Supplements.* 2012;3:52-9.
204. Park JY, Choe M, Kang Y, Lee SS. IMP3, a Promising Prognostic Marker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Korean J Pathol.* 2014;48:108-16.
205. Gayed BA, Youssef RF, Bagrodia A, Darwish OM, Kapur P, Sagalowsky A, et al. Ki67 is an independent predictor of oncological outcomes in patients with localized clear-cell renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2014;113:668-73.
206. Itoi T, Yamana K, Bilim V, Takahashi K, Tomita F. Impact of frequent Bcl-2 expression on better prognosis in renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer.* 2004;90:200-5.
207. Wong PK, Lee ST, Murone C, Eng J, Lawrentschuk N, Berlangieri SU, et al. In vivo imaging of cellular proliferation in renal cell carcinoma using 18F-fluorothymidine PET. *Asia Ocean J Nucl Med Biol.* 2014;2:3-11.

208. Choe M, Park JY, Hwang I, Kim PS. Prognostic Significance and nature of rhabdoid features in Renal Cell carcinoma. *Korean J Pathol.* 2011;45:371-8.
209. Amouian S, Farzadnia M, Memar B, Attaranzadeh A, Tayyebi N. Expression of p53 and ki67 Proteins in Renal Cell Carcinoma and Its Relationship with Nuclear Grade. *Iran J Pathol.* 2008;1;25-9.
210. Ward RJ, Autexier C. Pharmacological telomerase inhibition a therapeutic treatment. *Mol Pharmacol.* 2005;68:779-86.
211. Kaur H, Richardson E, Murty L. Preparation of monoclonal antibodies against human telomerase. *Hybridoma.* 2001;20:183-8.
212. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266:2011-5.
213. Kirkpatrick KL, Newbold R, Kefah M. The mRNA expression of hTERT in breast carcinoma correlates with VEGF expression. *J Carcinog.* 2004;3:1-9.
214. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol.* 2009;16:432–43.
215. Hock LM, Lynch J, Balaji KC. Increasing incidence of all stages of kidney cancer in the last 2 decades in the United States: an analysis of surveillance, epidemiology and end results program data. *J Urol.* 2002;167:57–60.
216. Kurokawa Y, Maekawa A, Takahashi M, Hayashi Y. Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate-a new renal carcinogen. *Environ Health Perspect.* 1990;87:309-35.
217. Delahunt B. Advances and controversies in grading and staging of renal cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2009;22:S24–36.
218. Zheng K, Zhu W, Tan J, Wu W, Yang S, Zhang J. Retrospective analysis of a large patient sample to determine p53 and Ki67 expressions in renal cell carcinoma. *JBUON.* 2014;19:512-6.
219. Helmy W, Selmy GI, Ossman A. Nuclear morphometry and Ki67 proliferative Marker in Renal Clear Cell Carcinoma. *J EypT Natl Canc Inst.* 2003;2:107-12.
220. Samlowski W. Targeted Molecular Therapy for Renal Cell Carcinoma. Impact on Existing Treatment Paradigms. *J Manag Care Med.* 2010;4:40-5.
221. Mu K, Li L, Yang Q, Yun H, Kharaziha P, Ye DW, et al. A standardized method for quantifying proliferation by Ki67 and cyclin A immunohistochemistry in breast cancer. *Ann Diagn Pathol.* 2015;19:243-8.



