

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dragana D. Latić

ISPITIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA
ĆELIJSKOG CIKLUSA KOD BOLESNIKA SA
KARCINOMOM BUBREŽNIH ĆELIJA

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dragana D. Latić

THE ANALYSIS OF CELL CYCLE PROTEINS
EXPRESSION IN PATIENTS WITH RENAL
CELL CARCINOMA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentor:

Prof. dr Sanja Radojević-Škodrić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za patologiju

Članovi komisije:

Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za humanu genetiku

Prof. dr Nada Tomanović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za patologiju

Prof. dr Miodrag Radunović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet u Podgorici, Katedra za hirurgiju

Datum odbrane: _____

*Mojim voljenim roditeljima,
Ocu Dragoslavu, čoveku sa nepogrešivim osećajem za ljude,
Majci Mici, ženi ispred svog vremena*

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Sanji Radojević-Škodrić na pomoći u životnim situacijama koje se ne zaboravljaju, neizmernoj podršci i dragocenim savetima pomoću kojih sam prevazišla sve teškoće na ovom putu, istraživanje uspešno privela kraju i sazrela kao lekar i čovek

Prof. dr Gordani Basta-Jovanović, mom profesoru, roditelju i prijatelju, jer je prenela na mene ljubav prema patologiji, podstakla moj istraživački duh, motivisala me da upišem i posvetim se doktorskim studijama i osmislim ovo istraživanje

Prof. dr Ivani Novaković, ženi koja ne ume da koristi grube reči, koja je od studentskih dana prepoznala potencijal u meni, sa beskrajnim strpljenjem pristupa svim mojim pitanjima i nedoumicama, omogućila je da ova disertacija sadrži kvalitetnu genetsku analizu i pomogla da pravilno tumačim dobijene rezultate

Prof. dr Nadi Tomanović, koja mi je nesebično pružila znanje, podržala u izradi disertacije i svojim sugestijama podigla njen kvalitet

Prof. dr Miodragu Bobu Radunoviću, koji je verovao u mene kad mnogi nisu i pružio mi bezrezervnu podršku, mogućnost da nastavim školovanje, istrajem u izradi ove disertacije i ostvarim sve svoje profesionalne želje

Doc. dr Draganu Mitroviću, koji uvek ima vremena za mene, na korisnim savetima i potpunom razumevanju

Mojim profesorima na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, prof. dr Jeleni Sopti, prof. dr Tatjani Terzić, prof. dr Svetislavu Tatiću, prof. dr Dimitriju Brašancu, prof. dr Dejanu Opriću, doc.dr Ljiljani Bogdanović i doc. dr Emiliji Manojlović-Gačić, od kojih učim već 15 godina, na pruženom znanju i razumevanju tokom specijalizacije i pohađanja doktorskih studija

Mojoj dragoj, više od prijateljice, asist. dr Gorani Nikolić, na nesebičnoj pomoći oko pripreme publikacije i fotografija, posvećenom vremenu, konstruktivnim kritikama i toplini koja se danas retko sreće

Divnoj dr sci Snežani Pejić, višem naučnom saradniku i mr sci Ivanu Pavloviću, istraživaču saradniku iz Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, od kojih sam puno naučila, na neizmernoj pomoći oko publikacije, tumačenja dobijenih rezultata i svim korisnim sugestijama, bez kojih sigurno ne bih uspešno obavila sve zadatke

Zaposlenima u laboratoriji Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu- laboratorijskim tehničarima Milijani Tašić i Marini Krstić na pomoći oko tehničke obrade uzoraka i imunohistohemijskog bojenja preparata

Zaposlenima u laboratoriji Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu na pomoći u delu koji se odnosi na genetsku analizu

Mojoj kumi, doc. dr Mileni Radunović na savetima, pomoći oko prevoda i prijateljskim sugestijama

Kliničkom centru Crne Gore, Centru za nauku i Centru za patologiju, kolegama koje su preprele moje odsustvo tokom izrade disertacije, omogućile da se nadogradim u profesionalnom smislu, obrazujem se i aktivno učestvujem u međunarodnim skupovima gde sam prezentovala pojedine rezultate ovog istraživanja

Službi za naučno-istraživački rad Medicinskog fakulteta u Beogradu- Sanji Mendan-Pavlović, Filipu Ognjanoviću, Sanji Moravčić i Ani Vukmirici na izuzetnoj saradnji, izdvojenom vremenu i drugarskom bodrenju

Doc. dr Ivanu Soldatoviću i Ivanu Nikoliću za prijateljsku pomoć oko izbora metode statističke obrade podataka i grafičkih prikaza rezultata

Mojoj porodici, prijateljima, dragim kolegama i svim ljudima koje sam nehotice izostavila, a koji su u mene verovali i u delikatnom periodu života pomogli da istrajem u ovako zahtevnom i važnom poslu

ISPITIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA ĆELIJSKOG CIKLUSA KOD BOLESNIKA SA KARCINOMOM BUBREŽNIH ĆELIJA

Karcinom bubrežnih ćelija je najčešći maligni tumor bubrega, naročito muške populacije. U odnosu na klasifikaciju, koja obuhvata brojne histološke varijante, kao i činjenicu da ne postoji specifičan tumor marker, cilj ove doktorske disertacije bio je da se analizira imunohistohemijska ekspresija odabranih proteina koji regulišu ćelijski ciklus (ciklina A, ciklina B, ciklina D1, p16 i p57) u uzorcima iz tumora nakon nefrektomije na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i odeljenju urologije Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović“ u Beogradu u periodu od 2010. do 2013. godine, da se ispita metodom qRT-PCR ekspresija gena koji kodiraju ove proteine (CCNA, CCNB, CCND, CDKN2A, CDKN1C) na DNK izolovanoj iz parafinskih kalupa, kao i da se ispita međusobna korelacija dobijenih rezultata u odnosu na kliničko-morfološke parametre (pol, starost, nuklearni gradus, stadijum bolesti, veličinu tumora, preživljavanje). Ova retrospektivna studija uključivala je 74 pacijenta sa, u proseku, tumorom srednje veličine, svetloćelijskim histološkim tipom, nižim gradusom i nižim TNM stadijumom bolesti. Imunohistohemijski metod je pokazao visok nivo ekspresije ciklina A kod starijih pacijenata ženskog pola, sa većim dijametrom tumora, višim gradusom i višim TNM stadijumom, bez statističke značajnosti, i značajnu ekspresiju u papilarnom histološkom tipu i kod pacijenata sa smrtnih ishodom. Ekspresija CCNA je pokazala normalan nivo ili duplikaciju jednako u grupi visokog gradusa. Ekspresija ciklina D1 opada sa povećanjem starosne kategorije i dimenzije tumora, slična je kod višeg i nižeg stadijuma, razlika prema gradusu je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Najveći procenat pacijenata koji ima ekspresiju ciklina D1 >10% su oni sa svetloćelijskim tipom, što je statistički značajno. Ekspresija CCND je pokazala značajnost koja je blizu konvencionalne kod papilarnog histološkog tipa- trećina bolesnika imala je deleciju gena. Ekspresija p16 >10% je pronađena kod svih pacijenata sa papilarnim RCC ($p < 0.001$). Ekspresija p16 je pokazala trend rasta sa povećanjem starosne kategorije i dimenzija tumora. Broj umrlih bio je veći u grupi pacijenata sa p16 >10%, i to je zanimljiv rezultat, jer je p16 tumor supresor. Razlika u ekspresiji CDKN2A je na konvencionalnom nivou značajnosti (isključeni pacijenti sa duplikacijom), postoji statistički značajna razlika između tri grupe ekspresije CDKN2A gena (delecija i normalan nalaz) u korelaciji sa histološkim tipom. Smrtni ishod je bio manje učestao kod pacijenata sa delecijom, bez statističke značajnosti. Pacijenti sa normalnom ekspresijom CDKN1C uglavnom su imali p57 >5% (jedan slučaj sa duplikacijom i p57 <5%).

Medijana p57 je bila dvostruko veća kod muškog pola, i taj je rezultat bio blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Medijana p57 bila je veća kod starijih i većih dimenzija tumora, kao i kod pacijenata sa smrtnim ishodom, ali bez statističke značajnosti. Ekspresija p57>5% bila je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti kod tumora većih od 7cm, sa svetloćelijskim histološkim tipom i smrtnim ishodom. Grupa sa normalnom ekspresijom CDKN1C imala je lošiji klinički ishod. Urađena je Koksova univarijabilna regresiona analiza kliničkih karakteristika i rezultati su jasni –prediktori preživljavanja su starost, dimenzije tumora i stadijum bolesti. Koksova univarijabilna regresiona analiza ekspresije ispitivanih gena i proteina je pokazala da ciklin A može biti prediktor smrtnog ishoda kod bolesnika sa karcinomom bubrežnih ćelija. Backward metoda multivarijabilne regresije pokazala je da su značajni prediktori preživljavanja starost, gradus, stadijum bolesti i ekspresija ciklina A. Ovakvi rezultati ekspresije ciklina A, ciklina D1 i CDKN2A ukazuju na značaj daljih istraživanja uloge ćelijskog ciklusa u nastanku bolesti i kliničkom ishodu kod bolesnika sa karcinomom bubrežnih ćelija.

Ključne reči: karcinom bubrežnih ćelija (RCC), ciklin A, ciklin D, p16, p57, amplifikacija, imunohistohemija, qRT-PCR

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: molekularna medicina

UDK

THE ANALYSIS OF CELL CYCLE PROTEINS EXPRESSION IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Renal Cell Carcinoma is the most common renal malignant tumor, especially within male population. According to renal cell carcinoma classification, which considers many histological variants and the fact there is no specific tumor marker, the aim of this doctoral dissertation was to analyze the immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins (cyclin A, cyclin B, cyclin D1, p16 and p57) in tumor samples after nephrectomy on Urology Clinic of Clinical Center of Serbia and Urology department of Clinical-hospital Center „Dr Dragisa Misovic“ in Belgrade from 2010 to 2013, to analyze qRT-PCR expression of genes encoding these proteins (CCNA, CCNB, CCND, CDKN2A, CDKN1C) on DNA isolated from paraffin blocks, and to correlate the results in relation to clinical-pathological parameters (sex, age, nuclear grade, stadium, tumor size and survival). This retrospective study included 74 patients with in average middle-sized tumors, clear cell histological type, low-grade and low TNM stadium. Immunohistochemical method showed high level of cyclin A expression in older, female patients, with large tumor size, high grade, and high TNM stadium, without statistical significance, and significant expression in papillary histological type and in patients with deadly outcome. CCNA expression had normal expression level and duplication equally in the group with high-grade RCC. Cyclin D1 expression was lower contrary to tumor size and age, it is alike in lower and higher stadium, but difference according to grade was near to conventional level of significancy. Most patients with cyclin D1>10% expression had clear cell type, which was statistically significant. CCND expression was near to conventional significancy in papillary histological type- third of patients had deletion of CCND gene. p16>10% expression was found in all the patients with papillary RCC ($p<0.001$). p16 expression was higher in older patients and bigger tumor size. We had more patients with deadly outcome in group with p16>10%, and this is an interesting result, considering p16 is tumor suppressor protein. The difference in CDKN2A expression had conventional level of significance (patients with duplication were excluded), there is a statistically significant difference between three groups of CDKN2A gene expression (deletion and normal result) correlated to histological type. Deadly outcome was less often in patients with gene deletion, without statistical significance. Patients with normal CDKN1C expression mostly had p57>5% (one case with duplication and p57<5%). p57 median was

duplicated within male population, and this result was near to conventional level of significance, median p57 was higher in older patients with large tumor size with deadly outcome, but these results were not significant. Expression p57>5% was near to conventional level of significance in tumors larger than 7cm, with clear cell histological type and deadly outcome. Group with normal expression CDKN1C had worse clinical outcome. Cox univariable regression was done for clinical-morphological parameters, and the results were clear- survival predictors are age, tumor size, grade and stadium. Cox univariable regression for gene and protein expression showed that cyclin A can be deadly outcome predictor or survival predictor in patients with renal cell carcinoma. Backward method of multivariable regression showed that survival predictor are age, stadium and cyclin A expression. These results of cyclin A, cyclin D1 and CDKN2A expression indicate the importance of further research of cell cycle role in cancer development and clinical outcome in patients with renal cell carcinoma

Keywords: renal cell carcinoma (RCC), cyclin A, cyclin D1, p16, p57, amplification, immunohistochemistry, qRT-PCR

Scientific field: medicine

Narrow scientific field: molecular medicine

SADRŽAJ:

1. Uvod	1
Anatomska građa bubrega.....	1
Istorijski aspekti.....	3
Epidemiologija.....	4
Etiologija.....	4
Klasifikacija tumora bubrega.....	6
Gradiranje.....	9
TNM stadijum.....	9
Histološki tip.....	11
Dijagnostika karcinoma bubrežnih ćelija.....	18
Prognoza.....	19
Ćelijski ciklus.....	21
Genetski profil karcinoma bubrežnih ćelija prema SZO.....	24
2. Ciljevi istraživanja	27
3. Materijal i metode	28
Materijal	28
Kliničko- morfološki parametri.....	28
Pol i starost bolesnika.....	28
Histološki tip.....	29
Nuklearni gradus.....	30
TNM stadijum.....	30
Veličina tumora.....	30
Preživljavanje.....	30
Metod	31
Patohistološka obrada uzoraka.....	31
Patohistološka dijagnostika.....	32

Imunohistohemijska metoda.....	33
Genetska analiza.....	36
Izolacija DNK iz parafinskih kalupa.....	36
qRT-PCR za ciklin A, ciklin D1, p16, p57.....	37
Statistička obrada podataka.....	38
4. Rezultati.....	40
CiklinA.....	42
Deskriptivna statistika ciklina A i CCNA.....	42
Distribucija CCNA u odnosu na ekspresiju ciklina A.....	47
Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju ciklina A.....	49
Ciklin A i preživljavanje.....	53
CCNA u odnosu na kliničko-morfološke parametre.....	54
CCNA i preživljavanje.....	56
Ciklin D1.....	58
Deskriptivna statistika ciklina D1 i CCND.....	58
Distribucija CCND u odnosu na ekspresiju ciklina D1.....	63
Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju ciklina D1.....	65
Ciklin D1 i preživljavanje.....	69
CCND u odnosu na kliničko-morfološke parametre.....	71
CCND i preživljavanje.....	72
p16.....	74
Deskriptivna statistika p16 i CDKN2A.....	74
Distribucija CDKN2A u odnosu na ekspresiju p16.....	79
Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju p16.....	81
p16 i preživljavanje.....	85
CDKN2A u odnosu na kliničko-morfološke parametre.....	87
CDKN2A i preživljavanje.....	89
p57.....	90
Deskriptivna statistika p57 i CDKN1C.....	90
Distribucija CDKN1C u odnosu na ekspresiju p57.....	95

Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju p57.....	97
p57 i preživljavanje.....	101
CDKN1C u odnosu na kliničko-morfološke parametre.....	102
CDKN1C i preživljavanje.....	103
Preživljavanje.....	104
5. Diskusija.....	108
6. Zaključci.....	116
7. Literatura.....	117

1. UVOD

Karcinom bubrežnih ćelija (renal cell carcinoma-RCC) je grupa malignih tumora porekla epitela bubrežnih kanalića. RCC je najčešći primarni maligni tumor bubrega (više od 90%) kod odraslih osoba oba pola (1). Javlja se kao sporadična i familijarna bolest, a istraživanja o genetskoj osnovi uticala su na nastanak nove klasifikacije, zasnovane na molekularnom poreklu tumora (2). Različiti histološki tipovi RCC ispoljavaju specifične kliničke manifestacije, ali je važno istaći da je moguća pojava rane metastatske bolesti i veoma agresivnog ponašanja tumora. Iako postoje zvanično priznati kliničko-morfološki prognostički parametri za RCC, kod nekih bolesnika sa povoljnim prognostičkim parametrima dolazi do ranog razvoja metastaza i nepovoljnog ishoda bolesti.

ANATOMSKA I HISTOLOŠKA GRAĐA BUBREGA

Bubreg je parni organ, retroperitonealne lokalizacije. Oblikom podseća na zrno pasulja, dužine 11-12cm, širine 5-8 cm, a debljine oko 3 cm. Svaki bubreg sa nadbubrežnom žlezdom okružen je Gerotovom fascijom (masnom kapsulom) i obavijen tankom vezivnom kapsulom.

Spoljašnji deo bubrega je kora debljine oko 1cm, a unutrašnji medula. Medulu čine 10-18 medularnih piramida. Piramide imaju bazu, od koje se u koru šire medularni zraci, tj. paralelni sabirni kanalići, a na vrhu piramide, koji je postavljen medijalno, nalaze se papile, koje se otvaraju u male čašice. Medularni zraci sa okolnim korteksom čine lobuluse, a bubrežni lobus obuhvata medularnu piramidu sa delom korteksa koji je okružuje. Između piramida nalazi se kora u vidu Bertinijevih kolumni.

Sinus, medijalni deo bubrega, obuhvata krvne i limfne sudove, nerve i bubrežnu karlicu, okružene masnim tkivom. Prošireni deo uretera, bubrežna karlica se grana u dve do tri velike čašice, a one u nekoliko manjih (3–6).

Osnovna funkcionalna jedinica bubrega je nefron, a svaki bubreg ima od 1-4 miliona nefrona. Osim kortikalnih nefrona, oko 1/7 broja nefrona nalazi se na prelazu kore u medulu, tj. na kortikomedularnoj granici, i to su jukstaglomerularni nefroni.

Svaki nefron je izgrađen od renalnog, tj. bubrežnog korpuskula i tubula. Bubrežni korpuskul predstavlja klupko kapilara, 10-50 kapilarnih petlji, koji okružuje Bowmanova kapsula. Između dva lista Bowmanove kapsule- parijetalnog i visceralnog nalazi se urinarni prostor. Visceralni list naleže na kapilare glomerula (4).

Glomerul je loptastog oblika, prosečnog promera 200nm i ima vaskularni i urinarni pol. Na vaskularnom polu ulazi *vas afferens*, dovodna arteriola, a izlazi eferentna arteriola, *vas efferens*. Od urinarnog pola kreće proksimalni savijeni kanalić.

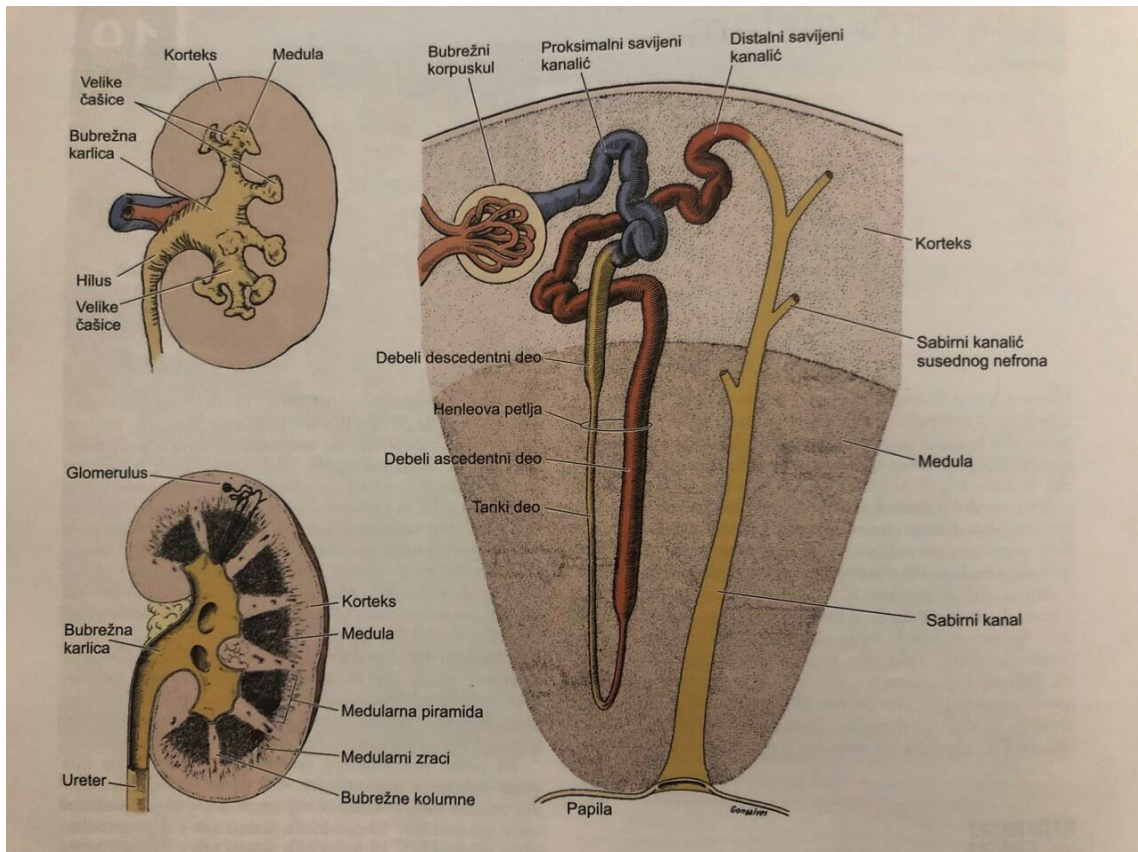
Tubul sačinjavaju proksimalni savijeni kanalić, Henleova petlja i distalni savijeni kanalić.

Proksimalni kanalić obložen je kubičnim ćelijama sa četkastim pokrovom i obuhvata *pars convoluta* i *pars recta*.

Henleova petlja ima U oblik, sastoji se od *pars recta* proksimalnog tubula (debeli nishodni krak), tanki nishodni krak, tanki ushodni krak i *pars recta* distalnog tubula- debeli ushodni krak (Slika 1) (6).

Distalni kanalić se nastavlja na ushodni deo Henleove petlje i obložen je kubičnim epitelom bez mikrovila (3,6-8).

Uočava se razlika u prosečnoj težini bubrega u odnosu na pol, pa je prosečna težina bubrega kod odrasle osobe muškog pola je 125-170g, a kod ženskog 115-155g.



Slika 1. Prikaz anatomije i histologije bubrega (modifikovano po Žunkveiru (Junqueira (6)) prof. dr Vesna Lačković i prof. dr Vera Todorović za „Osnove histologije“, 11. izdanje, prevod sa engleskog)

ISTORIJSKI ASPEKTI

Prvi makroskopski opis i klasifikaciju tumora bubrega dao je Kolling (1826), a poreklo karcinoma od epitela bubrežnih kanalića naveo je Robin (1855) (9–11). Postoje podaci (Grawitz, 1833) koji ukazuju da ovaj karcinom potiče od ostataka nadbubrega unutar bubrežne kapsule, jer postoji sličnost između ovih malignih ćelija i ćelija kore nadbubrega, međutim, početkom XX veka utvrđeno je da te tvrdnje nisu tačne i da je tumor porekla epitela bubrežnih kanalića (12).

EPIDEMIOLOGIJA

Karcinom bubrega predstavlja 2-3% svih malignih tumora odraslih osoba, a već je istaknuto da je najčešći primarni maligni tumor bubrega (2). Češće oboljevaju muškarci (podaci su različiti u literaturi, dva do tri puta češće muški pol) u odnosu na žene (prema najnovijim podacima WHO odnos muškarci:žene=2:1), između šeste i sedme decenije života (2). Incidencija naglo raste nakon 40-te godine života, a kod oba pola rizik je manji nakon 75-te godine života. Kad posmatramo zastupljenost svih malignih oboljenja, kod osoba muškog pola karcinom bubrežnih ćelija nalazi se na devetom mestu, dok je kod žena na četrnaestom (13). Uočena je niska incidencija u Africi i Aziji, a u područjima sa razvijenom industrijom incidencija raste, pa tako imamo primer Japana, gde je na visokoj, šestoj poziciji svih malignih bolesti osoba muškog pola (14). Primećeno je da veoma visoku incidenciju imaju države sa visokim ili veoma visokim stepenom socio-ekonomskog razvoja, na primer Republika Češka je prema dostupnim podacima država sa najvišom incidencijom karcinoma bubrežnih ćelija (13). Bitan je podatak da od svih malignih bolesti, RCC zauzima šesnaesto mesto kao uzrok smrti u svetu.

ETIOLOGIJA

Dosadašnja istraživanja nisu utvrdila jasan uzrok nastanka ove bolesti, ali su prepoznati faktori rizika, oblici ponašanja kao i izloženost štetnim materijama, koje mogu uticati na razvoj karcinoma bubrežnih ćelija.

U literaturi može pronaći podatak da pušenje duvana povećava rizik za obolevanje (39% obolelih muškaraca su pušači) (14). Povećan rizik se odnosi na pušače u odnosu na ljude koji nikad nisu konzumirali cigarete (15), kao i dozno-zavisno povećanje rizika (sa povećanjem broja cigareta). Ovi podaci se moraju tumačiti sa dozom rezerve, u istraživanjima tumora bubrega se često RCC ne razdvaja jasno od urotelijalnog karcinoma bubrežne karlice, za čiji je nastanak dokazan uticaj pušenja.

Eksponiranost drugim štetnim materijama, kao što su azbest, kadmijum, organski rastvarači, arsen, pesticidi, herbicidi, toksini gljiva takođe može da dovede da pojave ove bolesti (14). Za

arsen postoje podaci da unošenje npr. preko vode za piće ili tokom industrijskih procesa povećava rizik za RCC za 30% (14). U novije vreme ističe se štetnost trihloretilena, odmašćivača metala sa širokom primenom u industriji, te je IARC svrstala trihloretilen u I grupu karcinogena (16).

Gojaznost se ističe kao veoma značajan rizikofaktor (17–19). Ukoliko je BMI>29 incidencija se udvostručuje, a ukoliko je BMI 25-30 kg/m², incidencija je viša 50% (14).

Isto tako, postoje podaci da polni hormoni, pre svega estrogen može imati značajnu ulogu u razvoju RCC kod gojaznih, ali ne postoje jasni i precizni podaci o ovim udruženim mehanizmima nastanka pomenute bolesti. U literaturi se pominje i povišen nivo progesterona, kao i evidentirana insulinska rezistencija. Kod žena se ističe značaj pariteta, ali nije redak slučaj da žene koje imaju više dece imaju i povišenu telesnu težinu, te je moguće da je u pitanju sadejstvo oba faktora. Postoje rezultati istraživanja koji ukazuju na povišen rizik za razvoj RCC nakon histerektomije, dok nije uočena korelacija između uzimanja oralnih kontraceptiva i RCC (20).

Rizik će biti povišen i ukoliko postoji arterijska hipertenzija, a kao mogući uzročnik pominje se i upotreba nekih diuretika u lečenju hipertenzije (21).

Stečena cistična bolest bubrega kod pacijenata na dugotrajnoj hemodijalizi je takođe prepoznata kao stanje koje je udruženo sa povišenom incidencijom RCC specifičnih karakteristika, o čemu će kasnije biti reči (22).

Iako je najčešće sporadična bolest u pitanju, ne treba zanemariti ni molekularna istraživanja u pravcu otkrivanja preciznih genetskih faktora za nastanak RCC, kao što je npr. poznata uloga VHL supresor gena na hromozomu 3p25-26 (23,24). Poznato je da bolest kod bliskog rođaka (prvo koleno) udvostručuje mogućnost za razvoj bolesti. Neki od familijarnih kancerskih sindroma podrazumevaju i nastanak RCC, te je do danas gotovo svaki histološki tip RCC dijagnostikovao u okviru određenih sindroma; primer su multipli bilateralni svetloćelijski RCC u Von Hippel Lindau sindromu i kod hromozom-3 translokacijskog sindroma, papilarni RCC u familijarnom papilarnom karcinomu tireoidne žlezde i RCC udružen sa hereditarnom leiomiomatozom, zatim Birt-Hogg-Dube (BHD) sindrom, tuberozna skleroza i drugi.

Svaki od navedenih faktora rizika može delovati samostalno ili udruženo, a nijedan nije izdvojen kao visoko specifičan, te je najverovatnije da je RCC multifaktorijalna bolest, na šta ukazuju podaci dostupni u literaturi.

KLASIFIKACIJA TUMORA BUBREGA

Sve do nedavno karcinom bubrežnih ćelija smatran je monomorfnom bolešću koja nastaje iz zajedničke prekursorske ćelije, ali različitih histoloških i kliničko-bioloških karakteristika. Pomoću citogenetike i molekularne biologije utvrđeno je da podtipovi RCC imaju različite genetske abnormalnosti, što se odražava u patohistološkom izgledu, biološkom ponašanju i fenotipskim karakteristikama. Različiti metabolički putevi mogu objasniti biološku raznolikost karcinoma bubrežnih ćelija. Precizno određivanje podtipa RCC može biti presudno za primenu adekvatnog terapijskog protokola.

Klasifikacija prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO, 2016.)