222. Huuhtanen RL, Blomqvist CP, Böhling TO, Wiklund TA, Tukiainen EJ, Virolainen M, et al. Expression of cyclin A in soft tissue sarcomas correlates with tumor aggressiveness. *Cancer Res.* 1999;59:2885-90.
223. Kosacka M, Piesiak P, Porebska I, Korzeniewska A, Dyla T, Jankowska R. Cyclin A and Cyclin E expression in resected non-small cell lung cancer stage I-IIIa. *In Vivo.* 2009;23:519-25.
224. Dobashi Y, Jiang SX, Shoji M, Morinaga S, Kameya T. Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas. *J Pathol.* 2003;199:208-20.
225. Boström P, Söderström M, Palokangas T, Vahlberg T, Collan Y, Carpen O, et al. Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. *BMC Res Notes.* 2009;2:140.
226. Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H, Shuin T, Yamamoto A, Terao N, et al. Cyclin A overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter including dysplasia: immunohistochemical findings in relation to prognosis. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1399-404.
227. Engellau J. Prognostic factors in soft tissue sarcoma. Tissue microarray for immunostaining, the importance of whole-tumor sections and time-dependence. *Acta Orthop Scand Suppl.* 2004;75:2.
228. Poikonen P, Sjöström J, Amini RM, Villman K, Ahlgren J, Blomqvist C. Cyclin A as a marker for prognosis and chemotherapy response in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;93:515-9.
229. Davidson B, Risberg B, Berner A, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB, et al. Expression of cell cycle proteins in ovarian carcinoma cells in serous effusion-biological and prognostic implications. *Gynecol Oncol.* 2001;83:249-56.
230. Wolowiec D, Berger F, Ffrench P, Bryon PA, Ffrench M. CDK1 and cyclin A expression is linked to cell proliferation and associated with prognosis in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 1999;35:147-57.
231. Noguchi T, Dobashi Y, Minehara H, Itoman M, Kameya T. Involvement of cyclins in cell proliferation and their clinical implications in soft tissue smooth muscle tumors. *Am J Pathol.* 2000;156:135-47.
232. Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS. Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. *Histopathology.* 2009;55:28-36.
233. Ahlin C, Aaltonen K, Amini RM, Nevanlinna H, Fjällskog ML, Blomqvist C. Ki67 and Cyclin A as prognostic factors in early breast cancer. What are the optimal cut-off values?. *Histopathology.* 2007;51:491-8.

234. Lindboe CF, Torp SH. Comparison of Ki67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol.* 2002;55:467-71.
235. Jovanović MP, Jaković L, Bogdanović A, Marković O, Martinović VC, Mihaljević B. Poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma is associated with high percentage of bcl-2 and Ki67-positive tumor cells. *Vojnosanit Pregl.* 2009;66:738-43.
236. Marković O, Marisavljević D, Cemerikić V, Vidović A, Bakrac M, Perunčić M, et al. Proliferative activity of myeloma cells determined by Ki-67 antibody: biological and clinical significance. *Vojnosanit Pregl.* 2005;62:33-8.
237. Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study. *Isr Med Assoc J.* 2014;16:229-32.
238. Szczuraszek K, Mazur G, Jeleń M, Dziegiel P, Surowiak P, Zabel M. Prognostic significance of Ki67 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res.* 2008;28:1113-18.
239. Rao S, Sadiya N, Doraiswami S, Prathiba D. Characterization of morphologically benign biologically aggressive meningiomas. *Neurol India.* 2009;57:744-8.
240. Jadali F, Amini E, Esfahani M, Alavi S. Pediatric Medulloblastoma and the prognostic Value of MIB-1 Proliferative Factor. *Iranian Journal of blood and cancer.* 2009;1:7-10.
241. Meurer RT, Martins DT, Hilbig A, Ribeiro Mde C, Roehe AV, Barbosa-Coutinho LM, et al. Immunohistochemical expression of marker Ki-67, neuron, synaptophysin, p53 and HER2 in medulloblastoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Arq Neuropsiquiatr.* 2008;66:385-90.
242. Viswanathan V, Juluri R, Goel S, Madan J, Mitra SK, Gopalakrishnan D. Apoptotic Index and Proliferative Index in premalignant and Malignant Squamous Cell lesion of the Oral Cavity. *J Int Oral Health.* 2015;7:40-3.
243. Nabi U, Nagi AH, Sami W. Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2008;20:44-8.
244. Park D, Kåresen R, Noren T, Sauer T. Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchow Arch.* 2007;451:11-8.
245. Kase S, Adachi H, Osaki M, Shomori K, Honjo S, Goto E, et al. A Case of Malignant Gastrointestinal Stromal Tumor of the Transverse Colon: Evaluation of Proliferation Activity. *Yonago Acta medica.* 2002;45:117-20.

246. Nikolić M, Boban M, Ljubicić N, Bekavac-Beslin M, Tomas D, Pezo-Nikolić B, et al. First report of connexin 43-positive gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Acta Clin Croat.* 2010;49:359-63.
247. Lebe B, Tuna B, Sis B, Yorukoglu K, Kargi A. Mdm2 and p53 expression and Ki67 proliferative index in fibrohistiocytic tumors. *Aegean Pathology Society.* 2004;1:39-46.
248. Tiwari E, Pallipady A, Misra R, Mishra S. P53 and Ki67 Immunostaining in Gastric Biopsies: A Histopathological Study. *International Journal of Scientific Study.* 2005;11:96-101.
249. Al-Khafaji B, Noffsinger AE, Miller MA, DeVoe G, Stemmermann GN, Fenoglio-Preiser C. Immunohistologic analysis of gastrointestinal and pulmonary carcinoid tumours. *Hum. Pathol.* 1988;29:992-9.
250. Lee CH, Turbin DA, Sung YC, Espinosa I, Montgomery K, van de Rijn M, et al. A panel of antibodies to determine site of origin and malignancy in smooth muscle tumors. *Mod Pathol.* 2009;22:1519-31.
251. Li H, Cao Y, Berndt MC, Fender JW, Liu JP. Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene.* 1999;18:6785-94.
252. Segawa N, Gohji K, Azuma H, Iwamoto Y, Ohnishi K, Katsuoka Y. Telomerase activity in renal cell carcinoma by modified telomeric repeat amplification protocol assay. *Int J Urol.* 2003;10:153-9.
253. Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition. *Mol Biotechnol.* 2009;41:194-9.
254. Flores I, Blasco MA. A p53-dependent response limits epidermal stem cell functionality and organismal size in mice with short telomeres. *PloS One.* 2009;4:e4934.
255. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutosudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acid Res.* 2000;28:669-77.
256. Dalla Torre CA, Maciel RM, Pinheiro NA, Andrade JA, De Toledo SR, Villa LL, et al. TRAP-silver staining, a highly sensitive assay for measuring telomerase activity in tumor tissue and cell lines. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:65-8.
257. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:116-22.
258. Yang CT, Lee MH, Lan RS, Chen JK. Telomerase activity in pleural effusions: diagnostic significance. *J Clin Oncol.* 1998;16:567-73.

259. Rha SY, Park KH, Kim TS, Yoo NC, Yang WI, Roh JK, et al. Changes of telomerase and telomere lengths in paired normal and cancer tissues of breast. *Int J Oncol.* 1999;15:839-45.
260. Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallweiner D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer.* 1998;79:8-12.
261. Papadopoulou A, Tranges T, Teixeira MR, Heim S, Dimitriadis E, Tsarouha H, et al. Telomerase activity and genetic alterations in primary breast carcinomas. *Neoplasia.* 2003;5:170-8.
262. Meeker AK, Argani P. Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation?. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2004;9:285-96.
263. Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene.* 2002;21:643-9.
264. Loveday RL, Greenman J, Drew PJ, Monson R, Kerin MJ. Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer. *Int J Cancer.* 1999;84:516-20.
265. Baykal A, Rosen D, Zhou C, Liu J, Sahin AA. Telomerase in breast cancer: A critical evaluation. *Adv Anat Pathol.* 2004;11:262-8.
266. Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition. *Mol Biotechnol.* 2009;41:194-9.
267. Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11:407-21.
268. Zhang X, Komaki R, Wang L, Fang B, Chang JY. Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by on apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2813-23.
269. Kulić Ana. Uloga i značenje telomeraze u raku dojke. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet. Sveučilište u Zagrebu, 2010.
270. Čarkić Jelena. Telomere kao faktor genomske nestabilnosti kod oralnih planocelularnih karcinoma. Doktorska disertacija. Stomatološki fakultet. Univerzitet u Beogradu, 2016.
271. Sakurai S, Fukayama M, Kaizaki Y, Saito K, Kanazawa K, Kitamura M, et al. Telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer.* 1998;83:2060-6.
272. Sakurai S, Fukayama M. Gastrointestinal stromal tumor; its origin, genetic changes, and prognosis. In: Kitamura Y, Miettinen M, editors. *Gastrointestinal stromal tumor: Proceedings of the XXIII International congress of The International Academy of*

Pathology and 14th World Congress of Academic and Environmental Pathology; 2000 Oct 15-20; Nagoya, Japan: Pathol Int; 2000. p. 323-26.