(World Health Organization (WHO))

Tumori bubrežnih ćelija (renal cell carcinoma)

Svetloćelijski karcinom bubrežnih ćelija- *clear cell* RCC

Multilokularna cistična renalna neoplazma niskog malignog potencijala

Papilarni karcinom bubrežnih ćelija

RCC udružen sa hereditarnom leiomiomatozom

Hromofobni RCC

Collecting duct (karcinom sabirnih kanalića) RCC

Medularni karcinom bubrega

RCC udružen sa MITF translokacijom

RCC udružen sa deficijencijom sukcinat-dehidrogenaze

Mucinozni tubularni i „*spindle cell*“ karcinom

Tubulocistični RCC

RCC udružen sa stečenom cističnom bolešću bubrega

Svetloćelijski papilarni RCC

Neklasifikovani

Papilarni adenom

Onkocitom

Metanefrički tumori

Metanefrički adenom

Metanefrički adeno fibrom

Metanefrički stromalni tumor

Nefroblastični i cistični tumori koji se javljaju većinom kod dece

Nefrogeni ostaci

Nefroblastom

Delimično cistično diferentovan nefroblastom

Pedijatrijski cistični nefrom

Mezenhimalni tumori

Mezenhimalni tumori koji se javljaju većinom kod dece

Svetloćelijski (*clear cell*) sarkom

Rabdoid tumor

Kongenitalni mezoblastični nefrom

Osificirajući renalni tumor infantilnog doba

Mezenhimalni tumori koji se javljaju većinom kod odraslih

Leiomyosarkom

Angiosarkom

Rabdomiosarkom

Osteosarkom

Sinovijalni sarkom

Ewing sarkom

Angiomiolipom

Epiteloidni angiomiolipom

Leiomiom

Hemangiom

Limfangiom

Hemangioblastom

Tumor jukstaglomerularnih ćelija

Tumor renomedularnih intersticijumskih ćelija

Švanom

Solitarni fibrozni tumor

Familija mešovutih epitelijalnih i stromalnih tumora

Adultni cistični nefrom

Mešoviti epitelijalni i stromalni tumor

Neuroendokrini tumori

Dobro diferentovani neuroendokrini tumor

Krupnoćelijski neuroendokrini karcinom

Sitnoćelijski neuroendokrini karcinom

Paragangliom

Mešoviti tumori

Hematopoetske neoplazme bubrega

Tumori germinativnih ćelija

Metastatski tumori

GRADIRANJE

Prema SZO (WHO/ISUP (International Society of Urological Pathology)) sistem gradiranja u upotrebi podrazumeva 4 gradusa:

- 1- Jedarca nisu uočljiva ili su odsutna, bazofilna na uveličanju x400
- 2- Jedarca su uočljiva, eozinofilna na uveličanju x400, ali nevidljiva na uveličanju x100
- 3- Jedarca uočljiva, eozinofilna na uveličanju x100
- 4- Izražen jedarni plemorfizam, multinuklearne džinovske ćelije, prisustvo sarkomatoidne ili rabdoidne dediferencijacije

Prilikom gradiranja, neophodno je da se na HE pločicama u tumorskom tkivu uoče najlošije diferentovana područja. Graduse 1-3 determinišu osobine nukleolusa- prisustvo ili odsustvo, vidljivost na određenom uveličanju, a gradus 4 je loše diferentovan histološki tip, sa bizarnim, džinovskim, često multinuklearnim ćelijama.

Preporučeno je da ranije korišćen Fuhrman-ov sistem bude zamenjen ovim, a kako savremena klasifikacija podrazumeva i novoopisane histološke tipove, kao i reklasifikaciju ranijih podtipova, preporuka je da se upotrebljava WHO/ISUP, pre svega za svetloćelijski i papilarni RCC (25,26).

TNM STADIJUM

U upotrebi je TNM klasifikacija (prema SZO, tj. WHO iz 2016.) za određivanje stadijuma bolesti. Stadijum bolesti određuje se prema jasno definisanim kriterijumima, u zavisnosti od veličine primarnog tumora, prisustva limfovaskularne invazije, invazije masnog tkiva sinusa bubrega, perirealnog tkiva, proboja Gerotove fascije i invazije ipsilateralne nadbubrežne žlezde, regionalnih limfnih nodusa i postojanja udaljenih metastaskih depozita, što ima terapijski i prognostički značaj (27,28).

Klinički bitan podatak je veličina primarnog tumora, jer tumor dijametra do 7cm svrstavamo u pT1, a preko 7cm u pT2.

TNM klasifikacija karcinoma bubrežnih ćelija (13,29):

T- primarni tumor

Tx Primarni tumor ne može da se odredi

T0 Primarni tumor nije prisutan

T1 Tumor dimenzija ≤ 7 cm, ograničen na bubreg

T1a Tumor dimenzija ≤ 4 cm

T1b Tumor dimenzija > 4 cm ali ≤ 7 cm

T2 Tumor dimenzija > 7 cm, ograničen na bubreg

T2a Tumor dimenzija > 7 cm ali ≤ 10 cm

T2b Tumor dimenzija > 10 cm

T3 Tumor se širi u velike vene ili perinefrično tkivo, ali ne u ipsilateralnu nadbubrežnu žlezdu i ne probija Gerotovu fasciju

T3a Tumor se širi u venu kavu ili njene grane (koje sadrže mišićni sloj) ili tumor zahvata perirenalno/masno tkivo sinusa, ali ne invadira Gerotovu fasciju

T3b Tumor se širi u venu kavu ispod dijafragme

T3c Tumor se širi u venu kavu iznad dijafragme ili invadira zid vene kave

T4 Tumor invadira Gerotovu fasciju (uključujući i zahvatanje ipsilateralne nadbubrežne žlezde)

N-regionalni limfni nodusi

Nx Regionalni limfni nodusi nisu dostavljeni

N0 Metastaze nisu prisutne u regionalnim limfnim nodusima

N1 Metastaze u regionalnim limfnim nodusima

M-udaljene metastaze

M0 Udaljene metastaze nisu prisutne

M1 Prisutne su udaljene metastaze

HISTOLOŠKI TIP

Prema podacima iz klasifikacije SZO (WHO) i drugim dostupnim podacima iz literature u daljem tekstu su istaknute glavne karakteristike svih navedenih histoloških varijanti RCC (1,14).

Svetloćelijski RCC (ccRCC) naziv je dobio po ćelijama svetle i eozinofilne citoplazme, najčešće je zastupljen (više od 65% dijagnostikovanih slučajeva). Tipičan svetloćelijski RCC je sporadičan, unilateralan, solitaran tumor. Makroskopski se nalazi u korteksu u vidu nodulirane promene, okružene pseudokapsulom, jasno ograničene od okolnog tkiva bubrega (Slika 2).



Slika 2. Makroskopski izgled svetloćelijskog RCC- jasno ograničen tumor u donjem polu bubrega, svetlo-žute boje, sa fokusima krvarenja i nekroze. *Ljubaznošću asist. dr Gorane Nikolić

Na preseku je žućkaste boje, usled povišene količine lipida, a česti su fokusi nekroze, krvarenja, kalcifikacije pa i osifikacije (Slika 3).



Slika 3. Makroskopski izgled svetloćelijskog RCC- jasno ograničen tumor u donjem polu bubrega, sa cističnom degenacijom, krvarenjem i nekrozom. **Ljubaznošću asist. dr Gorane Nikolić*

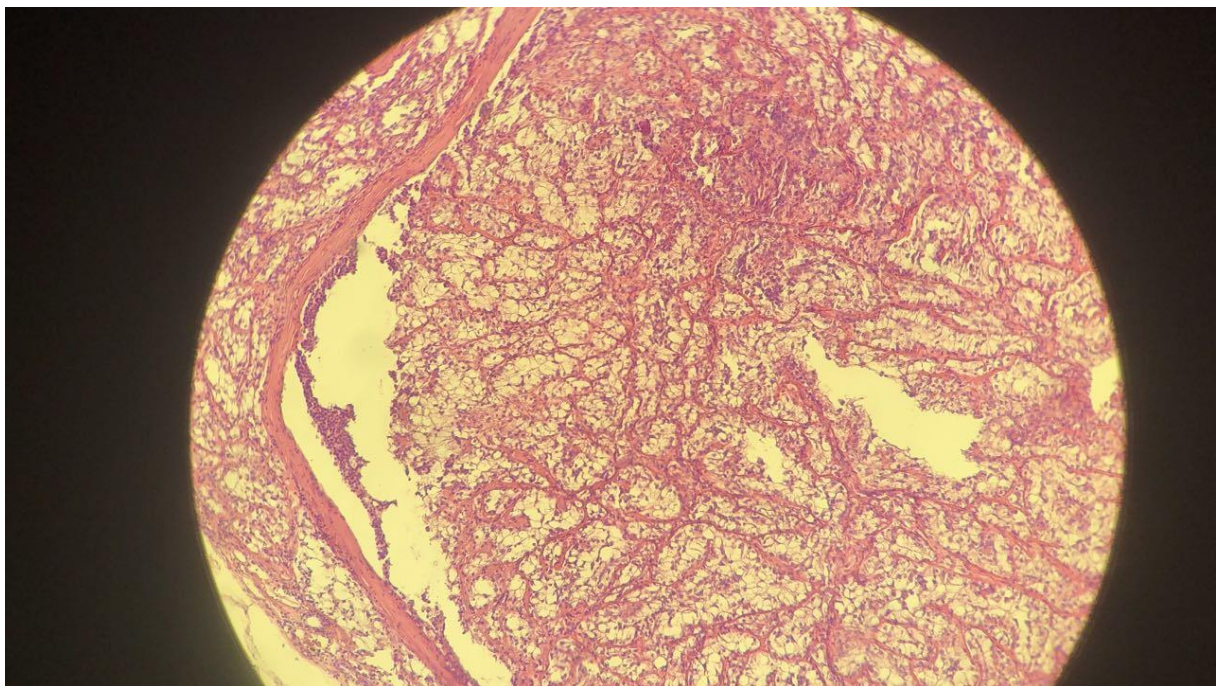
Bilateralni i multifokalni tumori su retki, vezani su za genetske mutacije i kancerske sindrome. Histološki tumor je acinarne (bez uočljivih lumena) i alveolarne građe (sa lumenima u središnjem delu, koji mogu biti dilatirani u manje i veće cistične prostore), kao i manja solidna polja, retko se viđa pseudopapilarni i tubularni obrazac rasta, kao i centralni deo tumora sa fibromiksoidnom komponentom. Tumor ima razvijenu mrežu kapilara i krvnih sudova tankog zida, što je jedna od histoloških karakteristika (Slika 4). Često tumor izaziva jak inflamatorni odgovor, guste infiltrate limocita, plazmocita i neutrofilnih granulocita. Čelije imaju jasnu membranu, citoplazma je karakteristično svetla, što je zapravo posledica laboratorijske obrade i razlaganja citoplazmatskih lipida i glikogena. Eozinofilna citoplazma je zastupljena kod tumorskih ćelija višeg gradusa. Izgled jedra i jedarceta se razlikuje u odnosu na gradus po WHO/ISUP-u, kako je već precizno pojašnjeno predstavljaju glavnu histološku odrednicu za gradiranje ccRCC. Sarkomatoidna i rabdoidna dediferencijacija su loš prognostički parametar, ali se srećom ne javljaju veoma često, u literaturi se postotak takvih tumora kreće oko 5-10%.

Imunohistohemijski profil: Pax2+, Pax8+, CAM5.2+, CAE1/CAE3+, CAIX+, CK7-, CD10+, vimentin+.

Metastazira limfogeno u limfne noduse u okolini hilusa bubrega, paraaortalne i parakavalne, a moguća je i invazija *ductus thoracicus*-a. Hematogeno se širi putem renalnih vena i vene kave, tako da se sekundarni tumorski depoziti mogu naći pre svega u plućima. Iz renalnih vena moguća je propagacija tumora putem lumbalnih vena u paravertebralne venske pleksuse i venske sinuse dure i pelvične vene, tako da su zabeležene metastaze u centralnom nervnom sistemu, kostima, regionima glave i vrata.

Ovakav obrazac limfovaskularne invazije klinički može izgledati neuobičajeno, te su zabeleženi slučajevi pojave sekundarnih depozita ccRCC na neuobičajenim lokalizacijama, kao što su srce, koža, pankreas (30).

Najčešće metastazira u pluća (75%), jetru i kosti (40%), meka tkiva (34%), pleuru (31%), nadbubreg (22%), ali zabeležene su i metastaze u srcu, štitastoj žlezdi, koži, mozgu, digestivnom traktu, pankreasu, slezini, urotraktu i, interesantno, bubregu, kad je u pitanju maligni tumor kontralateralnog bubrega.



Slika 4. Histološki izgled svetloćelijskog RCC, gradus II po WHO/ISUP; HEx200

Multilokularni cistični tumor bubrega niskog malignog potencijala je veoma karakterističnog makroskopskog i mikroskopskog izgleda. Tumor grade brojne cistične promene, ispunjene žućkastim seroznim, želatinoznim ili hemoragičnim sadržajem.

Mikroskopski, ciste su obložene ćelijama svetle citoplazme, u zidu cisti se nalaze pojedinačne i grupice tumorskih ćelija (31). Zastupljen je u manje od 1% slučajeva, ima odličnu prognozu. Diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir benigne multilokularne ciste bubrega, ccRCC sa cističnom nekrozom, cistični nefrom, svetloćelijski papilarni RCC sa predominantno cističnim obrascem rasta. Važno je razlikovati ovaj tumor od ccRCC u regresiji.

Papilarni RCC (pRCC) drugi po učestalosti RCC (približno 20%), klinički je u većini slučajeva asimptomatski tumor. Karakteristična je hemoragija usled ishemijske nekroze. Makroskopski je jasno ograničen, okružen pseudokapsulom, žućkasto-sivkaste boje, ili tamno braon u područjima krvarenja i sa čestim kalcifikacijama, trošne konzistencije. Histološki, uočava se papilarni obrazac rasta, dobro razvijene fibrovaskularne peteljke, obložene tumorskim ćelijama, u kojim se uočavaju penušavo transformisani makrofagi i psamomska telašca. Deli se na dva histološka podtipa:

Tip I kod kojeg su papile obložene tumorskim ćelijama svetle citoplazme sa nukleusima koji su raspoređeni u jednom redu

Tip II sa pseudostratifikovanim jedrima

Imunohistohemijski profil: CAE1/CAE3+, CAM5.2+, HMWCK+, CK7+ (tip I češće nego tip II), CD10+, EMA+, AMACR+, RCC+, vimentin+, CD10+.

Metastazira opisanim limfo-vaskularnim putem, ali je ovaj histološki tip RCC češće uočen u perirenalnom masnom tkivu, i češće je zahvatanje limfnih nodusa hilusa.

RCC udružen sa hereditarnom leiomiomatozom je redak tip RCC, koji se dokazuje prisustvom mutacije gena za fumarat hidratazu (FH), kliničkom detekcijom multiplih leiomioma kože i uterusu i patohistološkom verifikacijom RCC (gotovo prema pravilu papilarni histološki tip, sa mogućom varijantom karakterističnog infiltrativnog rasta i patohistološkim preklapanjem sa *collecting duct* histološkim tipom).

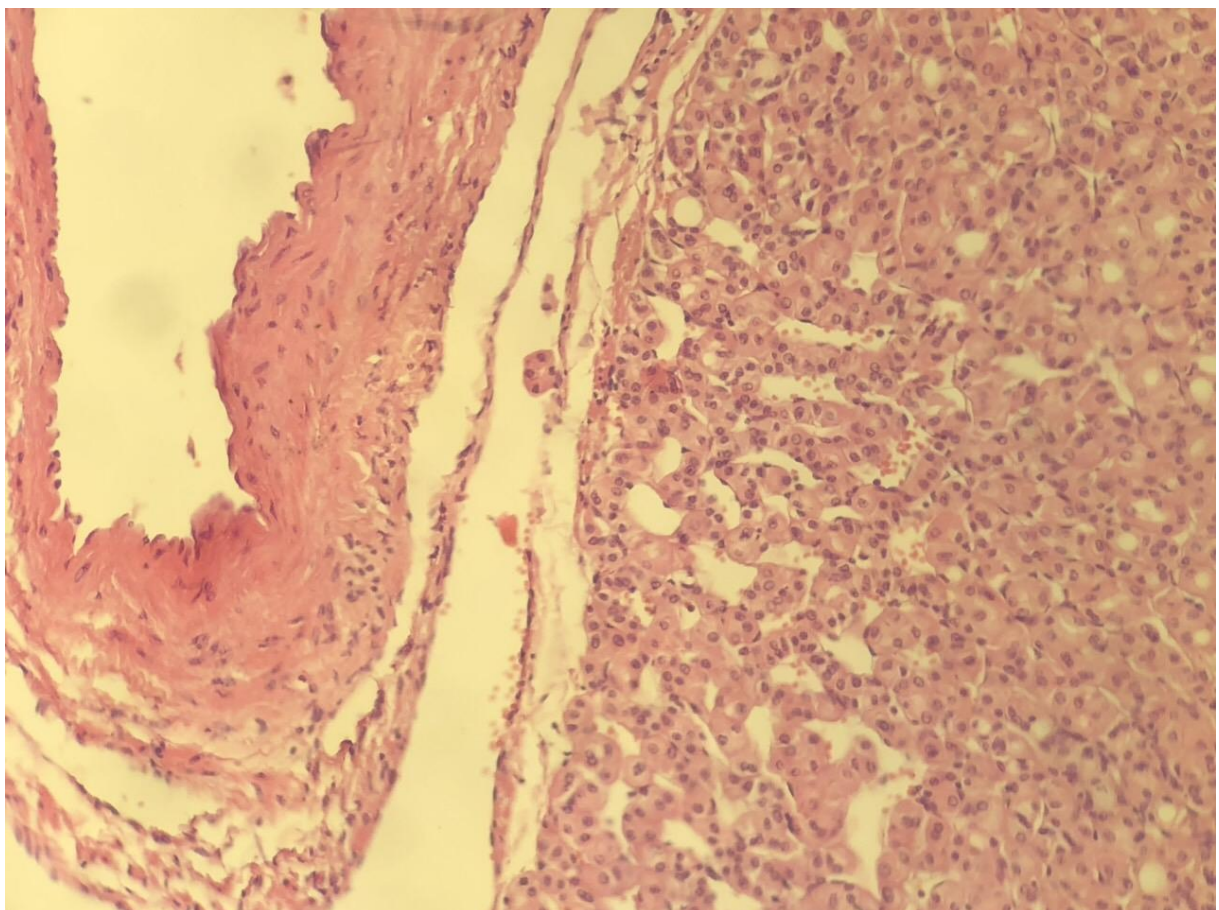
Hromofobni RCC (ChRCC) je histološki tip RCC, klinički često nem, mahom sporadičan, sa učestalošću od 7-8%. Makroskopski su veliki tumori, prosečnog dijametara 7cm i veći, jasno ograničeni, neinkapsulirani, svetlo do tamno braon boje, sa uočljivim centralnim ožiljkom. Histološki tumorske ćelije tipično grade manje i veće plaže i trake, razdvojene fibroznim vezivnim septama, a zabeležene su i varijante sa formiranjem manjih gnezda,

cistični, papilarni, tubularni. Izgled tumorskih ćelija je karakterističan, podseća na ćelije biljnog porekla, sa veoma prominentnom ćelijskom membranom, svetlom retikularnom citoplazmom, i nukleusom sa jasnim perinuklearnim haloom. Eozinofilna varijanta tumorskih ćelija često ima okrugla jedra, mada su zastupljene i ćelije sa izgledom koilocitne atipije-karakteristično skvrčena jedra, zgusnutog hromatina, sa perinuklearnim haloom. Sarkomatoidna dediferencijacija je takođe veoma česta. Diferencijalno dijagnostički bitno je razlikovanje od onkocitoma (pre svega eozinofilna varijanta ChRCC, slika 5).

Imunohistohermijski profil: vimentin-, ks-cadherin+, CK7+, CD117+.

Histohermijsko bojenje na Halejevo gvožđe je najčešće difuzno pozitivno.

Za razlikovanje onkocitoma, svetloćelijskog RCC i hromofobnog korisna su antitela DOG1, CK7, CD117 i ciklin D1 (32).



Slika 5. Histološki izgled ChRCC (eozinofilna varijanta), HEx200.

Collecting duct RCC je zastupljen u manje od 1% od svih slučajeva RCC. To je tumor sa veoma agresivnim kliničkim ponašanjem, daje tešku kliničku sliku sa rapidnim telesnim

propadanjem i ranim multiplim metastazama. Često je bilateralan, zahvata medulu bubrega, obično je velikih dimenzija i loše ograničen. Histološki tumor je građen od kubičnih, cilindričnih i „*hobnail*“ ćelija sa izraženo pleomorfnim jedrima, tubularno i tubulopapilarno organizovanih koje pokazuju izražen infiltrativni rast, sa dezmoplastičnom stromom. Diferencijalno-dijagnostički problemi mogu nastati u odnosu na medularni karcinom bubrega, metastatski adenokarcinom, tip II papilarnog RCC, loše diferentovan karcinom urotela.

Imunohistohemijski profil: CK7+, CK19+, vimentin+, PAX2+, PAX8+, OCT3/4+, INI1+.

Medularni karcinom bubrega je veoma redak tumor, agresivnog kliničkog toka. Opisano je svega 200 slučajeva, uglavnom se javlja kod crnaca, udružen sa anemijom srpastih ćelija. Tumor zahvata medulu bubrega, prosečnog dijametra 7cm, loše ograničen, na preseku sivkasto-beličast, sklerotičan, sa područjima nekroze. Postoji predilekcija za desni bubreg, ali uzrok nije dovoljno razjašnjen. Histološki daje sliku loše diferentovanog adenokarcinoma, sa miksoidnom stromom i čestom produkcijom intracelularnih mucina. Karakteristično je prisustvo neutrofilnih granulocita, sa fokusima apscediranja.

Imunohistohemijski profil: PAX8+, pCEA+, CK7, CAM5.2, Ulex Europaeus, INI1+, OCT3/4+.

MITF translokacijski RCC obuhvata tumore koji su u prethodnim klasifikacijama predstavljali zasebne entitete- Xp11 i t(6;11) translokacijski RCC. Dva transkripciona faktora iz MIT familije- TTEF i TFEB fuzionišu sa drugim genima, kao posledica primene citotoksične hemoterapije, koja je prepoznata kao glavni faktor rizika. Više od 40% pedijatrijskih RCC su Xp11 translokacijski RCC. Histološki mogu da oponašaju građu ostalih RCC, karakteristični izgled podrazumeva papilarne strukture, tumorske epitelioidne ćelije svetle citoplazme i psamomska telašca. Studije su pokazale da kod TFE3 translokacijskog postoji povišena ekspresija ciklina D1, ciklina D3 i p21 (33).

Imunohistohemijski profil: PAX8+, Melan A+, HMB45+, katapsin+.

RCC udružen sa deficijencijom sukcinat-dehidrogenaze (SDH) je veoma redak, nasledan tumor, za koji je odgovorna mutacija i gubitak IHH ekspresije SD. Postoji više SDH gena (A-D), najčešća je mutacija SDHB (i to oba alela). Makroskopski jasno ograničen tumor, braonkasto-crvenkaste boje, često multifokalan i bilateralan, solidan ili cističan. Histološki, neoplastične ćelije su svetle ili eozinofilne, sa uočljivim vakuolama u citoplazmi i karakterističnim zarobljavanjem neneoplastičnih tubula unutar tumora.

Mucinozni tubularni i spindle cell RCC je tumor žućkasto-bron boje, jasno ograničen, mikroskopski sačinjen od mikroidne strome u kojoj su vretenaste ćelije i izdužene ili trakaste tubularne formacije.

Imunohistohemijski profil: AMACR+, PAX2 +, CK7+.

Tubulocistični RCC otkriva se najčešće slučajno, ali može da dostigne dijametar do 17cm, na preseku je multicističnog izgleda. Mikroskopski, kako i sam naziv govori, sačinjen je od cista obloženih apatiranim, kubičnim ili „hobnail“ epitelom“ i tubula, a iako je indolentnog kliničkog toka, najčešće je gradus 3 po WHO/ISUP-u.

RCC udružen sa stečenom cističnom bolešću bubrega je često multifokalan i bilateralan, najčešći tumor kod pacijenata na dugotrajnoj dijalizi, u terminalnoj fazi hronične bubrežne insuficijencije. Tumorske ćelije su eozinofilne citoplazme sa prominentnim nukleolusom, i mogu oponašati sve do sad pomenute obrasce rasta, ali ono što odlikuje ovaj tumor je mikrocističan izgled zbog „rupa“ i lumena između pojedinačnih ćelija ili u samoj citoplazmi. Stroma je bogata kristalima kalcijum-oksalata.

Imunohistohemijski profil: CK7-, RCC+, CD10+, AMACR+.

Svetloćelijski (clear cell) papilarni RCC je indolentan tumor, gotovo svaki novootkriveni tumor je gradusa 1-2 po WHO/ISUP-u, i pT1 TNM stadijuma, sačinjen od papila i tubula obloženih svetlim ćelijama, sa apikalnim citoplazmatskim produžecima ka lumenu, jedara raspoređenih u nizu, udaljeno od bazalne membrane. Makroskopski tumor je inkapsuliran, jasno ograničen. Leroy i saradnici su pokazali da ovaj tip RCC u velikoj meri eksprimira ciklin D1 (34).

Imunohistohemijski profil: CK7+, AMACR-, CAIX (“cup-like“)+, CD10-, PAX2+, PAX8+.

Neklasifikovan RCC- obuhvata tumore koji su niskog ili visokog gradusa i koji ne ispunjavaju dijagnostičke kriterijume za opisane histološke tipove RCC.

Papilarni adenom je neinkapsuliran tumor, veličine do 15mm, često nastaju kod pacijenata sa stečenom cističnom bolešću bubrega.

Imunohistohemijski profil: EMA+, AMACR+, LMWCK+, HMWCK+.

Onkocitom, benigni tumor, javlja se u 5-9% od svih slučajeva tumora bubrega. Na preseku žućkaste do bron boje, sa centralnim ožiljkom, uglavnom jasno ograničen, solitaran, veoma retko infiltrativnog načina rasta, multifokalan tumor. Građen je od krupnih, ovalnih,

eozinofilnih ćelija bogatih mitohondrijama (onkociti). Onkociti formiraju gnezda, solidna polja i ređe cistične prostore u hipocelularnoj stromi, koja može biti dominantnija u odnosu na ćelijsku komponentu. Onkocitoza je pojava multiplih onkocitoma, kao i grupica onkocitnih ćelija, često udružena sa ChRCC ili hibridnim onkocitno/hromofobnim tumorom, često se dovodi u vezu sa BHB sindromom. Ekspresija ciklina D1 je povišena kod onkocitoma, smanjena ekspresija notirana je kod multiplih onkocitoma (35).

Imunohistohemijski profil: CD117+, vimentin-, CK7-, S100+, E-cadherin+

Imunohistohemijska bojenja opisanih tumora su navedena na osnovu rezultata primene dostupnih antitela u svakodnevnom radu, kao i dostupnih preporuka u literaturi (1,36).

DIJAGNOSTIKA KARCINOMA BUBREŽNIH ĆELIJA

Većina ovih tumora bude otkriveno akcidentalno. Glavni klinički simptomi su hematurija, palpabilna masa u predelu bubrega, bol u lumbalnom predelu, ali nisu dovoljno specifični i sreću se i kod drugih oboljenja bubrega. Pojava ovih simptoma uz gubitak telesne težine, umor, anamnestički podaci o izloženosti faktorima rizika, kao i pozitivna porodična anamneza zahtevaju detaljnije kliničko i laboratorijsko ispitivanje.

Kod 20-30% bolesnika sa RCC javlja se paraneoplastični sindrom (hipertenzija, pireksija, neuromiopatija, povišena sedimentacija, abnormalna funkcija jetre, anemija, amiloidoza, policitemija)(37,38).

Osim fizikalnog pregleda, bazična je i primena ultrazvuka (moguće je načiniti iglenu biopsiju vođenu ultrazvukom) (39).

Svakako da detekcija tumorske mase ultrazvukom podrazumeva dalju vizualizaciju putem CT i MR (40,41). MR može pomoći u prepoznavanju različitih tumora (42). Ipak, nije neuobičajeno da pacijenti inicijalno budu podvrgnuti hirurškom zahvatu (parcijalnoj tj. konzervativnoj ili totalnoj nefrektomiji), te definitivna dijagnoza bude postavljena patohistološkom analizom dostavljenog operativnog materijala, bez inicijalnog biopiranja.

U praksi kod nas prednost je data totalnoj nefrektomiji, ali prema podacima iz skorašnjih istraživanja parcijalna nefrektomija može dati zadovoljavajuće rezultate (43).

Ovakav pristup lečenju zasniva se pre svega na činjenici da su tumori bubrega dijametra većeg od 3cm klinički visoko suspektni na malignitet.

PROGNOZA

Iako su svi opisani tipovi RCC zapravo histološke varijante istog tumora, njihovo biološko ponašanje je veoma raznoliko i zavisi od mnogih udruženih faktora. Tako, pojedini tipovi imaju odličnu prognozu, bez zabeleženih slučajeva metastaziranja u literaturi, dok su drugi veoma agresivni tumori, koji mogu da dovedu do smrtnog ishoda unutar dve godine.

Svetloćelijski RCC ima bolji klinički ishod, ukoliko je stadijum bolesti niži. Bitan parametar je prisustvo tumorske nekroze- 10% i više ukazuje na lošiju prognozu, a ukoliko je niži TNM stadijum (1-2) i ima 20% tumorske mase u nekrozi, to takođe implicira lošiji ishod po pacijenta. Prisustvo sarkomatoidne, rabdoidne i drugih tipova diferencijacije ukazuje na lošiju prognozu i kraći period preživljavanja kod ovih bolesnika (44–46) .

Multilokularna cistična renalna neoplazma niskog malignog potencijala ima odličnu prognozu, metastaze i ponovna pojava bolesti nisu zabeleženi kod ovog tipa tumora .

Papilarni karcinom bubrežnih ćelija je tumor sa boljom prognozom od ostalih RCC, tip I ima bolju prognozu od tipa II, a i za njega važi da je lošiji ishod sa višim stadijumom i pojavom diferencijacije tumora (sarkomatoidne npr).

RCC udružen sa hereditarnom leiomiomatozom nažalost rano daje metastaze i ima lošu prognozu.

Hromofobni RCC ima odličnu prognozu i dobro 5-togodišnje preživljavanje (oko 80%).

Collecting duct (sabirnih kanalića) RCC je, kako je već pomenuto, agresivan tumor sa lošom prognozom i visokom stopom smrtnosti.

Medularni karcinom bubrega je tumor loše prognoze i kratkog vremena preživljavanja.

MITF translokacijski RCC veoma retko daje metastaze, koje mogu da se pojave i nakon više od 20 godina od dijagnostikovanja primarnog tumora.

RCC udružen sa deficijencijom sukcinat-dehidrogenaze je najčešće tumor niskog gradusa, sa retkim metastazama i dobrom prognozom, a ređi su slučajevi sa sarkomatoidnom diferencijacijom, visokog gradusa.

Mucinozni tubularni i „spindle cell“ karcinom je uglavnom indolentnog kliničkog toka, sa retkim opisanim metastazama u regionalnim limfnim nodusima. Opisani su i slučajevi lošeg ishoda usled agresivnijeg ponašanja tumora.

Tubulocistični RCC je indolentan tumor dobre prognoze. U literaturi su zabeleženi retki slučajevi metastaziranja.

RCC udružen sa cističnom bolešću bubrega je uglavnom indolentan tumor, sa opisanim slučajevima pojave metastatske bolesti.

Svetloćelijski papilarni RCC ima odličnu prognozu i nisu opisani slučajevi metastaziranja ili ponovnog javljanja tumora nakon operacije.

Klinički ishod RCC koji se vode kao neklasifikovani procenjuje se na osnovu kliničko-patoloških karakteristika pojedinačnog slučaja.

Papilarni adenom ima odličnu prognozu.

Onkocitom je benigni tumor.

Očekivani klinički ishod za različite tipove RCC je naveden na osnovu podataka SZO i drugih izvora (13,14,47,48).

ĆELIJSKI CIKLUS

Ćelijski ciklus je precizno i fino regulisan, kompleksan proces, koji podrazumeva replikaciju DNK i ćelijsku deobu (mitozu). Ćelije koje se ne dele, tj. koje su u fazi mirovanja su u G0 fazi. Faze ćelijskog ciklusa ćelija koje se dele su

1. interfaza -G1-presintetička faza rasta 1, S- faza sinteze DNK, G2- premitotička faza rasta 2 i
2. mitoza-M

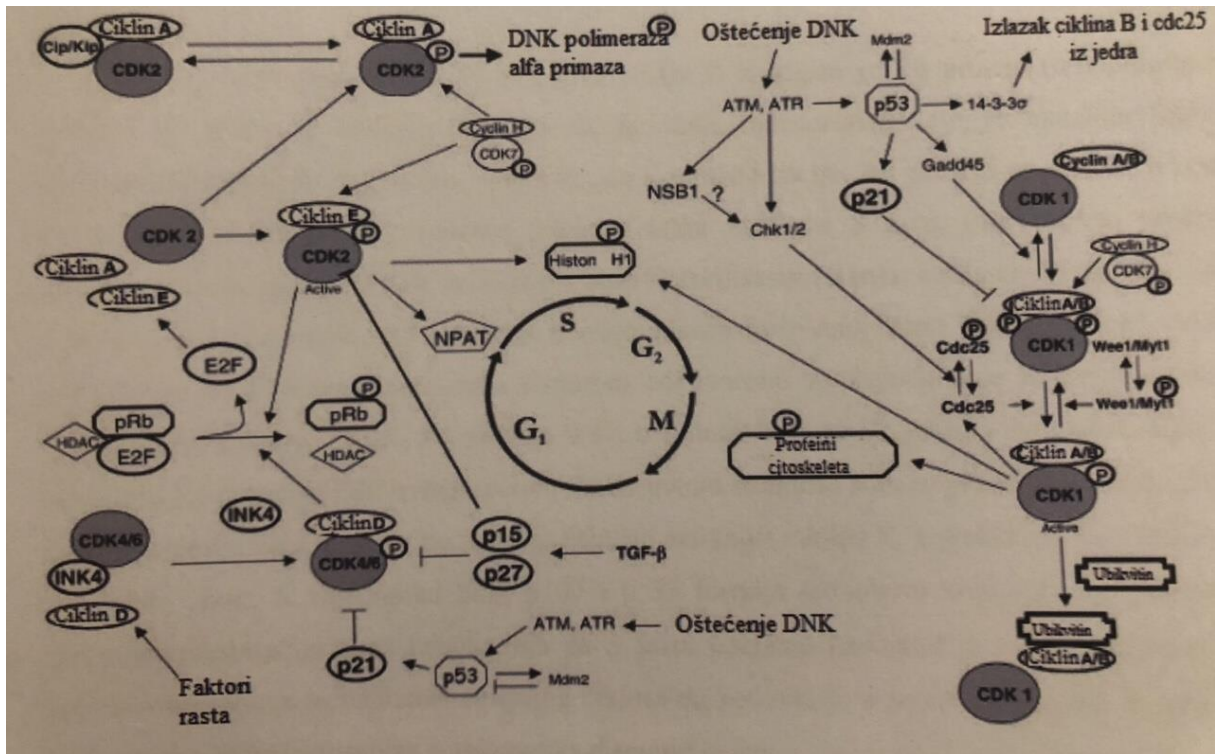
Drugim rečima, period između dve M faze predstavlja interfazu, koja obuhvata G1, S i G2 fazu ćelijskog ciklusa.

Regulatori ćelijskog ciklusa su ciklini, ciklin zavisne kinaze (CDK) i inhibitori ciklin zavisnih kinaza (CDKI) (49). Mutacije gena koji kodiraju cikline, CDK i CDKI izazivaju nekontrolisanu progresiju kroz ćelijski ciklus što predstavlja osnov za karcinogenezu (2). Replikaciju abnormalnih ćelija sprečavaju stimulatori i inhibitori ćelijskog ciklusa, regulacijom pomoću unutrašnjih kontrolnih tačaka (50). Drugim rečima, ciklini i CDK deluju na određenim tačkama ćelijskog ciklusa, te se on odvija po preciznom redosledu, a čitav mehanizam regulišu kontrolne tačke, u kojima se ciklus po potrebi zaustavlja (51).

Postoji 10 poznatih ciklina, označeni slovima A-J, to su proteini mase 35-90kDa, naziv su dobili po cikličnoj prirodi njihovog nastanka i razgradnje (2). Podeljeni su prema ulozi u procesu ćelijske deobe na cikline G1 faze (ciklini C1,D1-D3 i E) i cikline mitoze (ciklini A i B)(Slika 6 (51)).

Ciklin zavisne kinaze (CDK) za razliku od ciklina čija je koncentracija promenljiva tokom ćelijskog ciklusa, imaju konstantne koncentracije i to su enzimi čija je uloga da vrše fosforilaciju proteina- ciklina i na taj način ih aktiviraju i omogućavaju progresiju samog ćelijskog ciklusa i sledstvenu deobu (50).

Inhibitori ciklin zavisnih kinaza su negativni kontrolori ćelijskog ciklusa, čije dejstvo može biti selektivno, kao što je INK4 familija proteina CDKI 4/6, i neselektivno- CIP/KIP familija. INK4 su proteini p15, p16, p18 i p19 koji selektivno inhibiraju CDK4 i CDK6. CIP/KIP proteini- inhibiraju sve ciklin-CDK komplekse i to su proteini p21, p27 i p57 (49,52).



Slika 6. Kontrola ćelijskog ciklusa (modifikovano po Vermeulenu, 2003(51)) *Ljubaznošću prof. dr Sanje Radojević-Škodrić, doktorska disertacija, 2012.

Ciklin A ima ulogu u DNK replikaciji u toku S faze i učestvuje u inicijaciji mitoze, te je ciklin koji ima dvostruku ulogu u toku ćelijskog ciklusa (53). Koncentracija ciklina A počinje da raste krajem G1 faze. Osnovna uloga ciklina A je da provede ćeliju kroz S fazu ćelijskog ciklusa, tokom koje se odvija replikacija DNK. Pri kraju S faze, ciklin A počinje da se vezuje za CDK1 i aktivira je, što uvodi ćeliju u G2 fazu ćelijskog ciklusa. Dokazano je da mutacije gena ciklina A dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i uvode germinativne ćelije u apoptozu kod sisara (54). Ciklin A je protein od 60kD, razgrađuje se neposredno pre metafaze, tokom mitoze. Pošto veoma brzo dolazi do razgradnje ciklina E, njegovu ulogu preuzima ciklin A, koji se takođe vezuje za CDK2 i na taj način je aktivira. Ciklin A kodira gen CCNA.

Prekomerna ekspresija ciklina A je uočena u normalnoj sluznici kolona i u karcinomu jajnika i velikom broju humanih tumora (53). Obično postoji koekspresija ciklina A sa proliferativnim markerima, kao što su PCNA (proliferating cell nuclear antigen) i Ki67 (53). Takođe povećana ekspresija CDK2/ciklina A uočena je tokom povećane proliferacije RCC, kao posledica rezistencije na određene terapijske protokole (55).

Ciklin D1 je protein iz grupe proteina ciklina D (D1-D3). Ciklin D1 se vezuje za CDK4 ili CDK6 i aktivira ih (56). Ciklin D2 i D3 takođe aktiviraju ove kinaze, ali i CDK2. Ciklin D1 kodira gen CCND1 na hromozomu 11q13 (57). Ključna uloga ciklina D je regulacija ćelijskog ciklusa preko Rb tumor supresor proteina (58). Nakon vezivanja ciklina D1 za CDK4 ili CDK6 dolazi do fosforilacije proteina Rb, koji potom oslobađa E2F transkripcione faktore i započinje sintezu DNK. Povećana ekspresija ciklina D nalazi se u mnogim malignim tumorima, pre svega dojke, jednjaka, jetre, nekim tipovima limfoma (2,59). Dokazana je njegova uloga u nastanku rabdoid tumora kod dece (60). Ciklin D1 je važan imunohistohemijski marker za diferenciranje svetloćelijskog sarkoma bubrega od drugih tumora kod dece- Wilms-ovog tumora, rabdoid tumora (61). RCC u 75% slučajeva ispoljava viši nivo ekspresije ciklina D1 u odnosu na tkivo bubrega (62). Pored poznatih, prepoznate su i nove uloge ciklina D- u ćelijskoj migraciji, invaziji, reparaciji DNK, angiogenezi, indukuje nestabilnost hromozoma (63). Proteazomalna razgradnja ciklina D1 je važan anti-kancerski mehanizam (64).

p16 je inhibitor ćelijskog ciklusa i tumor supresor protein, koji je kod ljudi kodiran od strane CDKN2A gena. p16 sadrži 4 ankirin ponavljanja od oko 32 AK. Ćelijska p16 ekspresija je visoko selektivna, a nivo p16 se drastično povećava sa starenjem ćelije (65). Kod odraslih osoba p16 normalno je ekspimiran u epitelu duktusa dojke, proliferativnom endometriju, epitelu jednjaka i cerviksa, a kod dece ekspresija p16 postoji kod limfocita timusa i u Hasalovim telašcima, dok su delecije gena za p16 uočene u mnogim tumorskim ćelijskim linijama, na primer kod karcinoma štitaste žlezde (66). Gen za p16 (CDKN2A) je najčešće inaktivirani tumor supresorski gen u karcinomu pankreasa, čak kod 95% bolesnika (2).

p57 je član CIP/KIP porodice CDKI molekula, zajedno sa p21 i p27. Njegova uloga uključuje kontrolu ćelijskog ciklusa, diferencijacije, apoptoze, tumorigeneze, migracije i invazije, angiogeneze (67). Gen za p57 (CDKN1C) lociran je na 11p15.5 hromozomu, u regionu koji je uključen u nastanak sporadičnih karcinoma, kao i familijarnih karcinomskih sindroma (Beckwith–Wiedemann) (68). Istraživana je njegova uloga u karcinomu pankreasa, pluća, dojke bešike, gastrointestinalnog trakta i prostate (69). To je jedini CDKI koji je neophodan za normalno odvijanje ćelijskog ciklusa, jer drugi inhibitori ne mogu da kompenzuju njegovo dejstvo. Dokazana je njegova uloga u sazrevanju hepatoblasta u hepatocite u fetalnoj jetri (70). Aberantna DNK metilacija gena za p57 je osetljivi marker za detekciju rezidualne bolesti B krupnoćelijskog limfoma- DLBCL (71). Aberantna ekspresija p57 je uočena u balon ćelijama kod malformacija mozga (72).

Da bi tumorsko tkivo moglo da nastane, neophodno je da ćelije prođu kroz niz kompleksnih mehanizama koji dovode bilo do poremećaja u regulaciji ciklina i CDK, bilo do gubitka funkcije CDKI. Ciklini su pozitivni regulatori ćelijskog ciklusa, te njihova prekomerna ekspresija, kao i smanjena ekspresija inhibitora ćelijskog ciklusa (kao što su inhibitori ciklin-zavisnih kinaza) povezana je sa ubrzanom proliferacijom i nastankom tumora. Poznato je da je protein p53 tumor supresor često mutiran u tumorskim linijama. Njegova uloga ogleda se u tome da zaustavlja ćeliju koja je pretrpela oštećenje DNK u fazi G1, tako što utiče na sintezu CDKI p27. TGF- β utiče na pojačanu sintezu CDKI p15, a ćelijski ciklus se zaustavlja kao odgovor na prisustvo ovog proteina. I protein Rb usled mutacija može da dovede do preterane ćelijske deobe preko poremećene regulacije E2F transkripcionih faktora. Poremećaj ekspresije gena i proteina ćelijskog ciklusa uključeni je u razvoj anaplazije i metastaza, kao i rezistencije na terapiju.

GENETSKI PROFIL KARCINOMA BUBREŽNIH ĆELIJA PREMA SZO

Svetloćelijski RCC sporadično nastaje nakon mutacije oba alela, kao i epigenetskom metilacijom VHL gena, a se sreće i u okviru VHL kancerskog sindroma. Detektovani su i drugi tumor supresor geni povezani sa svetloćelijskim RCC (JARID1C, UTX, SETD2, PBRM1, zatim mutacija BP1), svi na hromozomu 3p, a prepoznati su i geni na hromozomima 4q, 14q, 5q. RCC se javlja i u tuberoznoj sklerozi, BHD sindromu, deficijenciji SDH (13).

Multilokularna cistična renalna neoplazma niskog malignog potencijala je genetski srodan ccRCC- njegov nastanak vezuje se za mutacije VHL gena, kao i 3p hromozom.

Papilarni karcinom bubrežnih ćelija najčešće je sporadičan, a sreće se u okviru familijarnog pRCC (tip I) i BHD sindroma, vezuje se za gubitak Y hromozoma, trizomiju hromozoma 7 i 17. Opisane su i druge genetske abnormalnosti- trizomije hromozoma 8, 16, 20, gubitak hromozoma 7, 1p, 4q, 6q, mutacije MET gena, amplifikacija MYC gena i mnoge druge. Važno je istaći da tip I i tip II imaju različite genetske aberacije- tip I može biti udružen sa trizomijom hromozoma 7, dok tip II može imati promene na hromozomu 5. Za onkocitni tip pRCC nema dovoljno preciznih podataka, jer su prikazani slučajevi sa različitim, pa i oprečnim promenama u genomu.

RCC udružen sa hereditarnom leiomiomatozom nastaje mutacijom FH gena, što dovodi do povišenja nivoa fumarata i sledstvenog porasta nivoa HIF1 α .

Hromofobni RCC pokazuje gubitak Y, 1, 2, 6, 10, 13 hromozoma, mutacije TP53 i PTEN i javlja se u okviru BHD sindroma.

Collecting duct (sabirnih kanalića) RCC je redak tumor, stoga nedovoljno ispitan (gubitak hromozoma 4 i 14, trizomija hromozoma 4 i 8, delecija 8p i 9p, gubitak INI1 ekspresije i amplifikacija Her2/neu gena).

Medularni karcinom bubrega povezan je sa povišenom ekspresijom HIF1 α i ABL gena i gubitkom hromozoma 22.

MITF translokacijski RCC obuhvata tumore za čiji razvoj je ključna fuzija gena: TFE3 sa ASPSCR1, TFE3 sa PRCC, kao i TFEB sa MALAT1 i drugi.

RCC udružen sa deficijencijom sukcinat-dehidrogenaze povezan je sa mutacijom SDH gena (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD), o čemu je bilo reči, sreće se i kod tumorskog sindroma (koji obuhvata paragangliom/feohromocitom, pituitarni adenom, GIST udružen sa SDH deficijencijom i RCC udružen sa deficijencijom sukcinat-dehidrogenaze). Pomenuti GIST i paragangliom sa pulmonarnim hondromom čine Karnejevu trijadu. Osim mutacija, retko se dešava da dodje do dvostruke inaktivacije gena na oba alela.

Mucinozni tubularni i „spindle cell“ karcinom niskog gradusa u vezi je sa gubitkom hromozoma 1, 4, 6, 8, 9, 13, 14, 15 i 22, a visokog gradusa sa udvajanjem hromozoma 2, 5, 7, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 22 i X i gubitkom hromozoma 14 i 15.

Tubulocistični RCC ima gubitak Y hromozoma i udvajanje hromozoma 7 i 17.

RCC udružen sa stečenom cističnom bolešću bubrega dokazano je povezan sa aneuploidijom-povećanim broja hromozoma 3, 7, 16, 17, kao i polnih hromozoma.

Svetloćelijski papilarni RCC nije genetski sličan ni papilarnom i svetloćelijskom RCC.

Neklasifikovani RCC je heterogena grupa tumora, sa čestim promena u genomu, koje nisu dovoljno specifične.

Papilarni adenom je povezan za delecijom Y, kao i trizomijom hromozoma 7 i 17.

Onkocitom je sporadičan tumor, a opisan je i u okviru BHD sindroma. Raznolikog je genetskog profila (čest mozaik, postoje slučajevi normalnog kariotipa, kao i delecije ili

gubitka hromozoma 1, 14, Y, kao i rearanžmana hromozoma 11q13- translokacije t (5 ;11)). Upravo translokacija koja uključuje CCND1 lokus i 11q13 i povišena ekspresija ciklina D1 razlikuju onkocitom od ChRCC, koji se histološki ne mogu jasno razlikovati (35). Navedeni poznati genetski profili za tipove RCC su iz SZO (13).

U novijoj literaturi ispitivani su brojni molekularni markeri (p53, adhezivni molekuli- katenini, faktori rasta i proliferativni markeri- Ki-67, PCNA), međutim, nijedan molekularni marker se ne koristi u rutinskoj dijagnostici, pa se iz tih razloga ispitivanja intenzivno nastavljaju. U poslednje vreme markeri regulatora ćelijskog ciklusa se intenzivno koriste kao prognostički parametri kod raznih malignih tumora. Klasifikacija tumora bubrega na molekularnom nivou ostavlja prostora za dalja istraživanja, i periodično trpi izvesne promene a, za sada, nema nijednog zvanično priznatog molekularnog prognostičkog markera za RCC, na osnovu kojeg bi bolesnici bili svrstani u grupe i kandidovani za dodatne terapijske modalitete. Pored toga, analizom korelacije ekspresije proteina i gena ćelijskog ciklusa moguće je ispitati koji molekularni metod je senzitivniji i u kojoj meri se dobijeni rezultati poklapaju, što bi olakšalo dijagnostiku RCC-a.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ispitati ekspresiju proteina ćelijskog ciklusa kod pacijenata sa RCC:

1. ispitati imunohistohemijsku ekspresiju ciklina A, ciklina B, ciklina D1, p16 i p57 i ekspresiju gena koji ih kodiraju- CCNA, CCNB, CCND, CDKN2A, CDKN1C metodom qRT-PCR, korelirati sve dobijene rezultate u odnosu na kliničko-patološke karakteristike (TNM stadijum, nuklearni gradus, histološki tip, dimenzije tumora, preživljavanje, smrtni ishod ukoliko je nastupio, pol, starost)
2. ispitati da li postoji korelacija između imunohistohemijske ekspresije ciklina A, ciklina B, ciklina D1, p16 i p57 i dobijenih rezultata amplifikacije gena CCNA, CCNB, CCND, CDKN2A, CDKN1C

3. MATERIJAL I METODE

MATERIJAL

U doktorskoj disertaciji analiziran je operativni materijal 74 bolesnika, nakon totalne nefrektomije na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i odeljenju urologije Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović“ u Beogradu, u periodu od 5 godina (od 2010. do 2013. godine), te je sprovedena retrospektivna studija. Za korišćenje materijala dobijene su saglasnosti Etičkog komiteta Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović“ i Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije od 03.03.2011. kao i saglasnosti bolesnika obuhvaćenih istraživanjem. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom iz 1975.

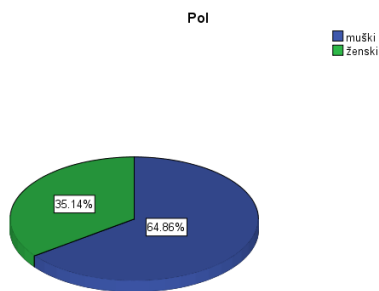
Nakon obrade dostavljenog materijala u laboratoriji Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, izvršena je patohistološka analiza i kod svih je verifikovan karcinom bubrežnih ćelija.

Za sve pacijente prikupljeni su podaci iz medicinske dokumentacije: pol, starost bolesnika, dužina preživljavanja zaključno sa septembrom 2015. i eventualno, ukoliko je nastupio smrtni ishod.

KLINIČKO-MORFOLOŠKI PARAMETRI

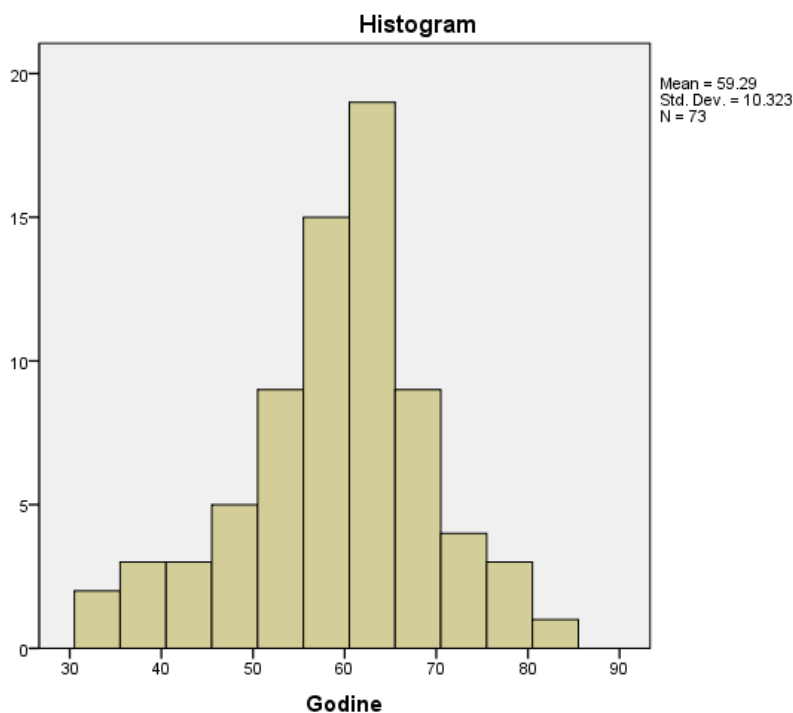
POL I STAROST BOLESNIKA

U obrađenom uzorku od 74 bolesnika, odnos muškog i ženskog pola je 1,85:1. Dakle, od ukupnog broja bilo je 48 muškaraca (64,9%) i 26 žena (35,1%) (grafikon 1).



Grafikon 1. Distribucija bolesnika prema polu.

Prosečna starost obolelih bila je 59,29+-10,323 година. Najstariji pacijent imao je 85 (žena) i 80 godina (muškarac), a najmlađi 33 (muškarac), odnosno 40 godina (žena) (Grafikon 2).



Grafikon 2. Distribucija prema starosti.

HISTOLOŠKI TIP

Prema klasifikaciji SZO tumora urinarnog sistema i muških genitalnih organa iz 2016. godine (13) među ispitivanim bolesnicima zastupljena su tri histološka tipa RCC: 49 bolesnika ima svetloćelijski (66,22%), 18 papilarni (24,32%) i 7 hromofobni (9,46%) histološki tip.

Bolesnici sa papilarnim RCC svrstani su u jednu kategoriju (i tip I i tip II). Nije dijagnostikovano nijedan slučaj drugih, retkih histoloških tipova RCC (kakav je, na primer *collecting duct*).

NUKLEARNI GRADUS

Postoje 4 gradusa prema WHO/ISUP-u, u odnosu na izgled jedra i uočljivost jedarceta tumorskih ćelija, o čemu je bilo reči u uvodnom delu teksta. Nuklearni gradus 1 i 2 razmatrani su zajedno kao grupa nižeg nuklearnog gradusa (ukupno 41, odnosno 55,41%), dok su bolesnici sa nuklearnim gradusom 3 i 4 svrstani u grupu višeg nuklearnog gradusa (ukupno 33, odnosno 44,59%).

TNM STADIJUM

Stadijum bolesti određen je prema kriterijumima koji su navedeni u SZO, pomoću patohistološke analize dostavljenih preparata i dostupnih podataka iz medicinske dokumentacije. Za statističku analizu svi ispitanici svrstani su ili u niži (pT1 i pT2) ili u viši stadijum bolesti (pT3 i pT4), pritom uzimajući u obzir i prisustvo metastaza u regionalnim limfnim nodusima, kao i postojanje udaljenih metastatskih depozita, dva veoma bitna parametra za određivanje stadijuma bolesti, uz veličinu primarnog tumora. Na taj način, 42 bolesnika su u grupi nižeg stadijuma (56,76%), dok preostalih 32 pripada višem (43,24%).

VELIČINA TUMORA

Medijana veličine tumora bila je 4,83cm (IQR=3,5-6,73). U velikom broju slučajeva (47,3%) dijametar tumora bio je između 4,1 and 7 cm.

PREŽIVLJAVANJE

Zaključno sa septembrom 2015. smrtni ishod zabeležen je kod 21 bolesnika (28,4%), preživelo je 53 bolesnika (71,6%). Najkraće preživljavanje nakon operacije bilo je 11 meseci, a najduže 58 meseci.

METOD

Nakon nefrektomije odstranjeno tkivo bubrega fiksirano je u 10% formalinu i dopremljeno na Institut za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, gde je urađena patohistološka obrada i analiza. To podrazumeva adekvatno tretiranje tkiva, formiranje reprezentativnih uzoraka dimenzija 1x1x0,5cm, izradu parafinskih blokova, HE i IHH bojenja. Na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu iz parafinskih blokova izolovana je tumorska DNK. Ovi uzorci su potom analizirani RT-PCR metodom u laboratoriji Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu, u cilju detekcije delecije/normalne ekspresije/duplikacije tj. amplifikacije gena za ciklin A, ciklin D1, p16 i p57.

PATOHISTOLOŠKA OBRADA UZORAKA

Formiranje isečaka mora biti obavljeno tako da se za histološku analizu dobiju kvalitetni i reprezentativni preseki tkiva, koji moraju biti pažljivo odabrani i u adekvatnom broju (na 1cm dostavljenog tkiva jedan do dva isečka). Da bi preuzimanje materijala u rad bilo svrsishodno, presudno je poštovanje standarda i preporuka dobre prakse, iskustvo, kao i pažljivo i strpljivo uočavanje i notiranje svih makroskopskih relevantnih karakteristika i ciljano uzimanje uzoraka. Ove uzorke neophodno je fiksirati u 4% formalinu, sa ciljem očuvanja morfologije ćelije i izbegavanja autolitičnih promena. Nakon kratkotrajnog ispiranja u vodi, tkivo se dehidrira u 70% etanolu, pa u 96% etanolu i na kraju u apsolutnom alkoholu. Sledeći korak je potapanje u ksilol, pa u rastopljeni parafin (60°C) do krajnje faze- izrade parafinskog bloka (hlađenjem parafina).