273. Kovkarova E, Stefanovski T, Dimov A, Naumovski J. Telomerase in lung cancer diagnostics. *Radiol Oncol.* 2003;2:109-13.

274. Yoshida K, Sakamoto S, Sumi S, Higashi Y, Kitahara S. Telomerase activity in renal cell carcinoma. *Cancer.* 1998;83:760-6.

275. Fujioka T, Hasegawa M, Suzuki T, Sugimura J, Tanji S, Koike H. Telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Int J Urol.* 2000;7:16-21.

276. Schlichter A, Fiedler W, Junker K, Dahse R, Claussen U, Schubert J. Determination of telomerase activity in multifocal renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 1999;15:577-81.

277. Trbojević B., Ćirić J., Beleslin D., Žarković M., Stojković M., Savić S. Mogućnost u predoperativnoj dijagnozi tiroidnog maligniteta. *Glasnik Instituta za Štitastu zlezdu i metabolizam "Zlatibor".* 2004;11:15-26.

278. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome medicine.* 2016;8:69.

279. Pal D, Sharma U, Khajuria R, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Augmented telomerase activity, reduced telomere length and the presence of alternative lengthening of telomere in renal cell carcinoma: plausible predictive and diagnostic markers. *Gene.* 2015;562:145-51.

280. Buseman CM, Wright WE, Shay JW. Is telomerase a viable target in cancer?. *Mutat Res.* 2012;730:90-7.

281. Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhães A, Costa BM, Mancini A, Song JS, et al. Understanding TERT promoter mutations: a common path to immortality. *Mol Cancer Res.* 2016;14:315-23.

282. Wang K, Liu T, Liu L, Liu J, Liu C, Wang C, et al. TERT promoter mutations in renal cell carcinomas and upper tract urothelial carcinomas. *Oncotarget.* 2014;5:1829-36.

283. Hosen I, Rachakonda PS, Heidenreich B, Sitaram RT, Ljungberg B, Roos G, et al. TERT promoter mutations in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2015;136:2448-52.

284. Casuscelli J, Becerra MF, Manley BJ, Zabor EC, Reznik E, Redzematovic A, et al. Characterization and Impact of TERT Promoter Region Mutations on Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus.* 2017 Sep 24 (ahead of print).

285. Nguyen D, Taheri D, Springer S, Cowan M, Guner G, Mendoza Rodriguez MA, et al. High prevalence of TERT promoter mutations in micropapillary urothelial carcinoma. *Virchows Arch.* 2016;469:427-34.

286. Zheng X, Zhuge J, Bezerra SM, Faraj SF, Munari E, Fallon JT, et al. High frequency of TERT promoter mutation in small cell carcinoma of bladder, but not in small cell carcinoma of other origins. *J Hematol Oncol*. 2014;7:47.
287. Diaz A, Puig-Butillé JA, Valera A, Muñoz C, Costa D, Garcia-Herrera A, et al. TERT and AURKA gene copy number gains enhance the detection of acral lentiginous melanomas by fluorescence in situ hybridization. *J Mol Diagn*. 2014;16:198-206.
288. Xie H, Liu T, Wang N, Björnhagen V, Höög A, Larsson C, et al. TERT promoter mutations and gene amplification: promoting TERT expression in Merkel cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5:10048-57.
289. Vinci S, Giannarini G, Selli C, Kuncova J, Villari D, Valent F, et al. Quantitative methylation analysis of BCL2, hTERT, and DAPK promoters in urine sediment for the detection of non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a prospective, two-center validation study. *Urol Oncol*. 2011;29:150-6.
290. Nikolic N, Carkic J, Ilic Dimitrijevic I, Eljabo N, Radunovic M, Anicic B, et al. P14 methylation: an epigenetic signature of salivary gland mucoepidermoid carcinoma in the Serbian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;125:52-8.
291. Haraguchi K, Yada N, Sato S, Habu M, Hayakawa M, Takahashi O, et al. The methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase is significantly high in oral carcinogenesis. *APMIS*. 2017;125:797-807.
292. Davis CF, Ricketts CJ, Wang M, Yang L, Cherniack AD, Shen H, et al. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2014;26:319-30.
293. Chen Z, Wang J, Bai Y, Wang S, Yin X, Xiang J, et al. The associations of TERT-CLPTM1L variants and TERT mRNA expression with the prognosis of early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Ther*. 2017;24:20-7.
294. Shen N, Lu Y, Wang X, Peng J, Zhu Y, Cheng L. Association between rs2853669 in TERT gene and the risk and prognosis of human cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:50864-7