Ovakvi kalupi se rashlade i sečenjem na mikrotomu dobijamo isečke debljine oko 5µm, koje pažljivo prenosimo u vodeno kupatilo, a odatle na pločice od stakla. Nakon sušenja i hlađenja do sobne temperature, neophodno je odstraniti parafin, kratkotrajnim potapanjem u ksilol. Slede 100% alkohol i alkoholi opadajuće koncentracije, potom ispiranje destilovanom vodom. Naredni korak je bojenje Majerovim hematoksilinom 5 minuta, ispiranje destilovanom vodom, nakon čega se pločica uroni u amonijačnu vodu. Nakon ponovnog ispiranja destilovanom vodom sledi potapanje u 1% rastvor eozina u trajanju od 10 minuta. Ispira se tekućom vodom, potapa u alkohol rastuće koncentracije (70-96-100%) u trajanju od 7 minuta,

i konačno potapa u ksilol 5 minuta. Pločice zatim obrišemo oko tkiva, vodeći računa da se tkivo ne ošteti, aplikuje se kap kanadskog balzama i stavi se pokrovno stakalce. Sledi mikroskopiranje ovako pripremljenih pločica.

PATOHISTOLOŠKA DIJAGNOSTIKA

Iz svih preuzetih isečaka izrađuju se parafinski kalupi, a iz njih HE obojene pločice, koje su pažljivo pregledane i analizirane, pod supervizijom specijaliste patologije. Analizirani su isecci koji sadrže tumorsko tkivo- veličina i tip tumorskih ćelija, izgled jedra, jedarceta, citoplazme, prisustvo atipije i pleomorfizma, mitozu, izgled tumorske strome, vaskularizacije tumora. Prema kriterijumima SZO određeni su za svakog pacijenta dijagnoza, histološki tip, nuklearni gradus po WHO/ISUP-u, dediferencijacija, tip nekroze, krvarenje (čije prisustvo se notira u patohistološkom izveštaju, uz određivanje procenata zastupljenosti u odnosu na ukupnu zapreminu tumorskog tkiva). Važno je analizirati i okolno, relativno zdravo tkivo bubrega, kao i odnos tumorskog tkiva prema okolnom parenhimu bubrega (da li tumor pokazuje infiltrativni ili komprimujući način rasta, da li ima kapsulu, pseudokapsulu ili nije inkapsuliran). Neophodno je histološki verifikovati prisustvo kapsule bubrega, i notirati eventualno raslojavanje tumorskim ćelijama ili proboj kaspule tumorskim tkivom. U praksi najčešće bude dostavljen bubreg sa masnom kapsulom, a osim pomenutih makroskopskih osobina, veoma je važno odrediti odnos tumora sa hilusom bubrega: invaziju uretera, renalne vene, perihilarnog masnog tkiva, perineuralnu invaziju.

Jasno je da je za postavljanje precizne dijagnoze neophodno iskustvo, dobro poznavanje i literature vrhunskih stručnjaka iz oblasti urološke onkologije, kao i same bolesti i predvidljivosti njenog biološkog potencijala. Pod mikroskopom se analiziraju područja dobre i najlošije diferencijacije, propagacija tumora ka renalnom sinusu i pripadajućem masnom tkivu, potom se verifikuju makroskopski opisane osobine hilusa bubrega- permeacija renalne vene, zahvatanje uretera, limfovaskularna i perineuralna invazija, infiltracija i proboj Gerotove fascije i širenje tumora van granica bubrega (zahvatanje ipsilateralne nadbubrežne žlezde, perirealnog masnog tkiva, regionalnih limfnih nodusa), što je neophodno korelirati sa makroskopskim opisom dostavljenih uzoraka, kao i dostupnim kliničkim podacima iz prateće medicinske dokumentacije.

IMUNOHISTOHEMIJSKA METODA

Imunohistohemijska obrada tkiva je složen i precizan proces, a urađena je na pojedinačnim, posebno odabranim reprezentativnim parafinskim kalupima za svakog bolesnika nakon patohistološke dijagnostike. Nakon deparafinizacije sledi proteolitička digestija, blokada endogene peroksidaze i na kraju imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike. Kompletna obrada urađena je u laboratoriji za imunohistohemiju Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Nakon sečenja na mikrotomu, dobijeni preseci (debljine 3-4 μ m), moraju biti dobro osušeni (1h, 56°C). Sledi potapanje u ksilol 5-7 min, očeđivanje i ponovno potapanje u ksilol 5-7 min. Nakon ksilola, potapaju se dva puta u apsolutni etanol po 3 min, a između dva potapanja se dobro ocede. Postupak se ponavlja još dva puta sa alkoholom koncentracije 96%. Na kraju, 30 sec se ispiraju destilovanom/dejonizovanom vodom.

Ovako pripremljeni preseci kuvaju se u mikrotalasnoj pećnici 2 puta po 5 min (560W), u plastičnoj kiveri sa 250 ml radnog rastvora citratnog pufera (10mmol/l, pH6.0). Sledi polučasovno hlađenje na sobnoj T u citratnom puferu i ispiranje destilovanom vodom (dva puta po 30 sec).

Kako bismo sprečili nespecifično bojenje, neophodno je blokirati endogenu peroksidazu, koja aktivira hromogene. Preparate potapamo 5min u 3% vodonik-peroksid (koji je rastvoren u destilovanoj vodi), sledi ispiranje destilovanom vodom (30sec) i prelivanje tri puta fosftanim puferom (PBS-phosphate-buffered saline, 0,02 mol/L, pH7,0).

Koristili smo komercijalni kit za imunohistohemijsko bojenje (labelled streptavidin biotin Lsab+ method, Dako, Danska). Proizvođač je naveo precizne instrukcije za postupak bojenja:

Razblaženo primarno antitelo prema uputstvu proizvođača- faza 1

Kad odlijemo višak pufera i pažljivo obrišemo oko isečka, isečak ćemo pokriti sa minimalnom količinom primarnog antitela (20-30 μ l), inkubiramo 30min na sobnoj temperaturi, isperemo PBS i prelijemo svežim puferom.

Biotinilizovano vezno antitelo- faza 2

Odljemo višak pufera, pažljivo obrišemo oko isečka, pokrijemo 20-30 μ l LINK antitela, inkubiramo 30min, isperemo PBS iz špric-boce i prelijemo svežim puferom.

Streptavidin peroksidaza- faza 3

Odlijemo višak pufera, pažljivo obrišemo oko isečka, pokrijemo sa 20-30 μ l streptavidin-peroksidaze, inkubiramo 30 min, isperemo PBS iz špric boce i prelijemo svežim puferom.

DAB- supstrat hromogen- faza 4

Odlijemo višak pufera, pažljivo obrišemo oko isečka, pokrijemo isečak sa 20-30 μ l diaminobenzidina (DAB), inkubiramo 10 minuta i isperemo destilovanom vodom.

Kontrastno bojenje- faza 5

Natopimo pločice Majerovim hematoksilinom oko 5 minuta, isperemo destilovanom vodom, 10 puta uronimo u kivetu sa amonijačnom vodom (0,037 mol/L) i ponovo isperemo destilovanom vodom (oko 5 minuta). Pločice pokrijemo vodenim medijumom.

Hematoksilin se nespecifično vezuje za jedra svih ćelija i boji ih plavo, a mesta gde se specifično vezuje antitelo daje jasnu smeđu boju.

Antitela koja su korišćena, proizvođač, njihova razblaženja i tretman:

1. Ciklin A SC-751 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), 1:200, 1h, citrat
2. Ciklin B H-433 SC-752 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), 1:50, 1h, citrat
3. Ciklin D1 SP4 RM-9104-S Lab Vision (Termo Scientific USA), 1:50, 1h, citrat
4. p16 F-12 SC-1661 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), 1:300 preko noći, citrat
5. p57 SC-1040 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), 1:600 1h, citrat

Pozitivna kontrola- tkivo bubrega i limfnog čvora

Negativna kontrola- inkubacija sa čistim, razblaženim antitelom (bez primarnog antitela)

Evalvacija bojenja rađena je pregledom IHH obojenih pločica na svetlosnom mikroskopu Olympus optical, Japan, model BX43, na sledeći način:

Pozitivno bojenje na 300 izbrojanih tumorskih ćelija/uveličanje x40 (HPF):

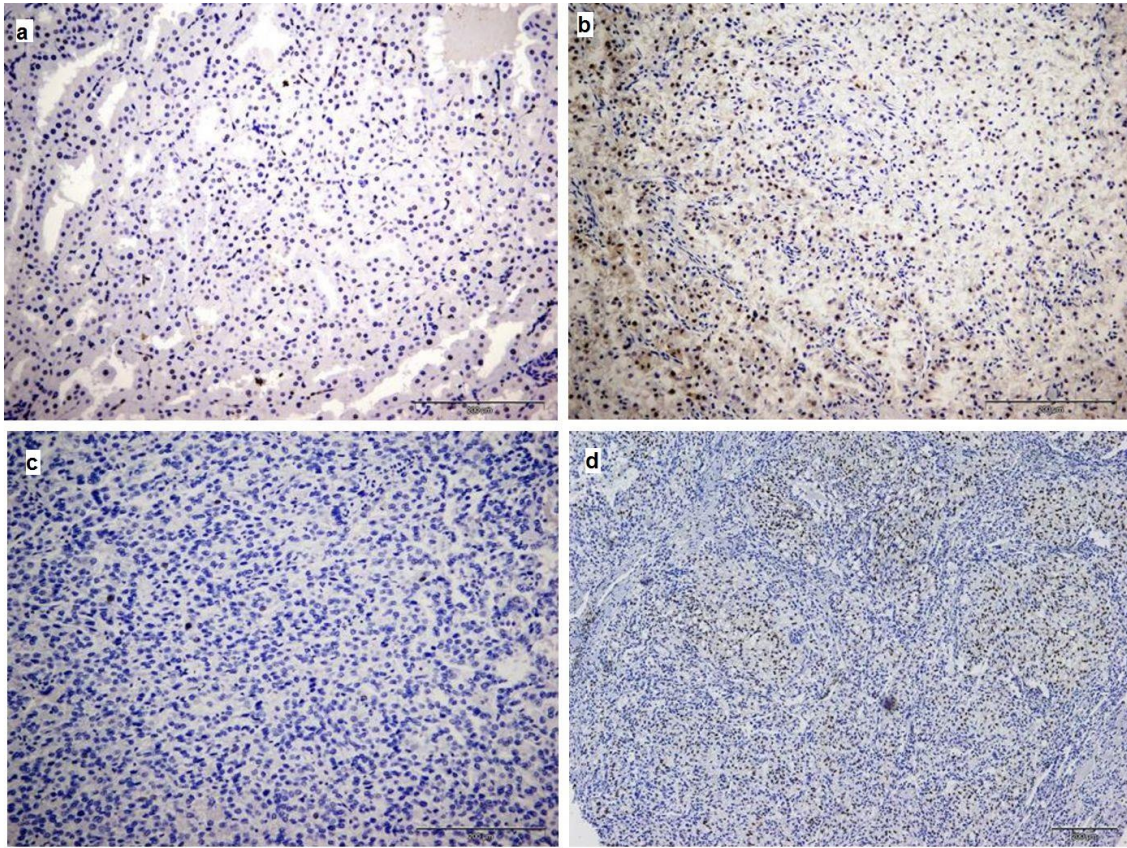
ciklin A- nuklearno i citoplazmatsko bojenje, cut-off 5%

ciklin D1- nuklearno bojenje, cut-off 10%

p16- nuklearno i citoplazmatsko bojenje, cut-off 10%

p57- nuklearno bojenje, cut-off 5%

Braon obojena jedra tumorskih ćelija identifikovana su kao pozitivno nuklearno imunohistohemijsko bojenje (ciklin D1, p57), a braon obojena jedra i citoplazma u „bloku“ identifikovani su kao pozitivno nuklearno i citoplazmatsko bojenje (ciklin A, p16) (Slika 7).



Slika 7. Imunohistohemijsko bojenje ciklina D1 i p57 u RCC. (a) ekspresija ciklina D1 u $\leq 10\%$ tumorskih ćelija; (b) ekspresija ciklina D1 u $> 10\%$ tumorskih ćelija; (c) ekspresija p57 u $\leq 5\%$ tumorskih ćelija; (d) ekspresija p57 u $> 5\%$ tumorskih ćelija. Uveličanje x200.

Imunohistohemijsko bojenje na ciklin B nije tehnički uspelo (ponovljeno bojenje), te dalje nije uzimano u razmatranje, niti je vršena analiza gena CCNB.

GENETSKA ANALIZA

IZOLACIJA DNK IZ PARAFINSKIH KALUPA

Izolacija DNK obavlja se iz tumorskog tkiva koje je fiksirano u parafinskim blokovima. Uzorci se maceriraju, potom prenesu u ependorf epruvete, u koje dodamo po 1ml ksilola i nakon polučasovnog vorteksovanja centrifugiramo (1300 rpm, kratko). Ukoliko ima zaostalog parafina, odlijemo ksilol i ponovimo ispiranje u ksilolu, a nakon toga preostali ksilol ispiramo etanolom (1ml etanola, vorteksovanje i centrifugiranje na 1300rpm). Nakon odlivanja viška etanola, postupak se ponavlja da bismo ksilol odstranili u potpunosti. Dodajemo 1ml destilovane vode da bismo odstranili sav etanol. Nakon vorteksovanja i centrifugiranja odstranimo višak destilovane vode, ependorf epruvete otvorene inkubiramo u termostatu 15 minuta (37°C), a onda dodajemo digestivni pufer TNE (100 mM NaCl, 25μM EDTA, 10μM TRIS-HCl, pH8). Zavisno od veličine uzorka količina pufera se koriguje (100-300μl). Dodamo, na kraju, 2μl proteinaze K (10mg/ml) i 10 μl 1% SDS (10% SDS u konačnoj zapremini). Ostavimo preko noći na 37°C (vodeno kupatilo). Drugog dana izolacije dodajemo 500μl smeše fenol/hloroform+izoamil alkohol. Ova smeša priprema se na precizan način: hloroform i izoamil alkohol se pomešaju u odnosu 24:1. Fenol i pomešani hloroform/izoamil alkohol se dodaju u odnosu 1:1. Sledi centrifugiranje (3000rpm, 5min). Ukoliko je rastvor homogen i nema potrebe za ponavljanjem prethodnog koraka, izdvajamo supernatant (gornju, vodenu fazu u kojoj je DNK) i prenosimo u nove ependorf epruvete. U donjoj fazi su ćelijski elementi u fenolu. Dodaje se 1/10 volumena vodene faze 4 M NaCl + 2 volumena etanola (96%) i promeša, a ako DNK nije vidljiva (precipitira se u obliku končića beličsate boje) ostavi se na -20°C 1h, potom se kratko centrifugira i odlije etanol. Potom se kratko centrifugira (sa dodatih 10μl 3M Na-acetata i 300μl etanola (96%)), nakon čega se ukloni etanol i doda 70% alkohol i kratkotrajno centrifugira, a zatim odstrani etanol, pelet osuši i DNK rastvori u destilovanoj vodi.

Koncentracija DNK određuje se spektrofotometrijski.

qRT-PCR ZA CIKLIN A, CIKLIN D1, p16, p57

Ispitivanje amplifikacije gena za ispitivane proteine ćelijskog ciklusa urađeno je Real-time PCR metodom (PCR u «realnom» vremenu), koja je utemeljena na klasičnom PCR-u, s pouzdanijom kvantifikacijom amplifikacije u eksponencionalnoj fazi. Standardna PCR metoda podrazumeva da se detekcija vrši u završnoj fazi, u kojoj je veći deo reakcionih činilaca istrošen, a RT-PCR u fazi kad je amplifikacije najbrža, i dok produkti reakcije nisu još uvek razgrađeni.

RT-PCR je senzitivnija metoda, iz razloga što detektuje razliku u amplifikaciji kad je ona samo dva puta veća, za razliku od klasične PCR metode, gde se ta razlika detektuje tek ako je veća 50 puta. Primenjena metoda se naziva i kvantitativni PCR (qPCR), jer se amplifikacija ispitivanog gena detektuje pomoću fluorescentnog obeleživača, čiji intenzitet signala je direktno proporcionalan broju amplifikovanih DNK molekula.

Postupak je sproveden na savremenom uređaju ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), a obrada rezultata urađena je u programu 7500 Software (Applied Biosystems, USA), obrada podataka vršena je po modelu $\Delta\Delta CT$.

Reakciona smeša:

TaqMan RT-PCR master mix 2x.....7,50 μ l

primer and probe mix 20x.....0,75 μ l

DNK.....2,25 μ l

reH₂O.....do 15,00 μ l

U reaktivnoj smeši nalaze se oligonukleotidne probe i setovi prajmera za ciklin A, ciklin D1, p16 i p57, koji su komercijalno dostupni, sintetisani na osnovu podataka u bazi podataka *National Center for Biotechnology Information*, kao i TaqMan proba obeležena „FAM®“ fluorescentnom bojom. Endogena kontrola je gen za humani serum albumin (HSA).

Prvo se dešava denaturacija DNK, pa u fazi hlađenja dolazi do vezivanja prajmera za DNK matricu, kao i jedne TaqMan probe po jednom molekulu DNK u visoko specifičnom regionu.

Potom dolazi do dodavanja nukleotida (Taq polimeraza 5'-3', uz simultano uklanjanje TaqMan probe sa matrice (5'-3' egzonukleaza). TaqMan proba ima na 5' kraju reportersku boju, a na 3' kraju prigušivačku boju, koja na odgovarajućoj udaljenosti od reportera blokira emisiju fluorescencije sve dok je TaqMan proba slobodna ili vezana za DNK molekul. Međutim, kako se proba uklanja opisanim načinom sa DNK matrice, dolazi do udaljavanja prigušivača od reportera i emituje se fluorescencija od stane reporterske boje.

Dobijeni rezultati evaluirani su na sledeći način:

0-0,50 delecija gena

0,51-1,50 normalan nalaz

1,51 i više duplikacija gena

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička metodologija

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih korišćeni su:

- apsolutni i relativni brojevi (n,%)
- mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- mere disperzije (standardna devijacija, kvartili)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni neparametarski testovi razlike (Hi-kvadrat test, Fišerov test tačne verovatnoće, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test,).

Izbor testa za testiranje razlike zavisio je od tipa podataka i raspodele. Normalnost raspodele ispitivana je na osnovu deskriptivnih parametara, testova normalnosti raspodele (Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilks testa) i grafičkim metodama (histogram, boxplot, QQ plot). Korišćen je Spirmanov test korelacije.

U analizi preživljavanja korišćena je Kaplan-Majerova kriva preživljavanja i Log-rank test, kao i Koksov proporcionalni hazardni model. Multivarijabilni modeli rađeni su sa Enter i Backward pristupom.

Svi podaci obrađeni su u SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) softverskom paketu i R 3.4.2 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.).

4. REZULTATI

Studija je obuhvatila ukupno 74 pacijenta sa RCC. Distribucija pacijenata u odnosu na pol i starost je prikazana u tabeli 1.

Tabela 1. Distribucija pacijenata u odnosu na pol i starost.

	N (%) / AS±SD
Pol muški	48 (64.9%)
Starost (godine)	59.3±10.2
≤50	13 (17.6%)
51-65	44 (59.5%)
66+	17 (23.0%)

Na osnovu distribucije po polu vidimo da se radi o većem procentu muškaraca, dok je dominantna kategorija starosti između 51-65 godina.

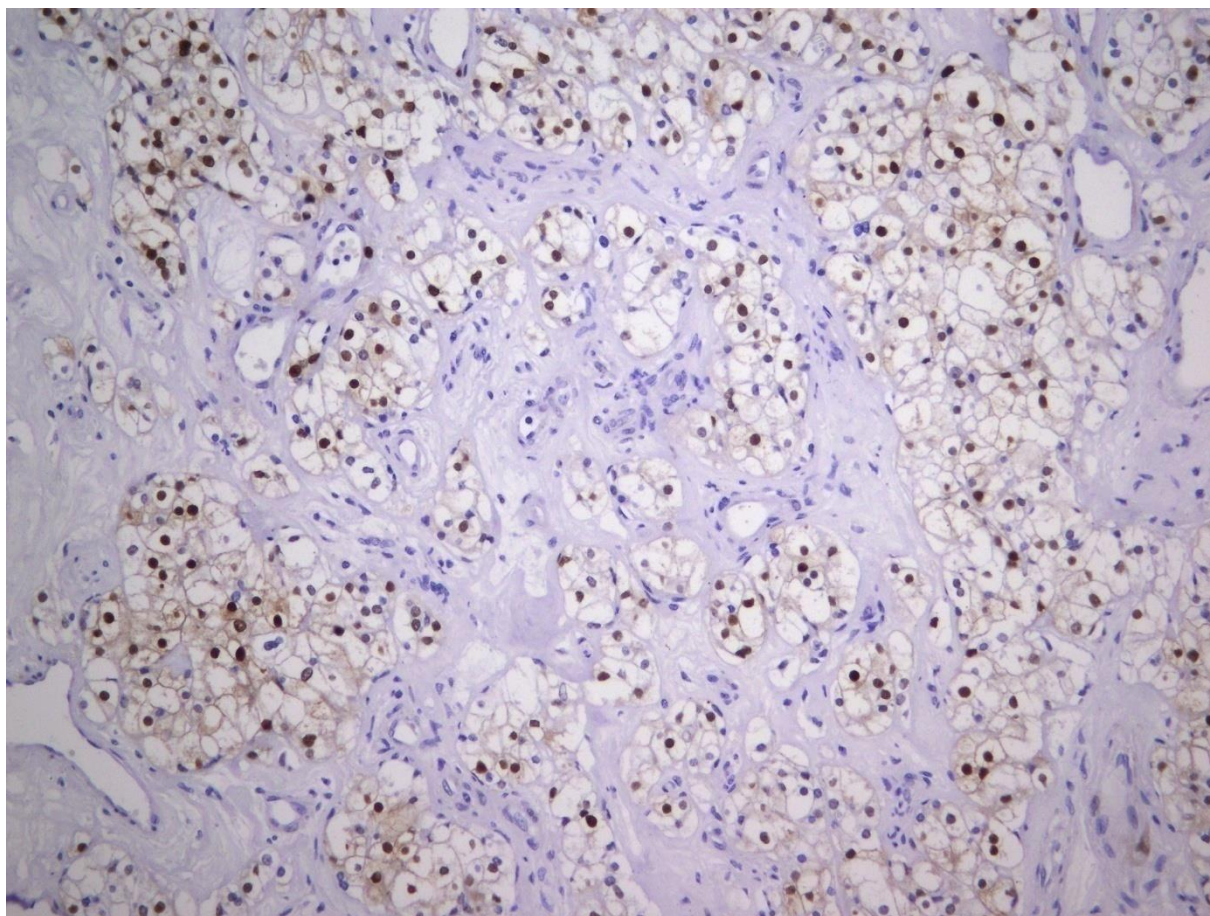
Kliničko-morfološke karakteristike pacijenata su prikazane u tabeli 2.

Tabela 2. Kliničko-morfološke karakteristike

	N (%) / AS±SD
Dimenzije tumora	53.1±23.5
≤4 cm	25 (33.8%)
4,1-7 cm	35 (47.3%)
>7 cm	14 (18.9%)
Histološki tip	
Hromofobni	7 (9.5%)
Papilarni	18 (24.3%)
Svetloćelijski	49 (66.2%)
Gradus	
Niži (I ili II)	41 (55.4%)
Viši (III ili IV)	33 (44.6%)
Stadijum	
Niži (I ili II)	42 (56.8%)
Viši (III ili IV)	32 (43.2%)

Na osnovu distribucije pacijenata po kliničkim karakteristikama vidimo da se radi o pacijentima sa dominantno tumorima srednje veličine, svetloćelijskog tipa. Distribucija pacijenata po gradusu i stadijumu tumora pokazuje da se radi o nešto većem procentu pacijenata sa nižim gradusom i stadijumom.

CIKLIN A



Slika 8. Ciklin A: pozitivno imunohistohemijsko bojenje- 40%, svetloćelijski tip, gradus II, 200x.

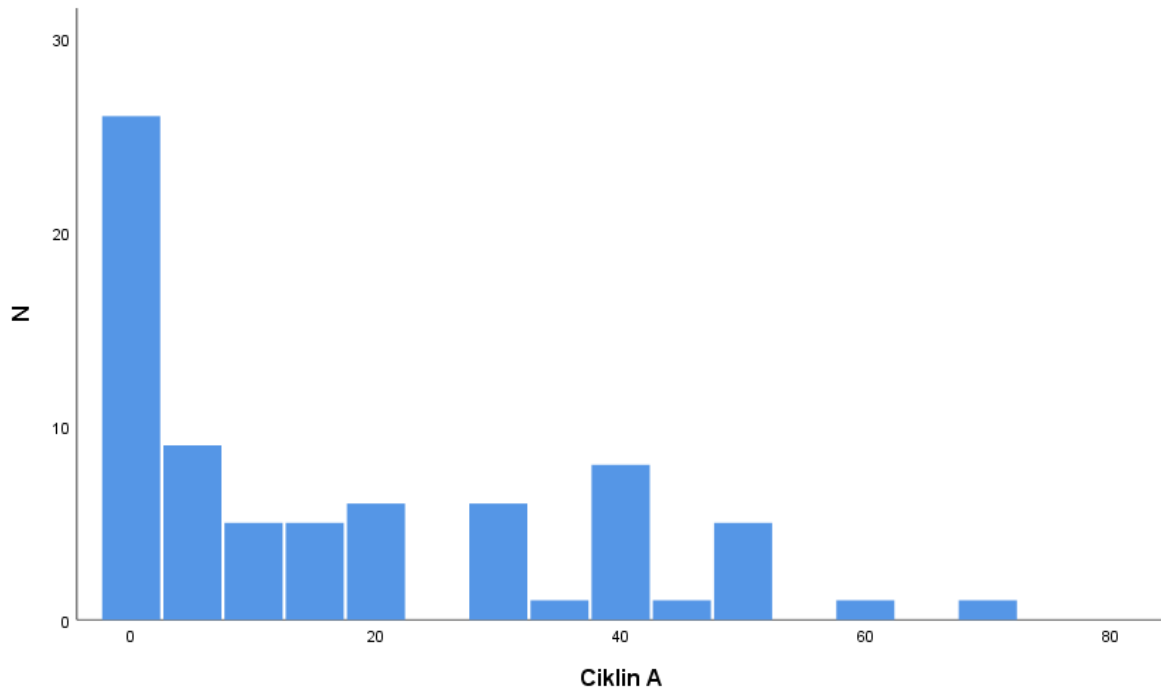
Deskriptivna statistika ciklina A i CCNA

Deskriptivna statistika ciklina A je prikazana u tabeli 3.

Tabela 3. Ciklin A

	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75
Ciklin A	16.9	18.7	10.0	.0	30.0

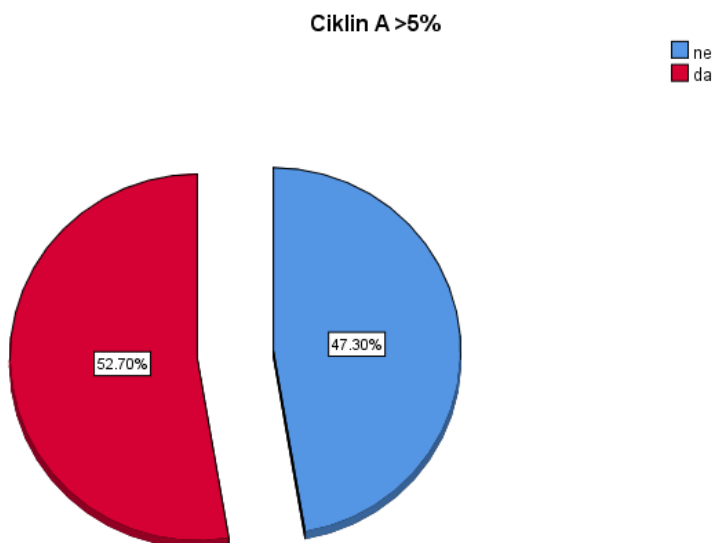
Distribucija pacijenata u odnosu na vrednost ciklina A je prikazana i grafički (grafikon 3).



Grafikon 3. Distribucija pacijenata u odnosu na ciklin A

Pacijenti su u odnosu na ekspresiju ciklina A podeljeni u dve grupe. Od ukupnog broja pacijenata, oni koji imaju vrednost do 5% je 35 pacijenata (47,3%), a oni koji imaju preko 5% je 39 (52,7%).

Distribucija pacijenata je prikazana i grafički (grafikon 4).



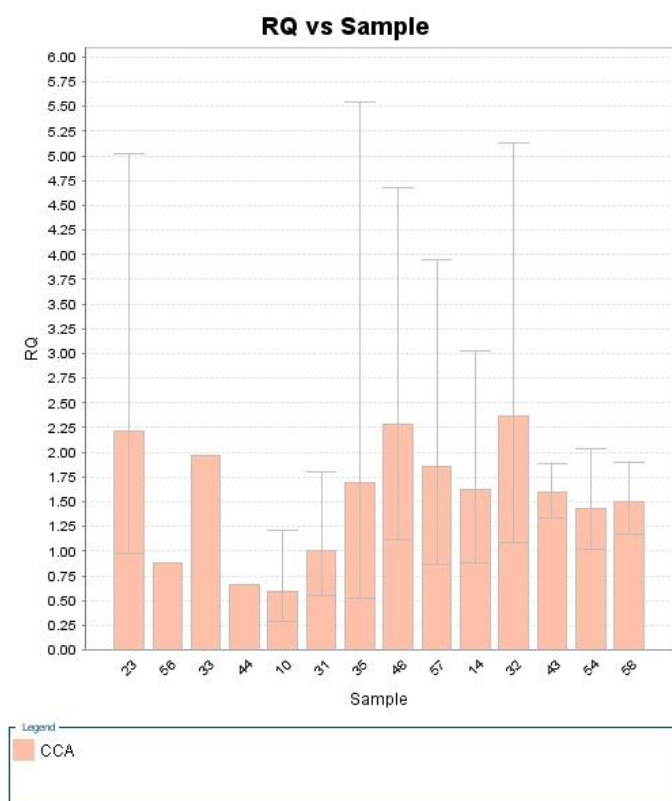
Grafikon 4. Distribucija pacijenata u odnosu na ciklin A

CCNA

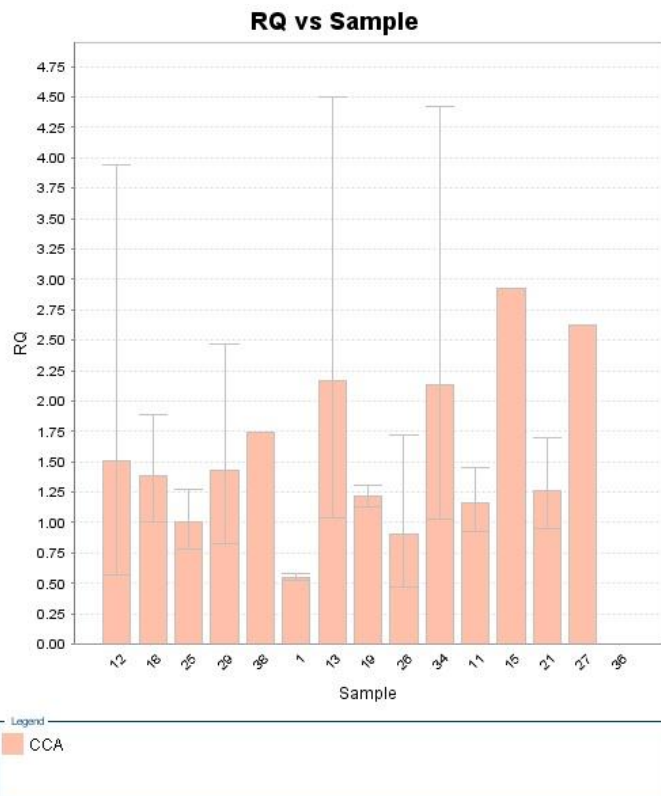
Od ukupnog broja pacijenata, za 13 pacijenata nije uspela analiza (17.6%).

Pacijenti su u odnosu na CCNA podeljeni u tri grupe, oni koji imaju normalan nalaz, njih 40 (65,6%), deleciju, njih 2 (3,3%) i duplikaciju, njih 19 (31,1%).

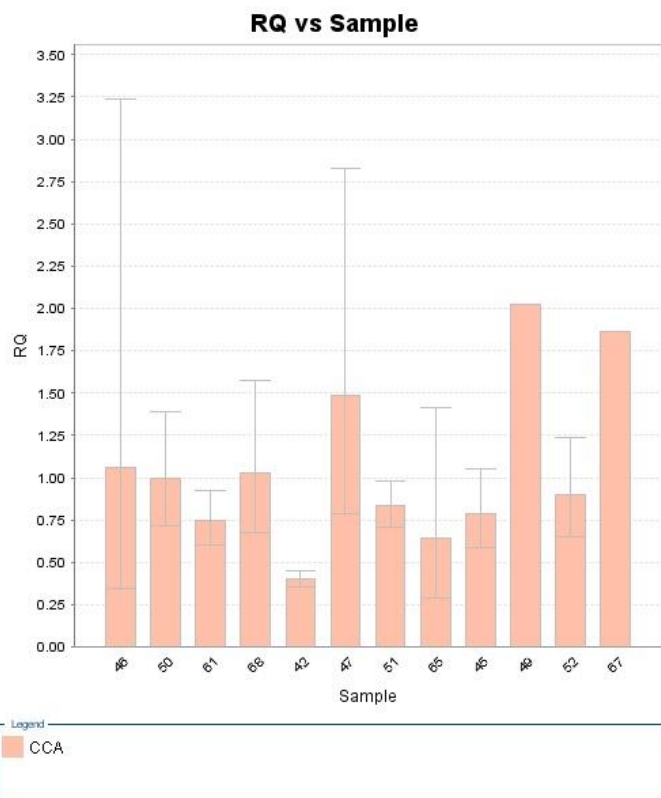
Slede grafički prikazi (grafikoni 5 (a-e)) rezultata qRT-PCR analize za gen CCNA:



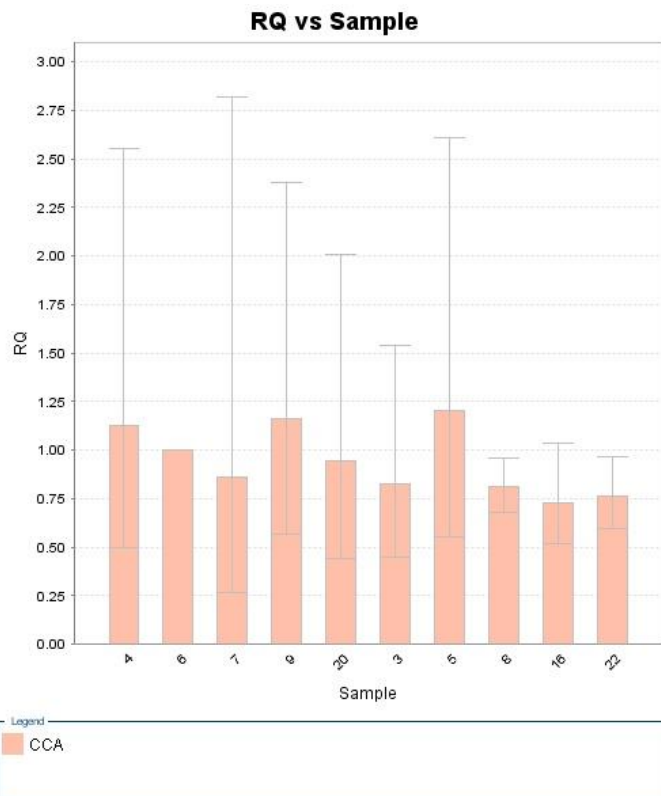
Grafikon 5 (a).



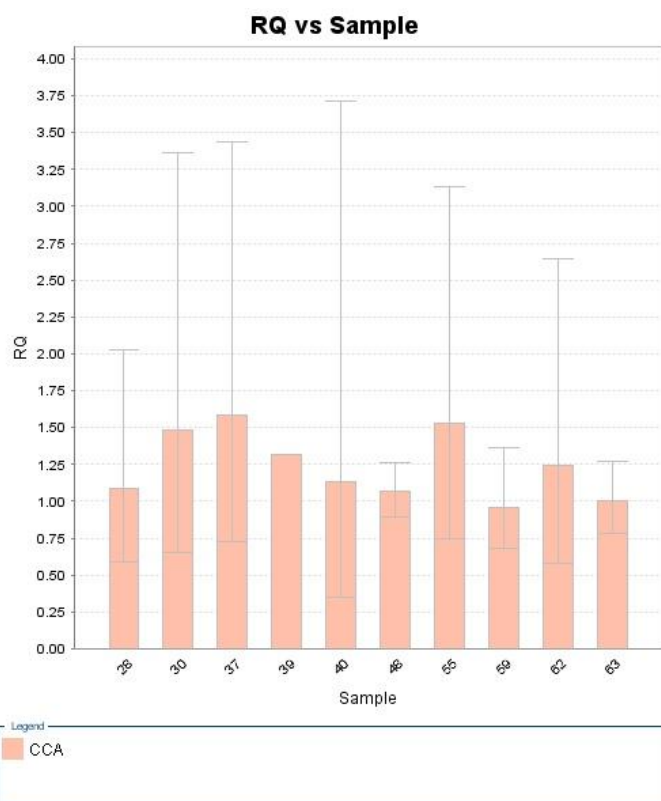
Grafikon 5 (b).



Grafikon 5 (c).



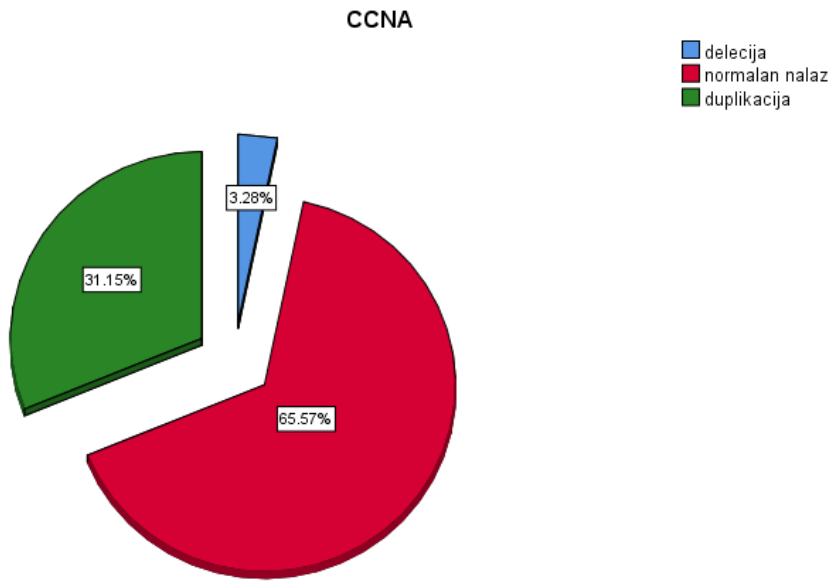
Grafikon 5 (d).



Grafikon 5 (e).

Grafikoni 5 (a-e). Prikaz rezultata analize gena CCNA qRT-PCR metodom

Distribucija pacijenata u odnosu na CCNA je prikazana grafički (grafikon 6).



Grafikon 6. Distribucija pacijenata u odnosu na CCNA

Distribucija CCNA u odnosu na ekspresiju ciklina A

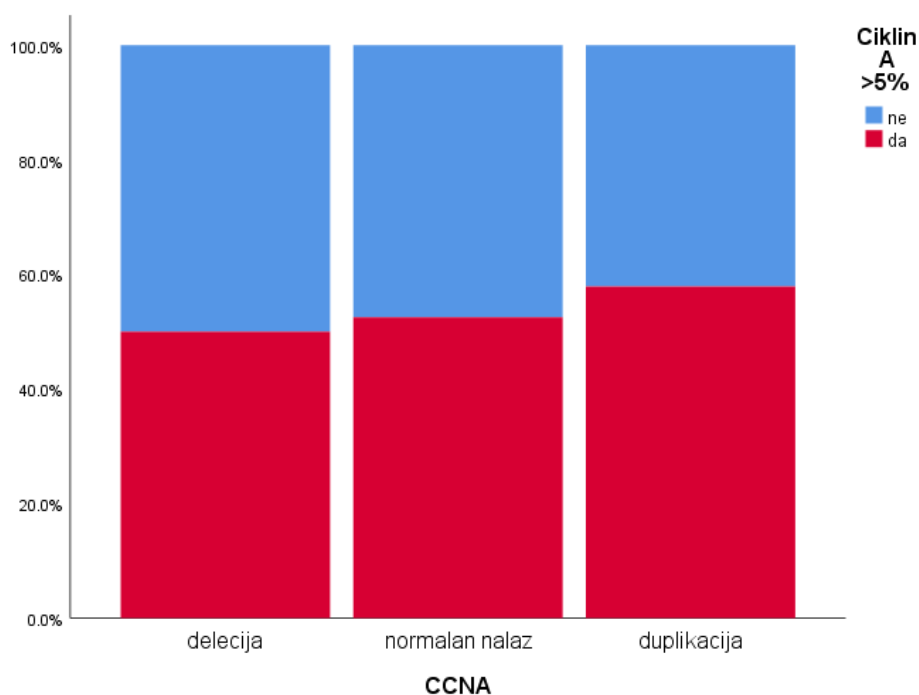
Distribucija pacijenata sa CCNA varijantama u odnosu na ekspresiju ciklina A je prikazana u tabeli 4.

Tabela 4. CCNA u odnosu na ekspresiju ciklina A

			Ciklin A >5%		
			ne	Da	Ukupno
CCNA	delecija	N	1	1	2
		%	50.0%	50.0%	100.0%
	normalan nalaz	N	19	21	40
		%	47.5%	52.5%	100.0%
	duplikacija	N	8	11	19
		%	42.1%	57.9%	100.0%
Ukupno		N	28	33	61
		%	45.9%	54.1%	100.0%

Iz tabele se vidi da je procenat pacijenata koji imaju normalan nalaz i duplikaciju vrlo sličan. U grupi pacijenata sa delecijom su samo dva pacijenta, pa je procenat nerelevantan, ali je ostavljen radi poređenja i u tabeli i na grafikonu. I u tom slučaju se radi o sličnom procentu kao sa ostalim kategorijama. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema statistički značajne razlike između ove tri grupe po ekspresiji ciklina A ($p=0,891$). Kada se iz analize zbog malog broja pacijenata isključi kategorija „delecija“, Pirsonovim hi kvadrat testom je utvrđeno da nema značajne razlike između pacijenata sa normalnim nalazom i duplikacijom po ekspresiji ciklina A ($X^2=0,151$; $p=0,698$).

Rezultati su i grafički prikazani (grafikon 7).



Grafikon 7. CCNA u odnosu na ekspresiju ciklina A

Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju ciklina A

Ispitivana je povezanost ekspresije ciklina A sa kliničko-morfološkim karakteristikama pacijenata. Ciklin A je analiziran i kao kontinuirano (izvorno mereno) obeležje posmatranja i kao kategorijalno (dve grupe, $\leq 5\%$ i $> 5\%$).

U tabeli 5 prikazana je deskriptivna statistika ciklina A u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike (ciklin A kao kontinuirano obeležje posmatranja).

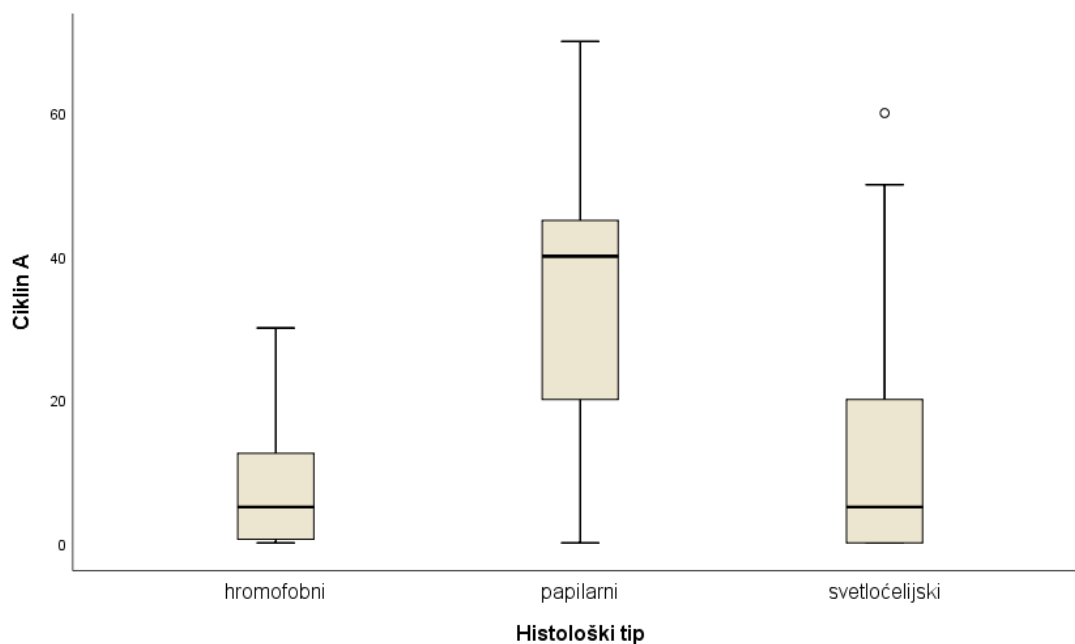
Tabela 5. Kliničko-morfološke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju ciklina A (kontinuirano)

		Ciklin A						Rezultati testiranja
		N	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Pol	muški	48	16.7	20.1	5.0	.0	30.0	Z=-0.741
	ženski	26	17.3	16.3	15.0	1.0	30.0	p=0.459 ^a
Starost	≤ 50	13	14.2	19.2	5.0	.0	15.0	H=1.475
	51-65	44	16.5	19.7	7.5	.0	30.0	
	66+	17	20.0	16.1	15.0	5.0	35.0	p=0.478 ^b
Dimenzije (cm)	≤ 4	25	13.6	18.4	5.0	.0	20.0	H =2.903
	4.1-7	35	16.4	18.0	10.0	.0	30.0	
	> 7	14	23.9	20.5	22.5	5.0	40.0	p=0.234 ^b
Histološki tip	hromofobni	7	8.7	11.0	5.0	.0	15.0	H=20.561
	papilarni	18	35.3	17.4	40.0	20.0	45.0	
	svetloćelijski	49	11.3	15.5	5.0	.0	20.0	p<0.001 ^b
Gradus	niži	41	14.4	16.5	5.0	.0	30.0	Z=-1.056
	viši	33	20.0	21.0	10.0	.0	40.0	p=0.291 ^a
Stadijum	niži	42	17.0	19.5	7.5	.0	30.0	Z=-0.173
	viši	32	16.7	17.9	10.0	.0	30.0	p=0.863 ^a
Smrtni ishod	ne	53	14.2	18.5	5.0	.0	20.0	Z=-2.341
	da	21	23.8	17.7	20.0	5.0	40.0	p=0.019 ^a

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Evidentno je da nema značajnih razlika po polu, starosti, dimenzijama tumora, gradusu i stadijumu. Ipak, vidimo da je medijana ciklina A veća kod pacijenata ženskog pola, veća je kod starijih, veća je kod pacijenata sa većim dimenzijama tumora, višim gradusom i stadijumom. Statističkom analizom nije dobijena značajnost pa nije moguće generalizovati zaključak na osnovu ovih rezultata. Ali postoji statistički značajna razlika po histološkom tipu tumora. Naime, papilarni tumori imaju najveću vrednost ciklina A, dok su hromofobni i svetloćelijski sličnih vrednosti. Obzirom da su starost i dimenzije tumora obeležja posmatranja ordinalnog tipa u ovom slučaju (gradacija), urađena je i Spirmanova korelaciona analiza kojom je takođe utvrđeno da nema povezanosti između ekspresije i starost ($\rho=0,133$; $p=0,259$), kao i ekspresije i dimenzija tumora ($\rho=0,018$; $p=0,876$).

Distribucija pacijenata prema ciklinu A u odnosu na histološki tip je i grafički prikazana (grafikon 8).



Grafikon 8. Histološki tip u odnosu na ekspresiju ciklina A

Pored histološkog tipa, postoji značajna razlika i po tome da li je pacijent imao smrtni ishod ili ne. Naime, pacijenti sa smrtnim ishodom su imali daleko veću medijanu ekspresije ciklina A u odnosu na one koji nisu imali smrtni ishod. Uticaj ciklina A u odnosu na preživljavanje je detaljnije opisan dalje u tekstu.

Ciklin A ekspresija u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike, analiziran po grupama pacijenata sa ekspresijom do 5% i većom od 5% je prikazana u tabeli 6.

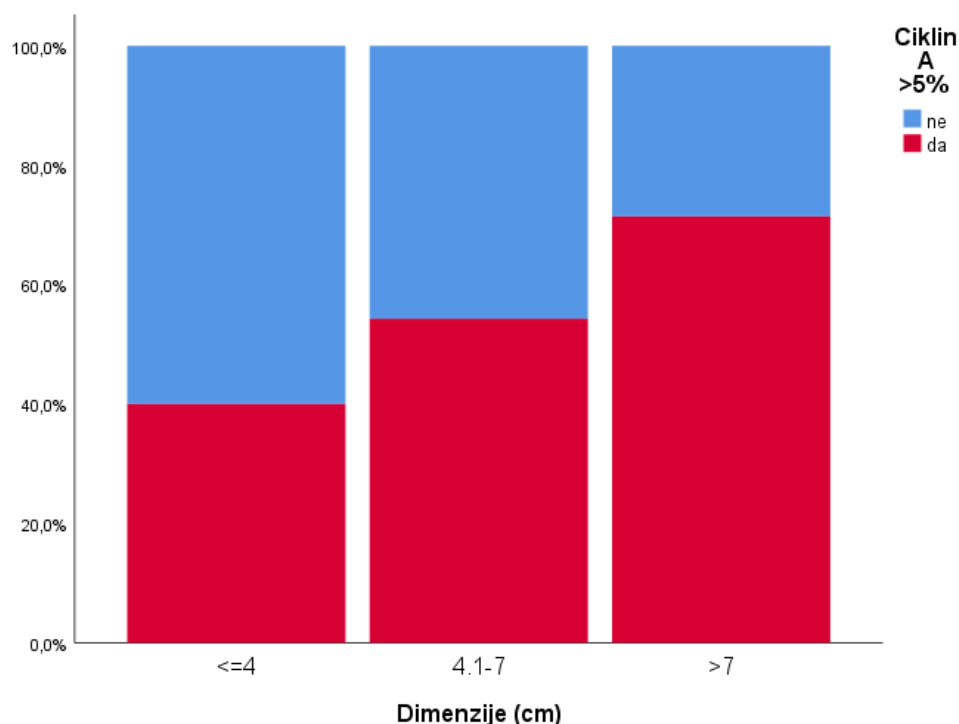
Tabela 6. Kliničko-morfološke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju ciklina A (kategorijalno)

		Ciklin A >5%				Rezultati testiranja
		Ne		Da		
		N	%	N	%	
Pol	Muški	25	52.1%	23	47.9%	$X^2=1.255$ $p=0.263^a$
	Ženski	10	38.5%	16	61.5%	
Starost	≤50	7	53.8%	6	46.2%	$X^2=1.111$ $p=0.292^b$
	51-65	22	50.0%	22	50.0%	
	66+	6	35.3%	11	64.7%	
Dimenzije (cm)	≤4	15	60.0%	10	40.0%	$X^2=3.560$ $p=0.059^b$
	4.1-7	16	45.7%	19	54.3%	
	>7	4	28.6%	10	71.4%	
Histološki tip	Hromofobni	4	57.1%	3	42.9%	$X^2=12.505^e$ $p=0.001^a$
	Papilarni	2	11.1%	16	88.9%	
	Svetloćelijski	29	59.2%	20	40.8%	
Gradus	Niži	21	51.2%	20	48.8%	$X^2=0.567$ $p=0.451^a$
	Viši	14	42.4%	19	57.6%	
Stadijum	Niži	21	50.0%	21	50.0%	$X^2=0.285$ $p=0.594^a$
	Viši	14	43.8%	18	56.3%	
Smrtni ishod	Ne	29	54.7%	24	45.3%	$X^2=4.125$ $p=0.042^a$
	Da	6	28.6%	15	71.4%	

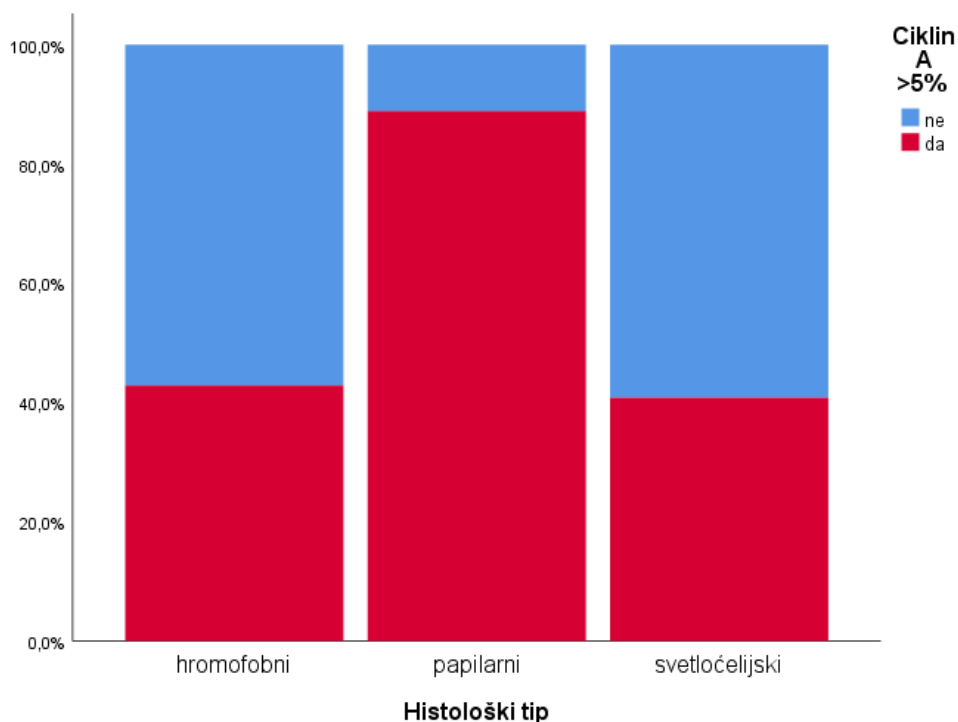
^aPirsonov hi kvadrat test ^bHi kvadrat test za trend (Mantel-Hanszel)

Pacijenti sa ekspresijom ciklina A većom od 5% su u većem procentu kod žena, starijih, sa višim gradusom i stadijumom. Pirsonovim hi kvadrat testom nije dobijena statistička značajnost u ovim analizama, pa nije moguće generalizovati zaključke. Ali, na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika po histološkom tipu. Najveći procenat pacijenata koji ima ekspresiju ciklina A veću od 5% je u grupi papilarnih karcinoma, dok su hromofobni i svetloćelijski u gotovo identičnom procentu. Kako su starost i dimenzije tumora gradacija, primarno je urađena analiza razlike po trendu. Ali, da bi proverili da li postoji razlika po učestalosti, naknadno je urađen Pirsonov hi kvadrat test i utvrđeno je da nema značajne razlike između starosnih grupa po ekspresiji ($X^2=1,335$; $p=0,513$), kao ni po dimenzijama tumora ($X^2=3,623$; $p=0,163$). Kada se uzme u obzir da je dimenzija tumora gradacija, prihvatljivo je da se analiza po trendu uzme kao primarna. U tom slučaju evidentno je da je veća učestalost ekspresije ciklina A >5% u grupi pacijenata sa većim tumorima.

Distribucije pacijenata prema ekspresiji ciklina A u odnosu na dimenzije tumora i histološki tip su prikazane i grafički (grafikon 9 i grafikon 10).



Grafikon 9. Dimenzije tumora u odnosu na ekspresiju ciklina A



Grafikon 10. Histološki tip u odnosu na ekspresiju ciklina A

Postoji i značajna razlika u preživljavanju i ona je detaljnije analizirana u daljem tekstu.

Ciklin A i preživljavanje

Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na ekspresiju ciklina A je prikazana u tabeli 7.