## BIOGRAFIJA

Jovanka A. Trifunović rođena je 23.10.1981. godine. Osnovnu školu „Vuk Karadžić“ i III gimnaziju završila je u Beogradu sa odličnim uspehom, kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Godine 2000. upisala je Medicinski fakultet u Beogradu, koji je završila u februaru 2007. godine. Pripravnički staž obavila je na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu. Stručni ispit položila je septembra 2007. godine. Specijalističke akademske studije iz oblasti Forenzička patologija i ekspertizna dijagnostika upisala je školske 2007/08. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Završni specijalistički akademski rad pod nazivom: „Sindrom naprasne smrti odojčeta – patoforenički aspekti“, odbranila je septembra 2009. godine i stekla zvanje akademski specijalista forenzičke patologije i ekspertizne dijagnostike. Na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu 2013. godine položila je specijalisatički ispit iz patološke anatomije i stekla zvanje specijalista patološke anatomije. Doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2015/16. godine, iz oblasti Molekularna medicina.

Od 2010. do 2015. godine bila je saradnik (mladi istraživač) na projektu „Morfološke promene na mozgu kod osoba sa transseksualizmom, drugim poremećajima seksualnog identiteta i razvojnih psihijatrijskih poremećaja“ broj 41010, kao i na projektu „Starosne i polne, morfološke i strukturalne razlike bazalnog telencefalona kod osoba sa psihijatrijskim promenama.“ broj 156031. Od jula 2015. zaposlena je kao asistent na Farmaceutsko-zdravstvenom fakultetu - FZF, Univerziteta u Travniku, Bosna i Hercegovina.

Doktorica Jovanka Trifunović je autor i koautor 53 rada, koji su publikovani u naučnim i stručnim časopisima, zbornicima na nacionalnim i inostranim simpozijumima i kongresima, od kojih je sedam objavljeno u celini u naučnim časopisima. Kontinuirano se stručno usavršava u oblasti naučnih disciplina kojima se bavi, neprestano unapređujući svoja znanja i veštine. Usavršavala se u Sloveniji (2009 i 2013) na Medicinskom fakultetu u Ljubljani, Italiji (2012), u Pizi u okviru Evropske škole patologije i Norveškoj (2015) na Norwegian Radium Hospital u Oslu. Član je srpskog lekarskog društva-SLD, Udruženja patologa i citologa Srbije, Društva Srbije za borbu protiv raka, Srpskog anatomskog društva, Evropskog udruženja patologa-ESP.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a: **dr Jovanka Trifunović**

broj upisa: **MM-02/15**

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklin A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 04.06.2018.





---

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : **dr Jovanka Trifunović**

Broj upisa: **MM-02/2015**

Studijski program: **doktorske studije**

Naslov rada

**„Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklin A i Ki-67 i telomerase u  
karcinomu bubrežnih ćelija“**

Mentor: **Prof. dr Gordana Basta-Jovanović**

Komentor: **Prof. dr Ivana Novaković**

Potpisani: **dr Jovanka Trifunović**

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 04.06.2018.



Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklin A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

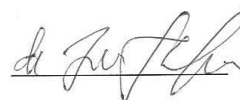
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 04.06.2018.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.