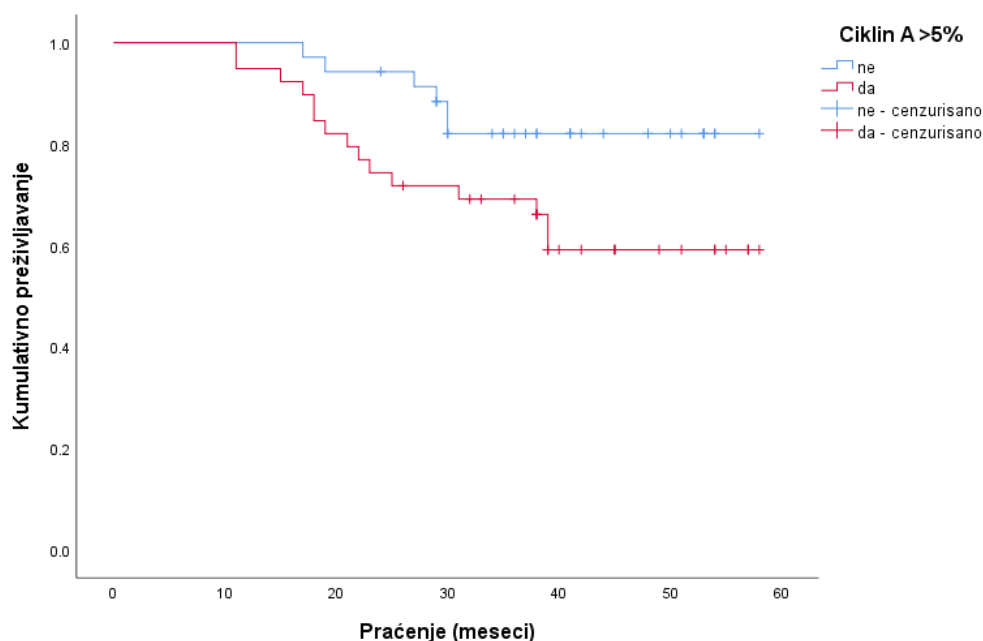
Tabela 7. Ciklin A u odnosu na preživljavanje

	Ciklin A > 5%	
	Ne	Da
Broj umrlih	6/35 (17,1%)	15/39 (38,5%)
AS preživljavanja	52,2 (47,9-56,4)	44,1 (38,4-49,8)

Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da je veći procenat umrlih u grupi pacijenata koji imaju ekspresiju ciklina A veću od 5%. Takođe, vidimo da je u ovoj grupi aritmetička sredina preživljavanja manja.

Na osnovu Log-rank testa, utvrđeno je da je razlika u preživljavanju na samoj granici konvencionalnog nivoa značajnosti ($X^2=3,823$; $p=0,051$).

Preživljavanje u odnosu na ciklin A je i grafički prikazano (Grafikon 11).



Grafikon 11. Preživljavanje u odnosu na ekspresiju ciklina A

CCNA u odnosu na kliničko-morfološke parametre

Distribucija pacijenata u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike tumora prema CCNA je prikazana u tabeli 8.

Tabela 8. CCNA u odnosu na kliničko-morfološke parametre

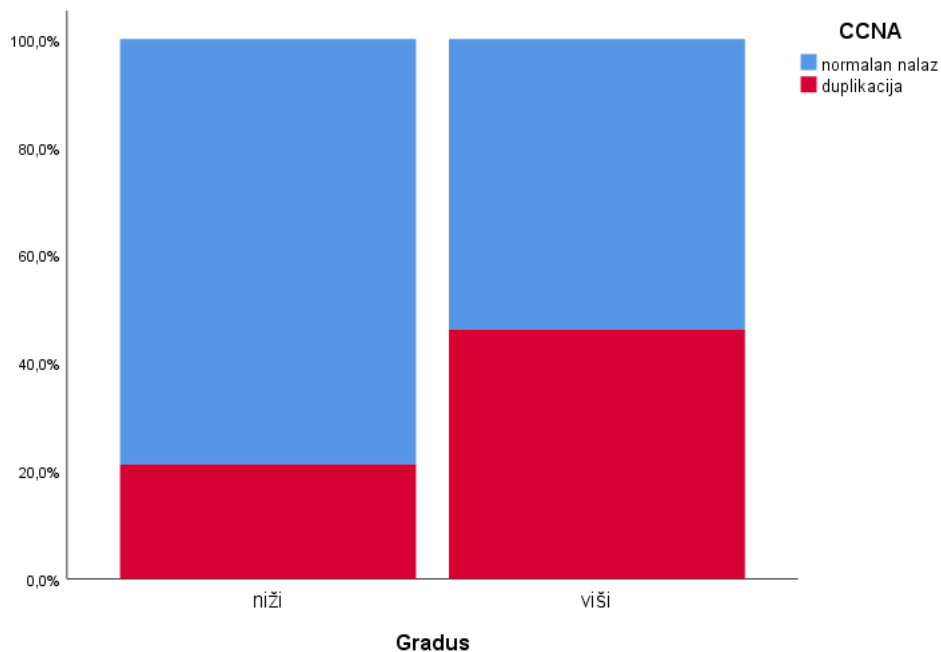
		CCNA						Sve tri grupe	Bez delecije
		delecija		normalan nalaz		duplikacija			
		N	%	N	%	N	%		
Pol	muški	2	4.9%	29	70.7%	10	24.4%	0.233 ^a	0.132 ^b
	ženski	0	0.0%	11	55.0%	9	45.0%		
Starost	≤50	1	7.7%	9	69.2%	3	23.1%	0.834 ^a	0,928 ^a
	51-65	1	2.9%	22	62.9%	12	34.3%		
	66+	0	0.0%	9	69.2%	4	30.8%		
Dimenzije (cm)	≤4	0	0.0%	13	68.4%	6	31.6%	0.735 ^a	0,996 ^b
	4.1-7	1	3.1%	21	65.6%	10	31.3%		
	>7	1	10.0%	6	60.0%	3	30.0%		
Histološki tip	hromofobni	0	0.0%	2	40.0%	3	60.0%	0.396 ^a	0,201 ^a
	papilarni	0	0.0%	9	60.0%	6	40.0%		
	svetloćelijski	2	4.9%	29	70.7%	10	24.4%		
Gradus	niži	2	5.7%	26	74.3%	7	20.0%	0.047 ^a	0,042 ^b
	viši	0	0.0%	14	53.8%	12	46.2%		
Stadijum	niži	1	2.6%	25	65.8%	12	31.6%	1.000 ^a	0,961 ^b
	viši	1	4.3%	15	65.2%	7	30.4%		
Smrtni ishod	ne	2	4.5%	30	68.2%	12	27.3%	0.409 ^a	0,348 ^b
	da	0	0.0%	10	58.8%	7	41.2%		

^aFišerov test tačne verovatnoće ^bPirsonov hi kvadrat test

S obzirom na to da grupa pacijenata sa delecijom broji samo dva pacijenta, statistička analiza je paralelno urađena sa i bez te grupe pacijenata. Na osnovu distribucije pacijenata prikazane u tabeli je utvrđeno da postoje razlike u distribuciji, ali statistički značajna razlika je jedino po

gradusu. Naime, pacijenti sa nižim gradusom dominantno imaju normalan nalaz CCNA, dok pacijenti sa višim gradusom gotovo podjednako imaju normalan nalaz i duplikaciju.

Distribucija pacijenata u odnosu na CCNA po gradusu je i grafički prikazana (grafikon 12).



Grafikon 12. CCNA u odnosu na gradus tumora

CCNA i preživljavanje

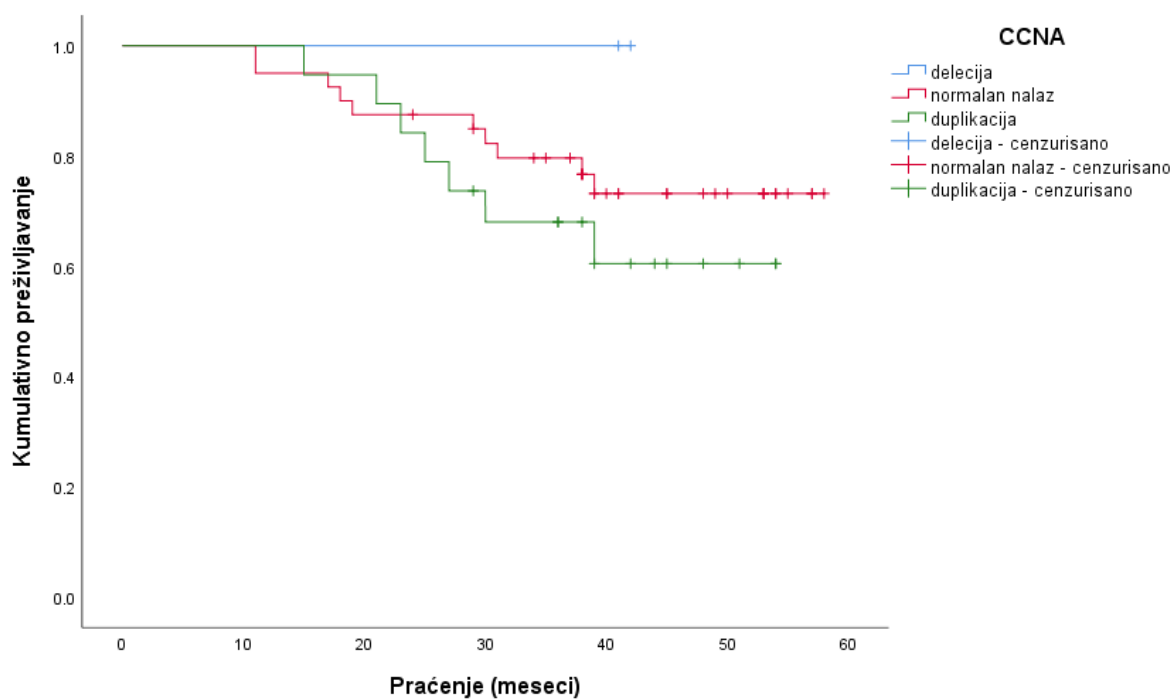
Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na CCNA je prikazana u tabeli 9.

Tabela 9. CCNA u odnosu na preživljavanje

	CCNA		
	Delecija	Normalan nalaz	Duplikacija
Broj umrlih	0/2 (0%)	10/40 (25%)	7/19 (36.8%)
AS preživljavanja		49.2 (44.3-54.1)	43.1 (36.6-49.7)

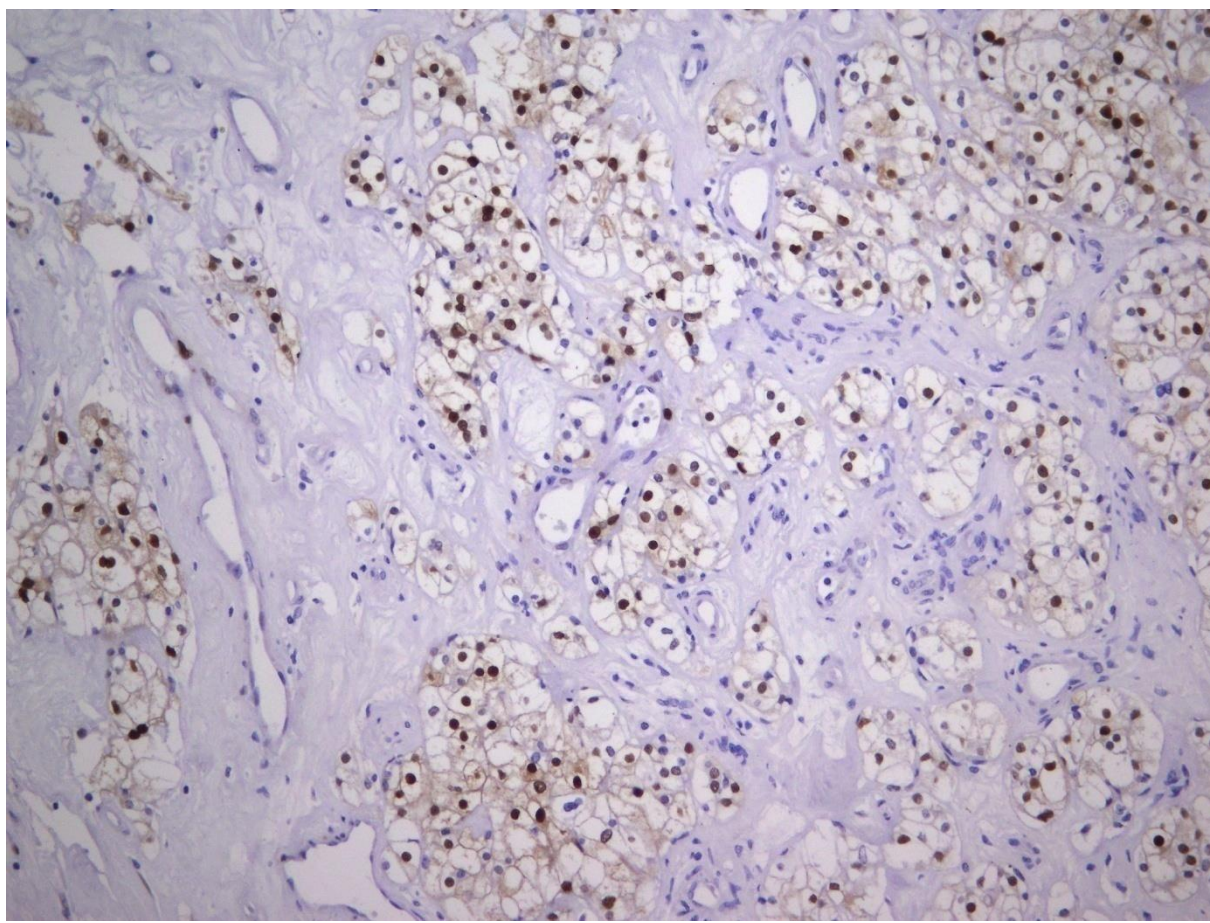
Vidimo da je procenat pacijenata sa smrtnim ishodom najveći u grupi pacijenata sa duplikacijom. Prosečno preživljavanje je nešto manje u grupi pacijenata sa duplikacijom. Statističkom analizom, Log rank testom, kada se izuzme grupa pacijenata sa delecijom, utvrđeno je da nema značajne razlike po preživljavanju između ove dve grupe ($X^2=0,851$; $p=0,356$).

Preživljavanje u odnosu na CCNA je i grafički prikazano (Grafikon 13).



Grafikon 13. CCNA i preživljavanje

CIKLIN D1



Slika 9. Ciklin D1: pozitivno imunohistohemijsko bojenje- 50%, svetloćelijski tip, gradus II, 200x.

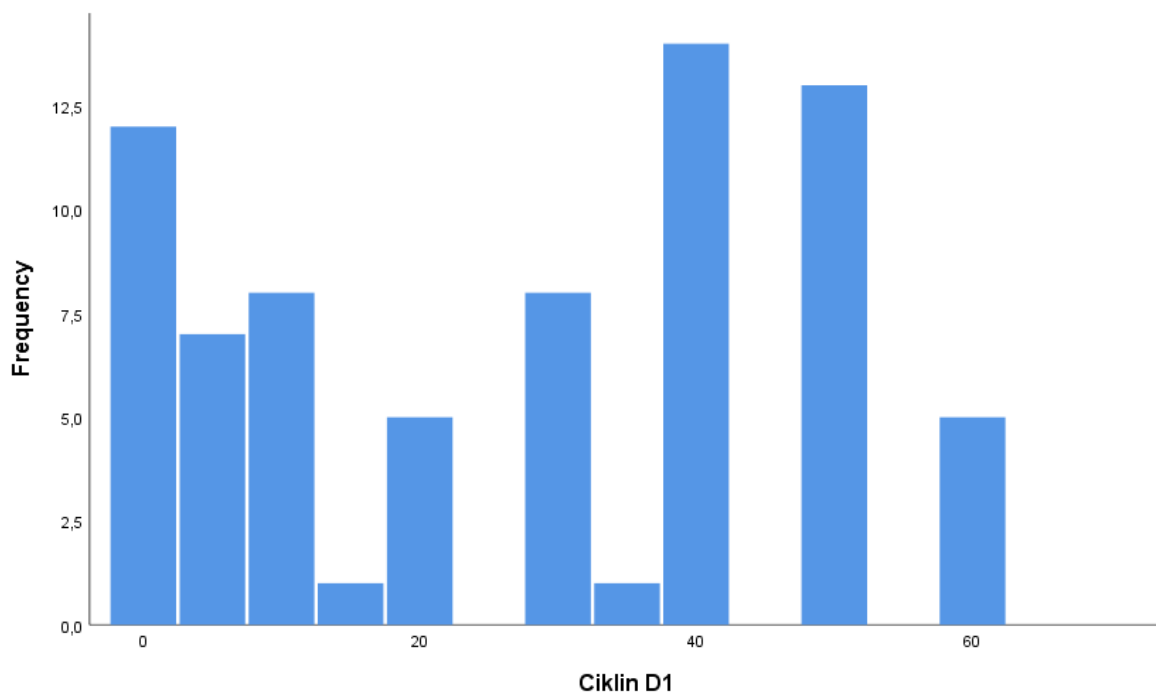
Deskriptivna statistika ciklina D1 i CCND

Deskriptivna statistika ciklina D1 je prikazana u tabeli 10.

Tabela 10. Ciklin D1

	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75
Ciklin D1	27.2	20.2	30.0	5.0	40.0

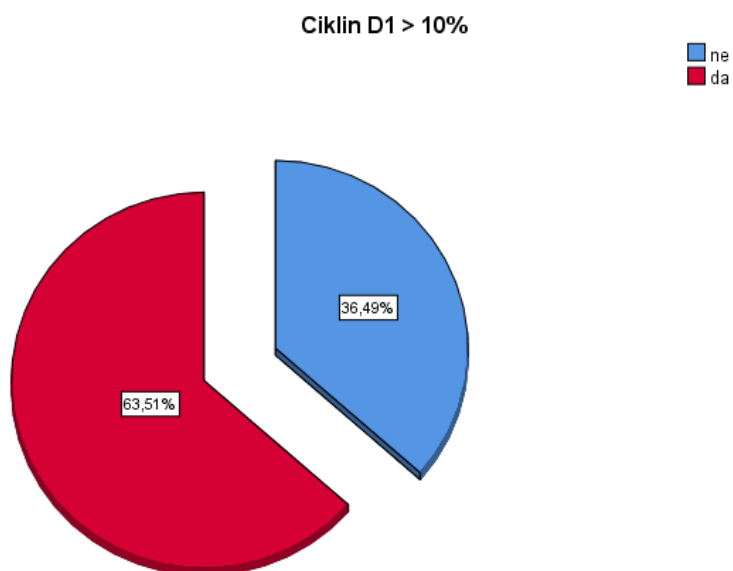
Distribucija pacijenata u odnosu na vrednost ciklina D1 je prikazana i grafički (grafikon 14).



Grafikon 14. Distribucija pacijenata u odnosu na ciklin D1

Pacijenti su u odnosu na ciklin D1 podeljeni u dve grupe. Od ukupnog broja pacijenata, vrednost do 10% ima 27 pacijenata (36.5%), a preko 10% ima 39 (63.5%).

Distribucija pacijenata je prikazana i grafički (grafikon 15).



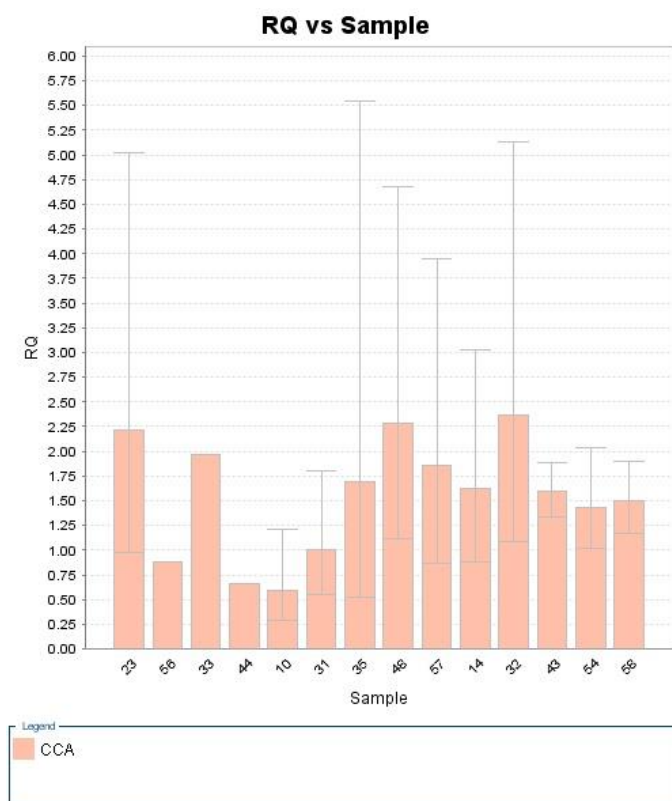
Grafikon 15. Distribucija pacijenata u odnosu na ciklin D1.

CCND

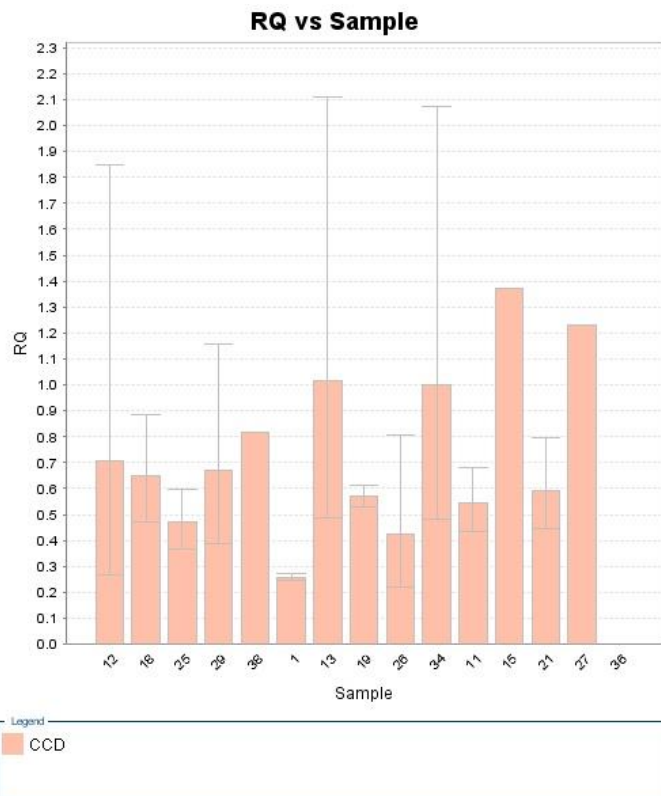
Od ukupnog broja pacijenata, za 13 pacijenata nije uspela analiza (17.6%).

Pacijenti su u odnosu na CCND podeljeni u tri grupe, oni koji imaju normalan nalaz, njih 48 (78.7%), deleciju, njih 7 (11.5%) i duplikaciju, njih 6 (9.8%).

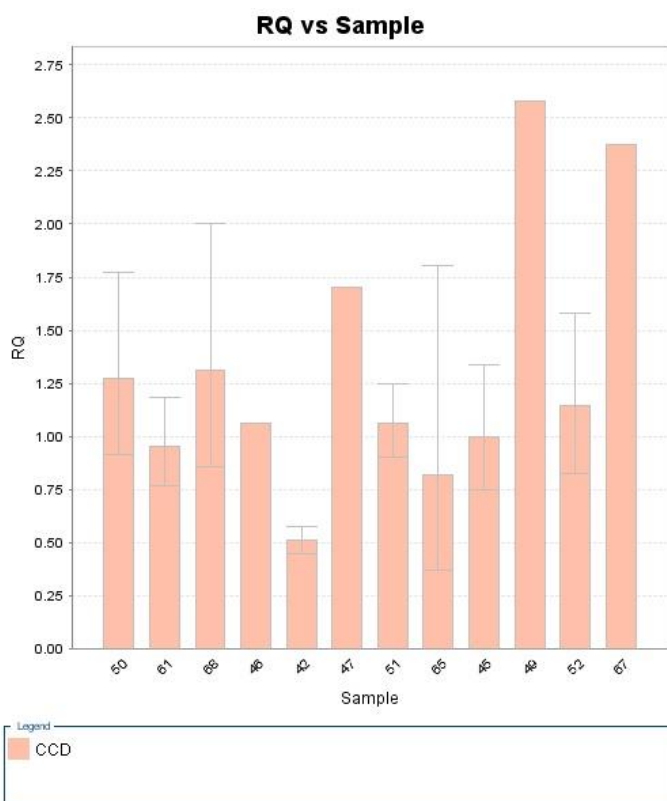
Grafički prikazani rezultati qRT-PCR za CCND (grafikoni 16 (a-e)):



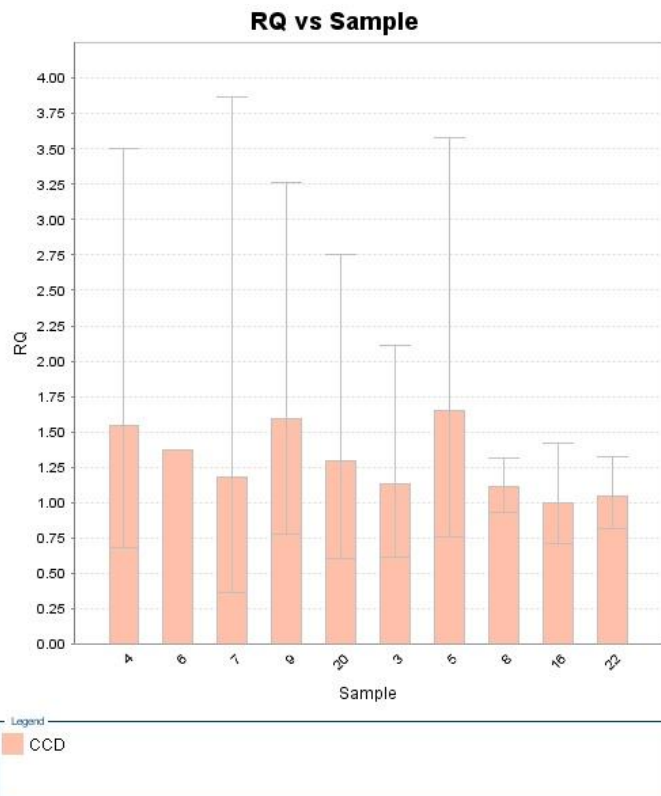
Grafikon 16 (a).



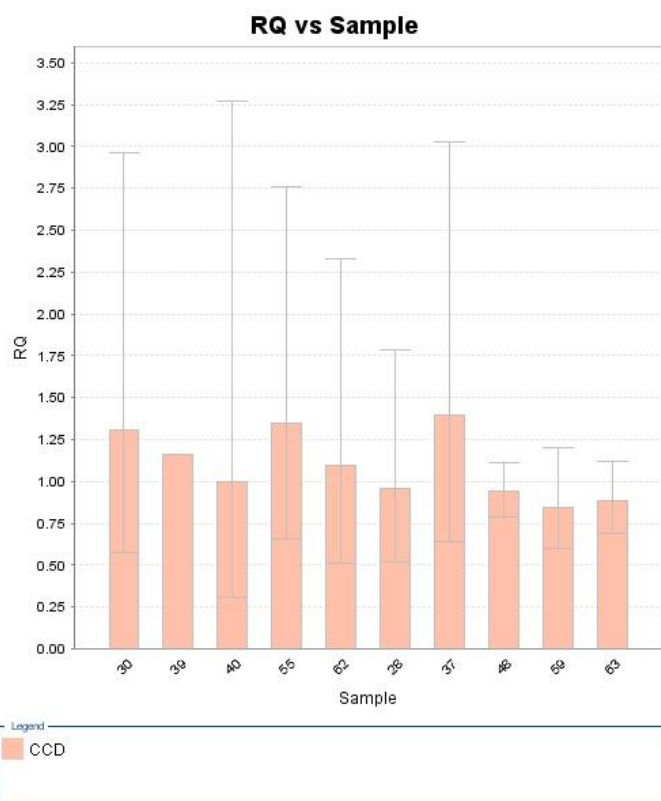
Grafikon 16 (b).



Grafikon 16 (c).



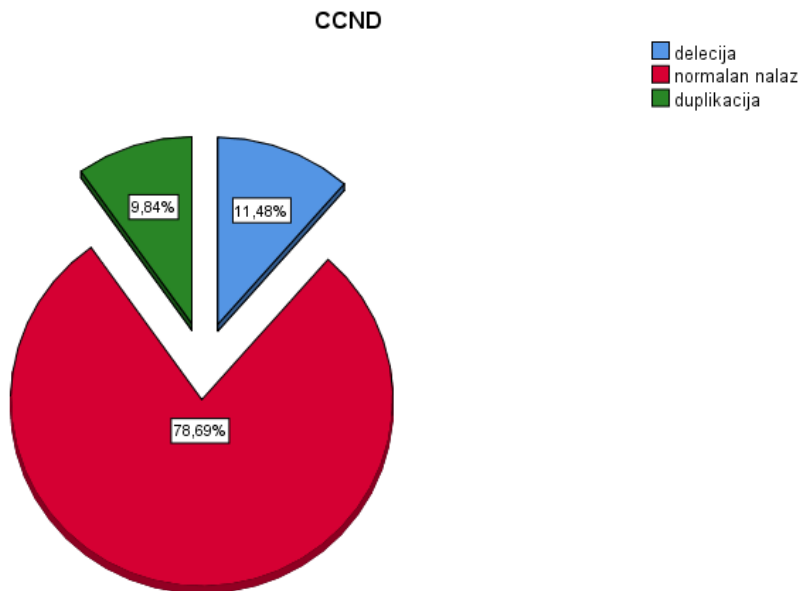
Grafikon 16 (d).



Grafikon 16 (e).

Grafikon 16 (a-e). Prikaz rezultata analize gena CCND qRT-PCR metodom

Distribucija pacijenata u odnosu na CCND je prikazana grafički (grafikon 17).



Grafikon 17. Distribucija pacijenata u odnosu na CCND

Distribucija CCND u odnosu na ekspresiju ciklina D1

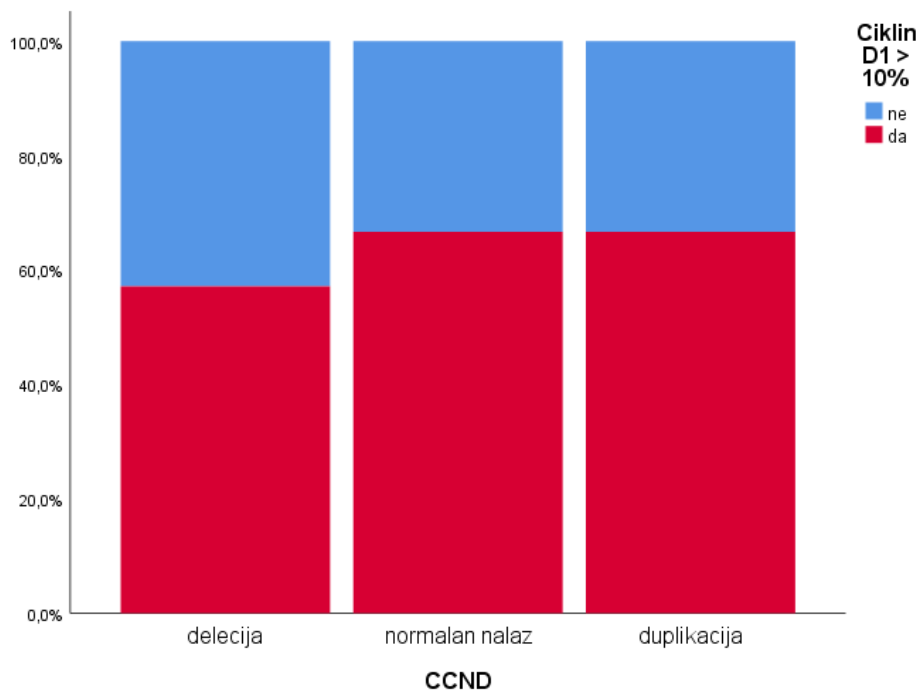
Distribucija pacijenata sa CCND varijantama u odnosu na ekspresiju ciklina D1 je prikazana u tabeli 11.

Tabela 11. CCND u odnosu na ekspresiju ciklina D1

		Ciklin D1 > 10%		
		ne	da	Ukupno
CCND	delecija	N 3	4	7
		% 42,9%	57,1%	100,0%
	normalan nalaz	N 16	32	48
		% 33,3%	66,7%	100,0%
	duplikacija	N 2	4	6
		% 33,3%	66,7%	100,0%
Ukupno		N 21	40	61
		% 34,4%	65,6%	100,0%

Iz tabele se vidi da su procenti sve tri grupe vrlo slični i da je ekspresija ciklina D1 veća od 10% vrlo slična u grupi pacijenata sa normalnim nalazom i duplikacijom. Ipak, veličine grupa su male, pa je bitno da se procenti uzimaju u analizu sa dozom rezerve. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ove tri grupe po ekspresiji ciklina D1 ($p=0,890$).

Rezultati su i grafički prikazani (grafikon 18).



Grafikon 18. CCND u odnosu na ekspresiju ciklina D1

Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju ciklina D1

Ispitivana je povezanost ekspresije ciklina D1 sa kliničkim karakteristikama pacijenata. Ciklin D je analiziran i kao kontinuirano (izvorno mereno) i kao kategorijalno obeležje posmatranja (dve grupe, $\leq 10\%$ i veće od 10%).

U tabeli 12 prikazana je deskriptivna statistika ciklina D1 u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike (ciklin D1 kao kontinuirano obeležje posmatranja).

Tabela 12. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju ciklina D1 (kontinuirano)

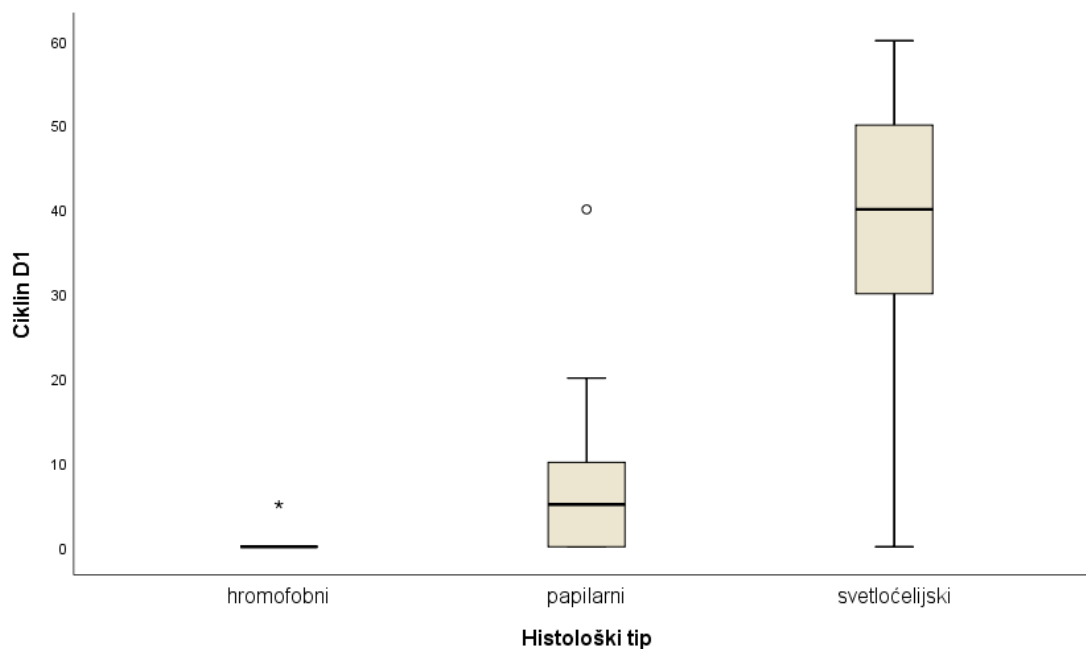
		Ciklin D1						Rezultati testiranja
		N	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Pol	muški	48	27.1	19.0	30.0	10.0	40.0	Z=-0.229 p=0.819 ^a
	ženski	26	27.5	22.5	25.0	5.0	50.0	
Starost	≤50	13	32.3	18.2	40.0	10.0	50.0	H=1.295 p=0.523 ^b
	51-65	44	26.2	20.5	30.0	5.0	40.0	
	66+	17	25.9	21.3	20.0	10.0	40.0	
Dimenzije (cm)	≤4	25	30.4	18.2	40.0	15.0	40.0	H=1.080 p=0.583 ^b
	4.1-7	35	26.6	20.1	30.0	5.0	50.0	
	>7	14	23.2	24.0	10.0	.0	50.0	
Histološki tip	hromofobni	7	.7	1.9	.0	.0	.0	H=41.381 p<0.001 ^b
	papilarni	18	8.1	9.6	5.0	.0	10.0	
	svetloćelijski	49	38.1	15.0	40.0	30.0	50.0	
Gradus	niži	41	31.0	19.9	40.0	10.0	50.0	Z=-1.846 p=0.065 ^a
	viši	33	22.6	19.8	20.0	.0	40.0	
Stadijum	niži	42	26.0	19.0	30.0	5.0	40.0	Z=-0.689 p=0.491 ^a
	viši	32	28.9	21.7	30.0	7.5	50.0	
Smrtni ishod	ne	53	28.3	19.5	30.0	10.0	40.0	Z=-0.721 p=0.471 ^a
	da	21	24.5	22.0	20.0	5.0	40.0	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Iz tabele se vidi da je prosečna vrednost, odnosno medijana ciklina D slična po polu, opada sa povećanjem starosne kategorije i dimenzije tumora, slična je kod višeg i nižeg stadijuma. Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da nema značajnih razlika po polu, starosti, dimenzijama tumora, stadijumu i smrtnom ishodu. Razlika po gradusu je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, dok je jedina statistički značajna razlika po histološkom tipu. Naime, najveću medijanu imaju pacijenti sa svetloćelijskim tipom karcinoma, dok je najmanja kod hromofobnog. S obzirom na to da su starost i dimenzije tumora obeležja posmatranja ordinalnog tipa u ovom slučaju (gradacija), urađena je i Spirmanova korelaciona analiza

kojom je takođe utvrđeno da nema povezanosti između ekspresije i starosti ($\rho=-0,092$; $p=0,437$), kao i ekspresije i dimenzija tumora ($\rho=-0,122$; $p=0,302$).

Distribucija pacijenata prema ciklinu D1 u odnosu na histološki tip je i grafički prikazana (grafikon 19).



Grafikon 19. Histološki tip u odnosu na ekspresiju ciklina D1

Ekspresija ciklina D1 u odnosu na kliničke karakteristike, analizirana po grupama pacijenata sa ekspresijom do 10% i većom od 10% je prikazana u tabeli 13.

Tabela 13. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju ciklina D1 (kategorijalno)

		Ciklin D1 > 10%				
		ne		da		
		N	%	N	%	
Pol	muški	16	33,3%	32	66,7%	$X^2=0.586$ $p=0.444^a$
	ženski	11	42,3%	15	57,7%	
Starost	≤50	4	30,8%	9	69,2%	$X^2=0.345$ $p=0.842^b$
	51-65	16	36,4%	28	63,6%	
	66+	7	41,2%	10	58,8%	
Dimenzije (cm)	≤4	6	24,0%	19	76,0%	$X^2=0.339$ $p=0.560^b$
	4.1-7	13	37,1%	22	62,9%	
	>7	8	57,1%	6	42,9%	
Histološki tip	hromofobni	7	100,0%	0	0,0%	$p<0.001^c$
	papilarni	16	88,9%	2	11,1%	
	svetloćelijski	4	8,2%	45	91,8%	
Gradus	niži	12	29,3%	29	70,7%	$X^2=2,067^a$ $p=0,151$
	viši	15	45,5%	18	54,5%	
Stadijum	niži	15	35,7%	27	64,3%	$X^2=0,025$ $p=0,874^a$
	viši	12	37,5%	20	62,5%	
Smrtni ishod	ne	18	34,0%	35	66,0%	$X^2=0,514$ $p=0,474^a$
	da	9	42,9%	12	57,1%	

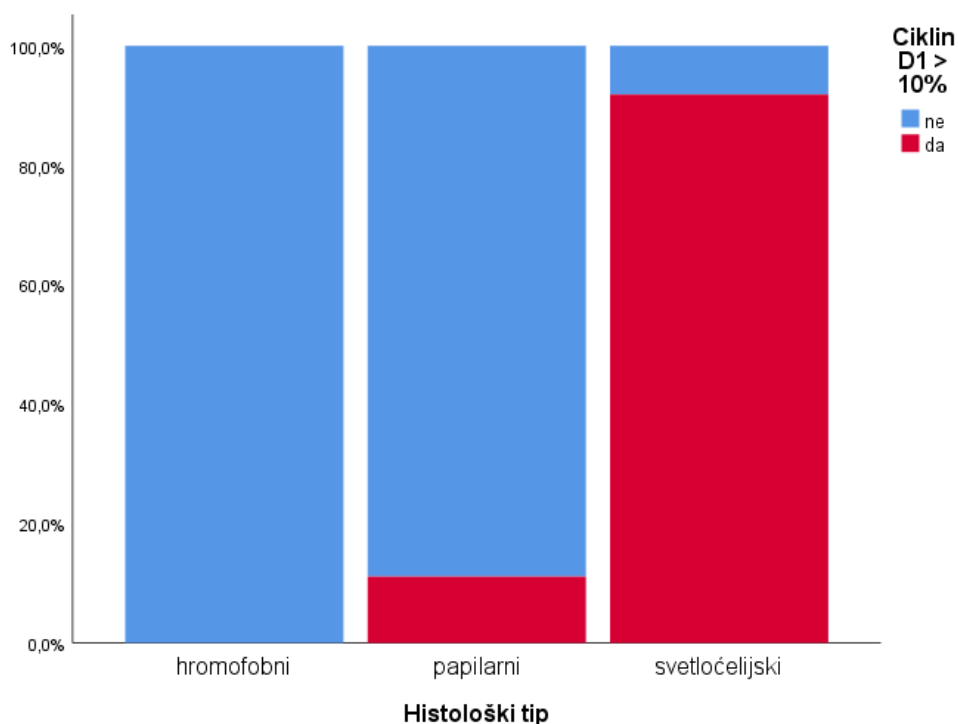
^aPirsonov hi kvadrat test ^bHi kvadrat test za trend (Mantel-Hanszel) ^cFišerov test tačne verovatnoće

Na osnovu distribucije pacijenata vidimo da je ekspresija ciklina D1 veća od 10% u nešto većem procentu kod muškaraca, opada sa starenjem i povećanjem dimenzija tumora. Slična je u oba stadijuma, ali je zato u većem procentu kod pacijenata sa nižim gradusom i kod pacijenata koji su imali smrtni ishod. Ipak, ove razlike nisu statistički značajne. Kako su starost i dimenzije tumora gradacija, primarno je urađena analiza razlike po trendu. Ali, da

bismo proverili da li postoji razlika po učestalosti, naknadno je urađen Pirsonov hi kvadrat test i utvrđeno je da nema značajne razlike između starosnih grupa po ekspresiji ($X^2=0.345$; $p=0,842$), kao ni po dimenzijama tumora ($X^2=4.266$; $p=0,118$). Ipak, s obzirom na to da su ova obeležja posmatranja gradacija, uzimamo analizu trenda za primarni rezultat.

Na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika prema histološkom tipu. Najveći procenat pacijenata koji ima ekspresiju ciklina D veću od 10% je u grupi svetloćelijskih karcinoma, dok su hromofobni i papilarni u daleko manjem procentu.

Distribucija pacijenata prema ekspresiji ciklina D1 u odnosu na histološki tip prikazana je i grafički (grafikon 20).



Grafikon 20. Dimenzije tumora u odnosu na ekspresiju ciklina D1

Ciklin D1 i preživljavanje

Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na ekspresiju ciklina D1 je prikazana u tabeli 14.

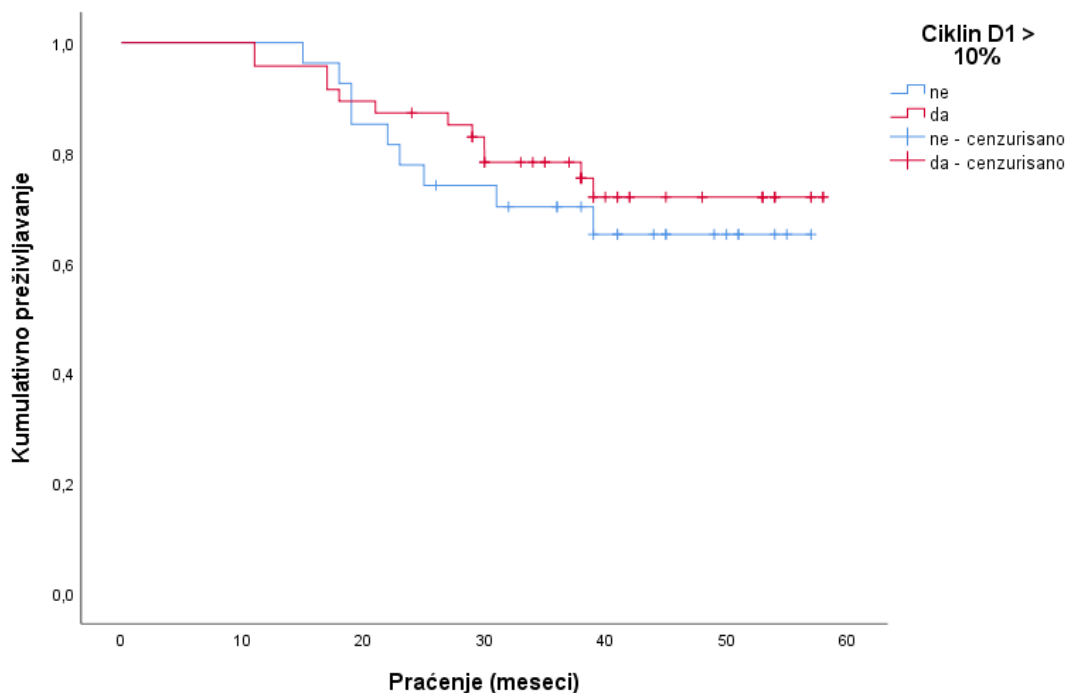
Tabela 14. Ciklin D1 u odnosu na preživljavanje

	Ciklin D1 > 10%	
	Ne	Da
Broj umrlih	9/27 (33,3%)	12/47 (25,5%)
AS preživljavanja	45,5 (39,3-51,7)	48,8 (44,2-53,4)

Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da je veći procenat umrlih u grupi pacijenata koji nemaju ekspresiju ciklina D1 veću od 10%. Ali, ta razlika je kvantitativno mala i iznosi 8%. Takođe, vidimo da je u ovoj grupi aritmetička sredina preživljavanja manja, ali opet za samo 3 meseca.

Na osnovu Log-rank testa, utvrđeno je da je razlika u preživljavanju nije statistički značajna ($X^2=0,414$; $p=0,520$).

Preživljavanje u odnosu na ciklin D1 je i grafički prikazano (grafikon 21).



Grafikon 21. Preživljavanje u odnosu na ekspresiju ciklina D1

CCND u odnosu na kliničko-morfološke parametre

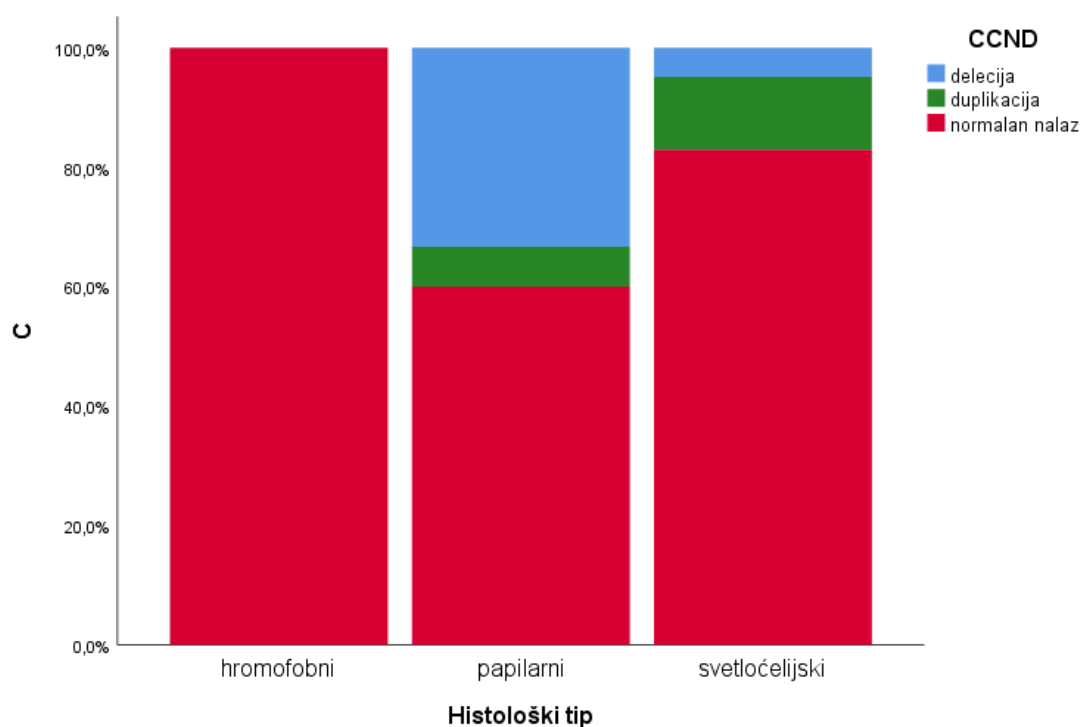
Distribucija pacijenata u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike tumora prema CCND je prikazana u tabeli 15.

Tabela 15. CCND u odnosu na kliničko-morfološke parametre

		CCND						Rezultati testiranja ^a
		delecija		normalan nalaz		duplikacija		
		N	%	N	%	N	%	
Pol	muški	5	12,2%	33	80,5%	3	7,3%	p=0.632
	ženski	2	10,0%	15	75,0%	3	15,0%	
Starost	≤50	3	23,1%	9	69,2%	1	7,7%	p=0.615
	51-65	3	8,6%	29	82,9%	3	8,6%	
	66+	1	7,7%	10	76,9%	2	15,4%	
Dimenzije (cm)	≤4	3	15,8%	14	73,7%	2	10,5%	p=0.641
	4.1-7	3	9,4%	27	84,4%	2	6,3%	
	>7	1	10,0%	7	70,0%	2	20,0%	
Histološki tip	hromofobni	0	0,0%	5	100,0%	0	0,0%	p=0.060
	papilarni	5	33,3%	9	60,0%	1	6,7%	
	svetloćelijski	2	4,9%	34	82,9%	5	12,2%	
Gradus	niži	3	8,6%	28	80,0%	4	11,4%	p=0.731
	viši	4	15,4%	20	76,9%	2	7,7%	
Stadijum	niži	5	13,2%	30	78,9%	3	7,9%	p=0.801
	viši	2	8,7%	18	78,3%	3	13,0%	
Smrtni ishod	ne	6	13,6%	33	75,0%	5	11,4%	p=0.679
	da	1	5,9%	15	88,2%	1	5,9%	

^aFišerov test tačne verovatnoće

Iz tabele vidimo da postoje razlike u procentima između ispitivanih grupa, ali se radi o relativno malim uzorcima u pojedinim analizama, pa nije ni očekivano da se dobije statistička značajnost. Jedina signifikantnost koja je blizu konvencionalnog nivoa je kod histološkog tipa. Naime, vidimo da je kod hromofobnog normalan nalaz jedini nalaz (ali je grupa mala i ima samo 5 pacijenata), dok je i u ostale dve grupe normalan nalaz dominantan, ali je interesantno da jedna trećina pacijenata sa papilarnim tipom tumora ima deleciju.



Grafikon 22. CCND u odnosu na histološki tip tumora

CCND i preživljavanje

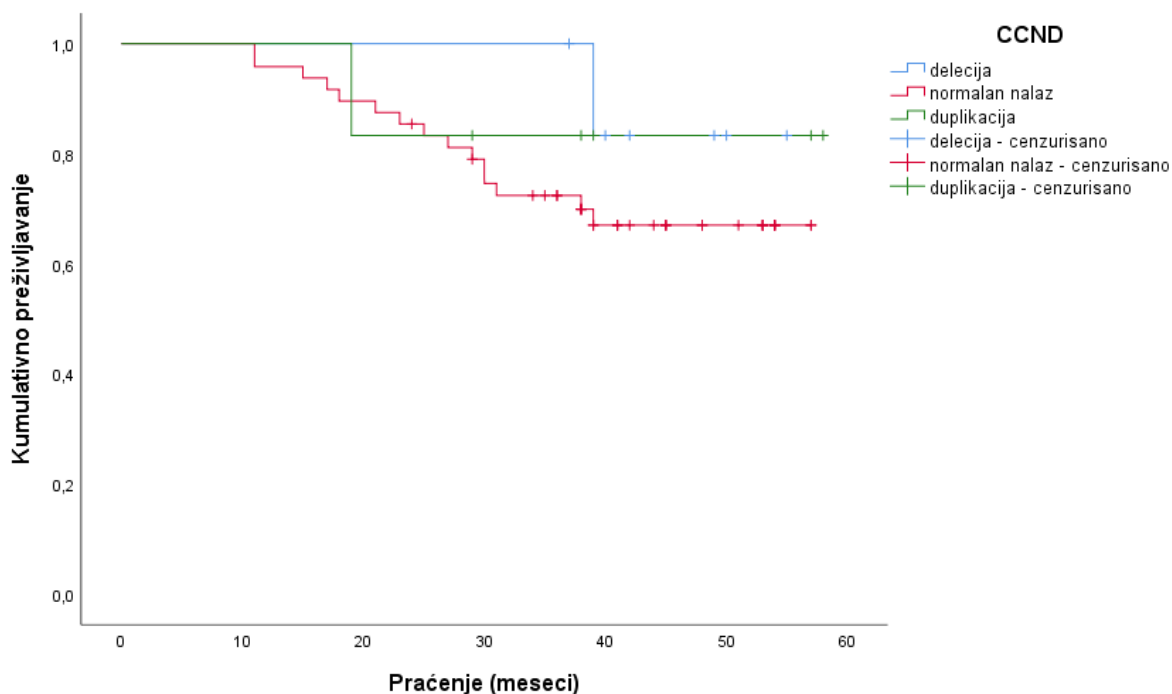
Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na CCND je prikazana u tabeli 16.

Tabela 16. CCND u odnosu na preživljavanje

	CCND		
	Delecija	Normalan nalaz	Duplikacija
Broj umrlih	1/7 (14,3%)	15/48 (31,2%)	1/6 (16,7%)
AS preživljavanja	52,3 (47,6-57,1)	46,4 (41,8-50,9)	51 (39,9-63,1)

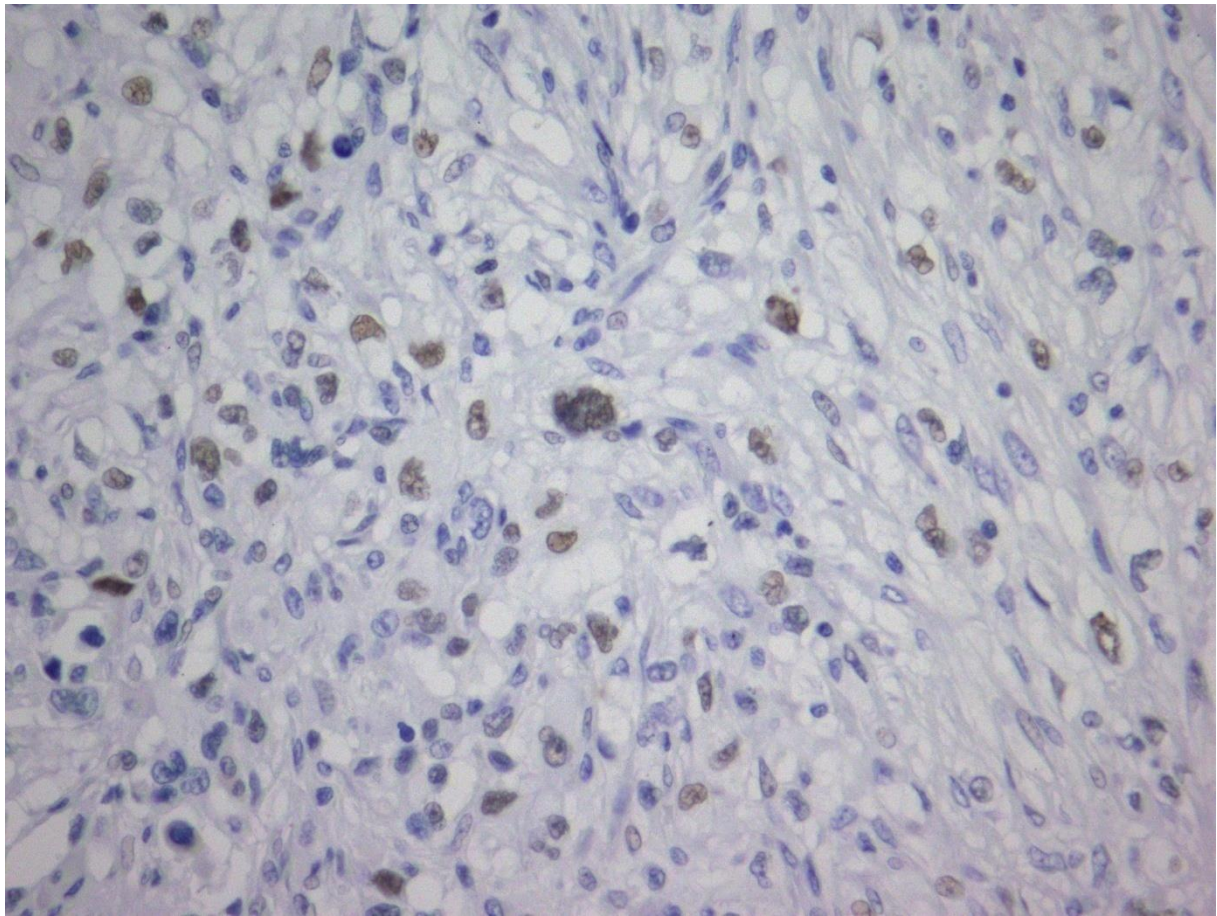
Vidimo da je procenat pacijenata sa smrtnim ishodom najveći u grupi pacijenata sa normalnim nalazom, a gotovo identičan u grupi sa delecijom i duplikacijom. Prosečno preživljavanje je nešto manje u grupi pacijenata sa normalnim nalazom u odnosu na ostala dva. Statističkom analizom, Log rank testom, utvrđeno je da nema značajne razlike po preživljavanju između ove dve grupe ($X^2=1,347$; $p=0,510$).

Preživljavanje u odnosu na CCND je i grafički prikazano (grafikon 23).



Grafikon 23. CCND i preživljavanje

P16



Slika 10. p16: pozitivno imunohistohemijsko bojenje- 30%, svetloćelijski tip, gradus III, 400x.

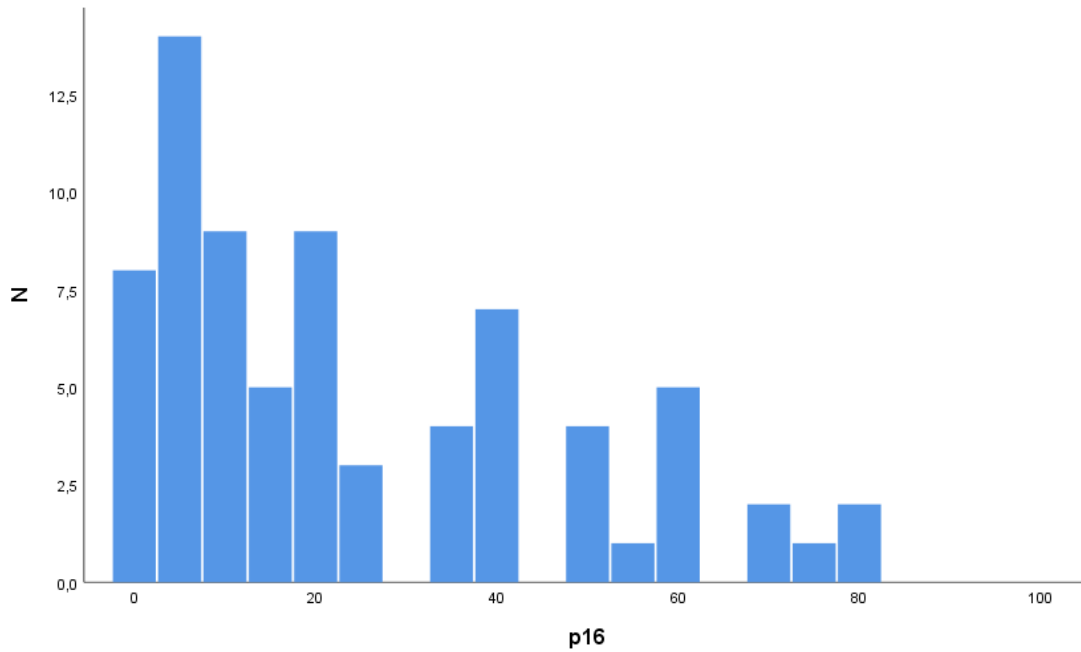
Deskriptivna statistika p16 i CDKN2A

Deskriptivna statistika p16 je prikazana u tabeli 17.

Tabela 17. p16

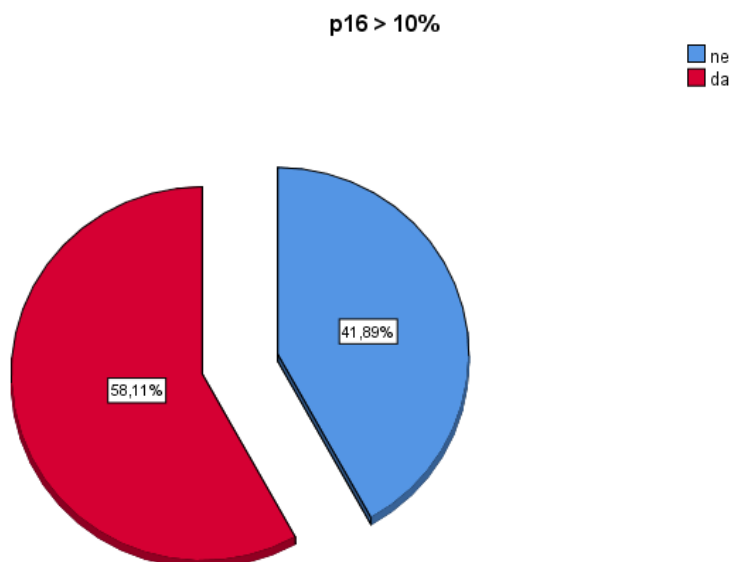
	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75
p16	24.9	22.6	20.0	5.0	40.0

Distribucija pacijenata u odnosu na vrednost p16 je prikazana i grafički (grafikon 24).



Grafikon 24. Distribucija pacijenata u odnosu na p16

Pacijenti su u odnosu na ekspresiju p16 podeljeni u dve grupe. Od ukupnog broja pacijenata, vrednost do 10% ima 31 pacijent (41.9%), a preko 10% ima 43 (58.1%). Distribucija pacijenata je prikazana i grafički (grafikon 25).



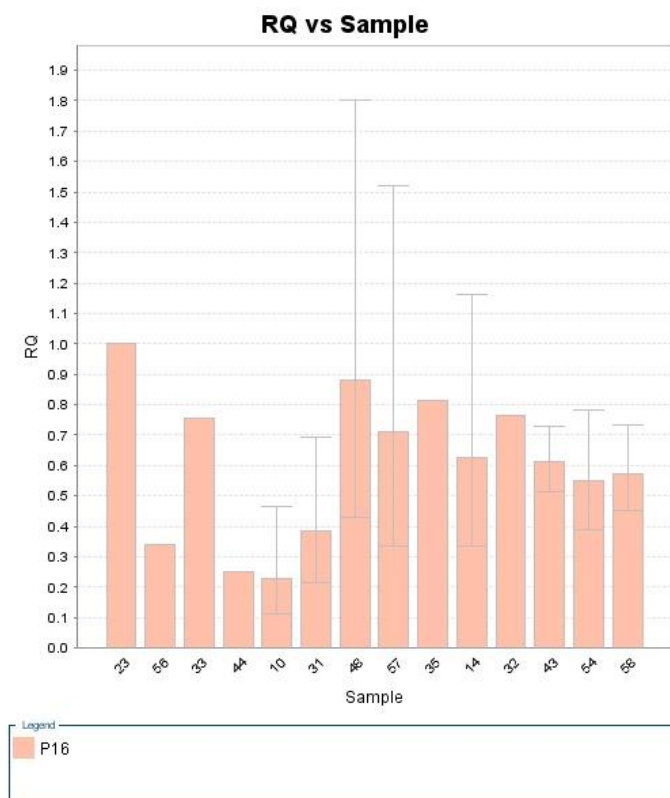
Grafikon 25. Distribucija pacijenata prema p16

CDKN2A

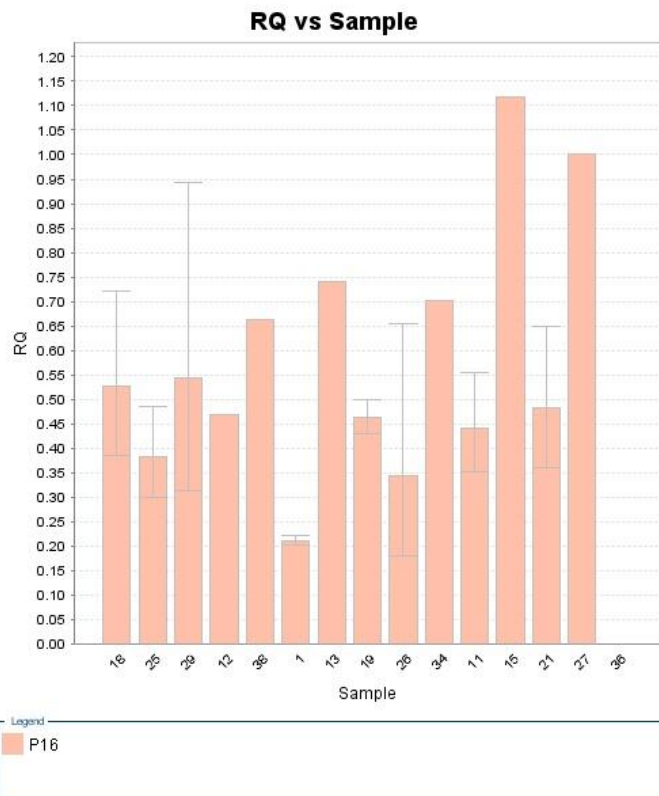
Od ukupnog broja pacijenata, za 13 pacijenata nije uspela analiza (17.6%).

Pacijenti su u odnosu na CDKN2A podeljeni u tri grupe, oni koji imaju normalan nalaz, njih 46 (75.4%), deleciju, njih 14 (23.0%) i duplikaciju, jedan pacijent (1.6%).

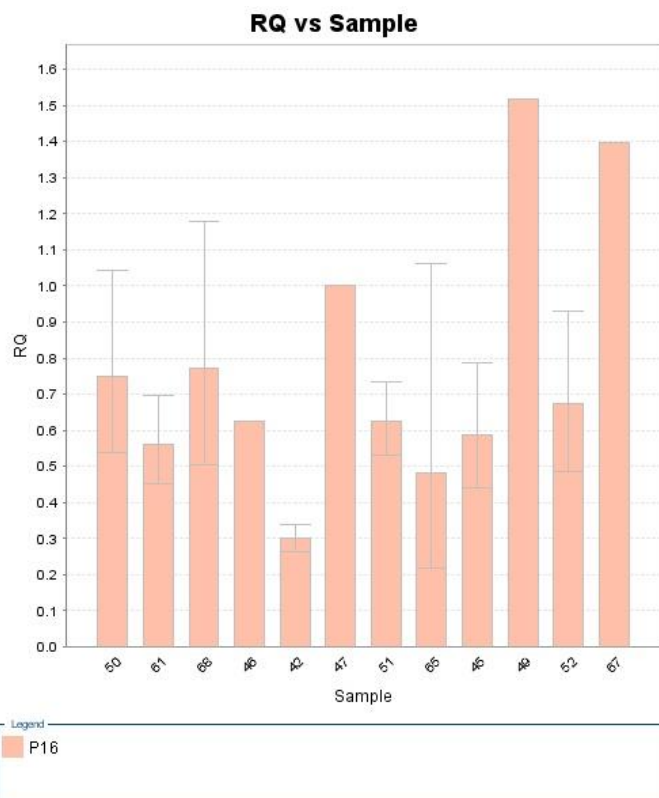
Grafički prikaz rezultata qRT-PCR za CDKN2A (grafikoni 26 (a-e)):



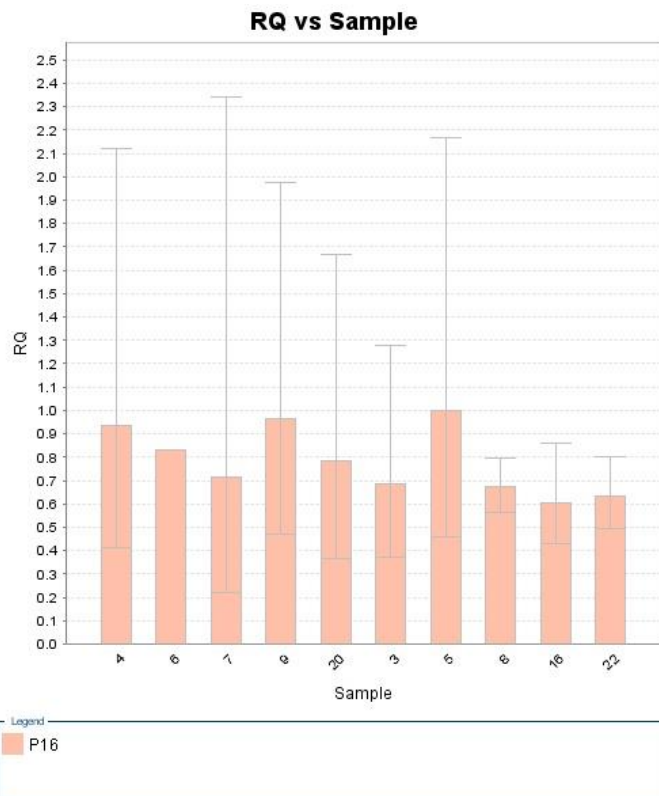
Grafikon 26 (a).



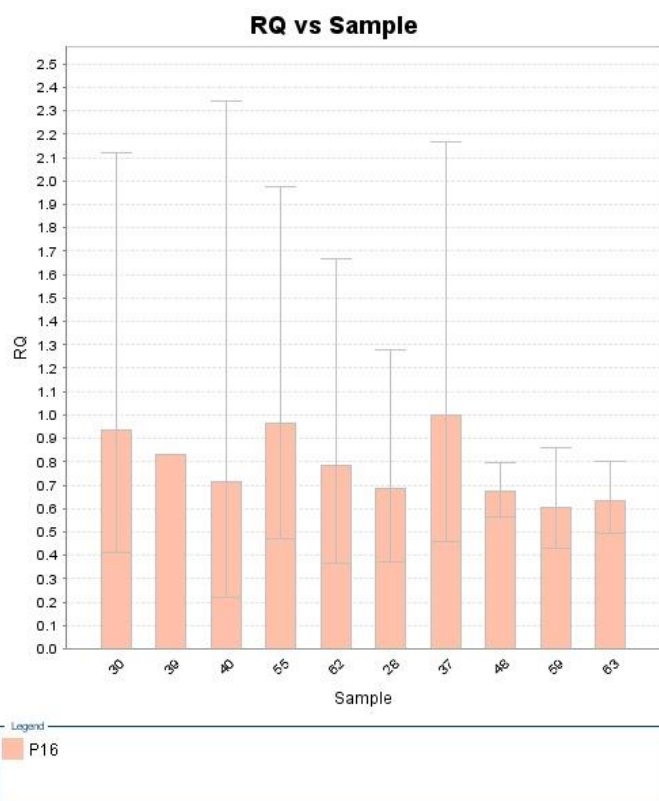
Grafikon 26 (b).



Grafikon 26 (c).



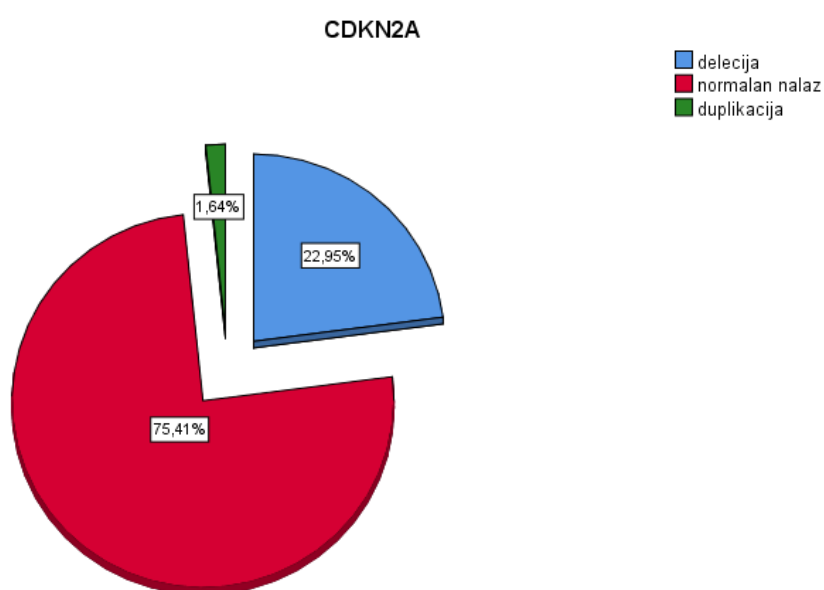
Grafikon 26 (d).



Grafikon 26 (e).

Grafikon 26 (a-e): Prikaz rezultata analize ekspresije gena CDKN2A qRT-PCR metodom.

Distribucija pacijenata u odnosu na CDKN2A je prikazana grafički (grafikon 27).



Grafikon 27. Distribucija pacijenata prema CDKN2A

Distribucija CDKN2A u odnosu na ekspresiju p16

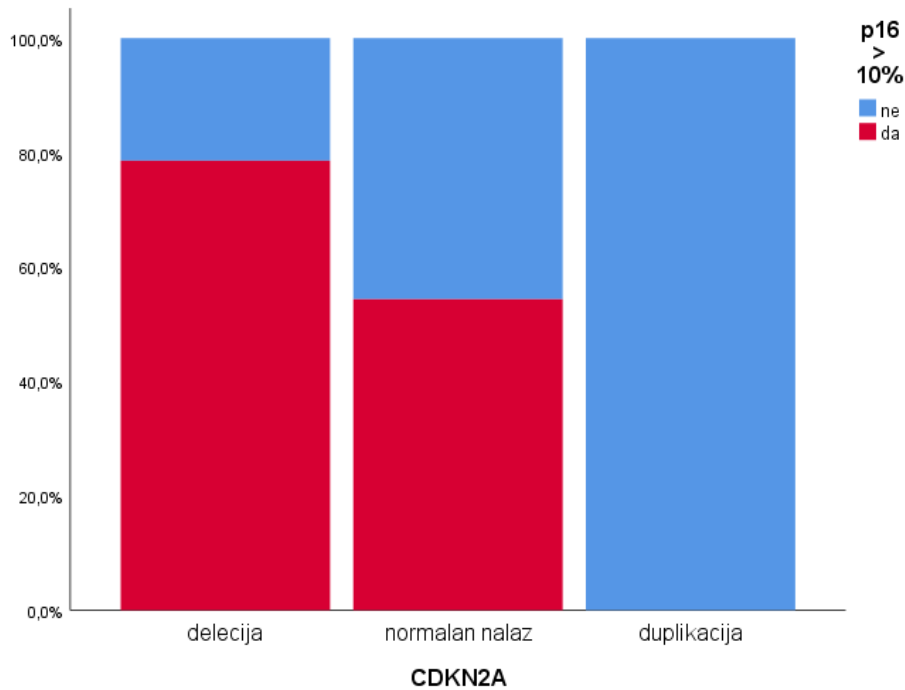
Distribucija pacijenata sa CDKN2A varijantama u odnosu na ekspresiju p16 je prikazana u tabeli 18.

Tabela 18. CDKN2A u odnosu na ekspresiju p16

		p16 > 10%		
		ne	da	Ukupno
	%	21,4%	78,6%	100,0%
normalan nalaz	N	21	25	46
	%	45,7%	54,3%	100,0%
duplikacija	N	1	0	1
	%	100,0%	0,0%	100,0%
Ukupno	N	25	36	61
	%	41,0%	59,0%	100,0%

Iz tabele se vidi da je procenat pacijenata koji imaju deleciju najveći, zatim slede pacijenti sa normalnim nalazom, dok samo jedan pacijent ima duplikaciju. Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema statistički značajne razlike između ove tri grupe po ekspresiji p16 ($p=0,092$). Kada se iz analize, zbog malog broja pacijenata, isključi kategorija „duplikacija“, Pirsonovim hi kvadrat testom je utvrđeno da nema značajne razlike između pacijenata sa normalnim nalazom i delecijom po ekspresiji p16 ($X^2=2.624$; $p=0,105$).

Rezultati su i grafički prikazani (grafikon 28).



Grafikon 28. CDKN2A u odnosu na ekspresiju p16

Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju p16

Ispitivana je povezanost ekspresije p16 sa kliničkim karakteristikama pacijenata. p16 je analiziran i kao kontinuirano (izvorno mereno) obeležje posmatranja i kao kategorijalno (dve grupe, $\leq 10\%$ i $> 10\%$).

U tabeli 19 prikazana je deskriptivna statistika p16 u odnosu na kliničke karakteristike (p16 kao kontinuirano obeležje posmatranja).

Tabela 19. Kliničko-morfološke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju p16 (kontinuirano)

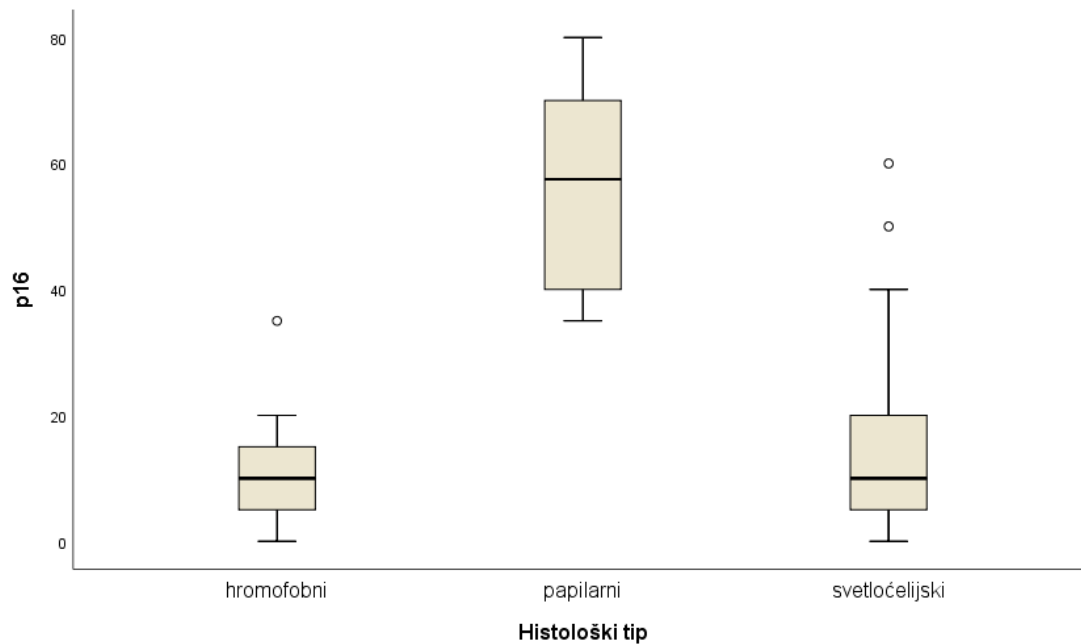
		p16						Rezultati testiranja
		N	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Pol	muški	48	24.7	23.0	17.5	5.0	40.0	Z=-0.348
	ženski	26	25.2	22.4	20.0	5.0	40.0	p=0.728
Starost	≤50	13	23.1	24.4	15.0	5.0	35.0	H=1.510 p=0.470
	51-65	44	23.7	23.1	17.5	5.0	40.0	
	66+	17	29.1	20.9	25.0	10.0	40.0	
Dimenzije (cm)	≤4	25	22.4	22.9	15.0	5.0	35.0	H=2.043 p=0.360
	4.1-7	35	24.1	23.3	15.0	5.0	40.0	
	>7	14	31.1	21.0	30.0	20.0	50.0	
Histološki tip	hromofobni	7	12.1	11.9	10.0	5.0	20.0	H=35.797 p<0.001
	papilarni	18	56.1	14.8	57.5	40.0	70.0	
	svetloćelijski	49	15.2	14.1	10.0	5.0	20.0	
Gradus	niži	41	22.0	19.8	15.0	5.0	40.0	Z=-0.805
	viši	33	28.5	25.6	20.0	5.0	50.0	p=0.421
Stadijum	niži	42	25.7	24.5	15.0	5.0	40.0	Z=-0.110
	viši	32	23.8	20.3	20.0	5.0	37.5	p=0.913
Smrtni ishod	ne	53	23.9	23.3	15.0	5.0	40.0	Z=-0.724
	da	21	27.4	21.4	20.0	5.0	40.0	p=0.469

Medijane p16 su slične po polu, rastu kako se povećava kategorija starosti, veća je kod većih tumora, u višem gradusu i stadijumu, kao i kod smrtnog ishoda. Ipak, jedina statistički značajna razlika je po histološkom tipu. Naime, medijana papilarnog tipa je daleko veća nego što je kod druga dva (čije medijane su identične).

S obzirom na to da su starost i dimenzije tumora obeležja posmatranja ordinalnog tipa u ovom slučaju (gradacija), urađena je i Spirmanova korelaciona analiza kojom je takođe utvrđeno da

nema povezanosti između ekspresije i starosit ($\rho=0,130$; $p=0,271$), kao i ekspresije i dimenzija tumora ($\rho=0,146$; $p=0,214$).

Distribucija pacijenata po p16 u odnosu na histološki tip je i grafički prikazana (grafikon 29).



Grafikon 29. Histološki tip u odnosu na ekspresiju p16

p16 ekspresija u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike, analizirana po grupama pacijenata sa ekspresijom do 10% i većom od 10%, prikazana je u tabeli 20.

Tabela 20. Kliničko-morfološke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju p16 (kategorijalno)

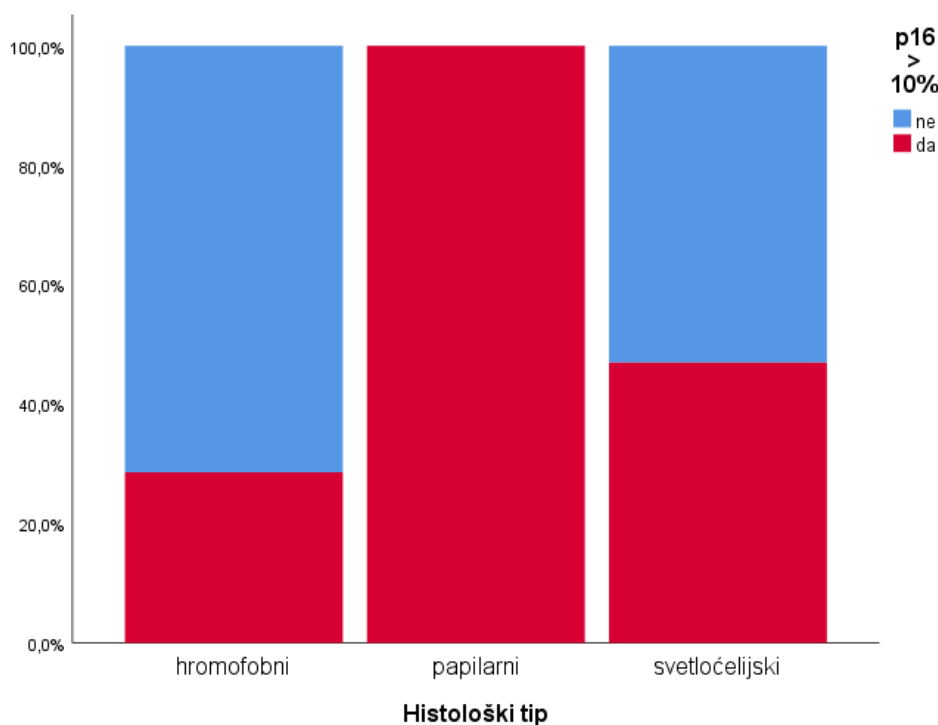
		p16 > 10%				Rezultati testiranja
		ne		Da		
		N	%	N	%	
Pol	Muški	20	41,7%	28	58,3%	X ² =0.003 p=0.957 ^a
	Ženski	11	42,3%	15	57,7%	
Starost	≤50	6	46,2%	7	53,8%	X ² =0.974 p=0.324 ^b
	51-65	20	45,5%	24	54,5%	
	66+	5	29,4%	12	70,6%	
Dimenzije (cm)	≤4	12	48,0%	13	52,0%	X ² =2.092 p=0.148 ^b
	4.1-7	16	45,7%	19	54,3%	
	>7	3	21,4%	11	78,6%	
Histološki tip	Hromofobni	5	71,4%	2	28,6%	p<0.001 ^c
	Papilarni	0	0,0%	18	100,0%	
	Svetloćelijski	26	53,1%	23	46,9%	
Gradus	Niži	17	41,5%	24	58,5%	X ² =0,007 p=0,934 ^a
	Viši	14	42,4%	19	57,6%	
Stadijum	Niži	18	42,9%	24	57,1%	X ² =0,037 p=0,847 ^a
	Viši	13	40,6%	19	59,4%	
Smrtni ishod	Ne	24	45,3%	29	54,7%	X ² =0,882 p=0,348 ^a
	Da	7	33,3%	14	66,7%	

^aPirsonov hi kvadrat test ^bHi kvadrat test za trend (Mantel-Hanszel) ^cFišerov test tačne verovatnoće

Procenat pacijenata koji imaju p16 veći od 10 je vrlo sličan po polu, raste kako se povećava starosna kategorija i dimenzija tumora, sličan je po gradusu, stadijumu, nešto veći kod pacijenata koji su imali smrtni ishod. Evidentno je da postoji razlika po histološkom tipu, jer svi pacijenti koji imaju papilarni histološki tip imaju p16 veći od 10%.

Obzirom da su starost i dimenzije tumora gradacija, primarno je urađena analiza razlike po trendu. Ali, da bismo proverili da li postoji razlika po učestalosti, naknadno je urađen Pirsonov hi kvadrat test i utvrđeno je da nema značajne razlike između starosnih grupa po ekspresiji ($X^2=1,414$; $p=0,493$), kao ni po dimenzijama tumora ($X^2=3,002$; $p=0,223$). S obzirom na to da su starosne kategorije i dimenzije tumora analizirane kao gradacija, onda kao primarni rezultat uzima se test za trend.

Distribucija pacijenata po ekspresiji p16 u odnosu na histološki tip je prikazana i grafički (grafikon 30).



Grafikon 30. Histološki tip u odnosu na ekspresiju p16

p16 i preživljavanje

Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na ekspresiju p16 je prikazana u tabeli 21.

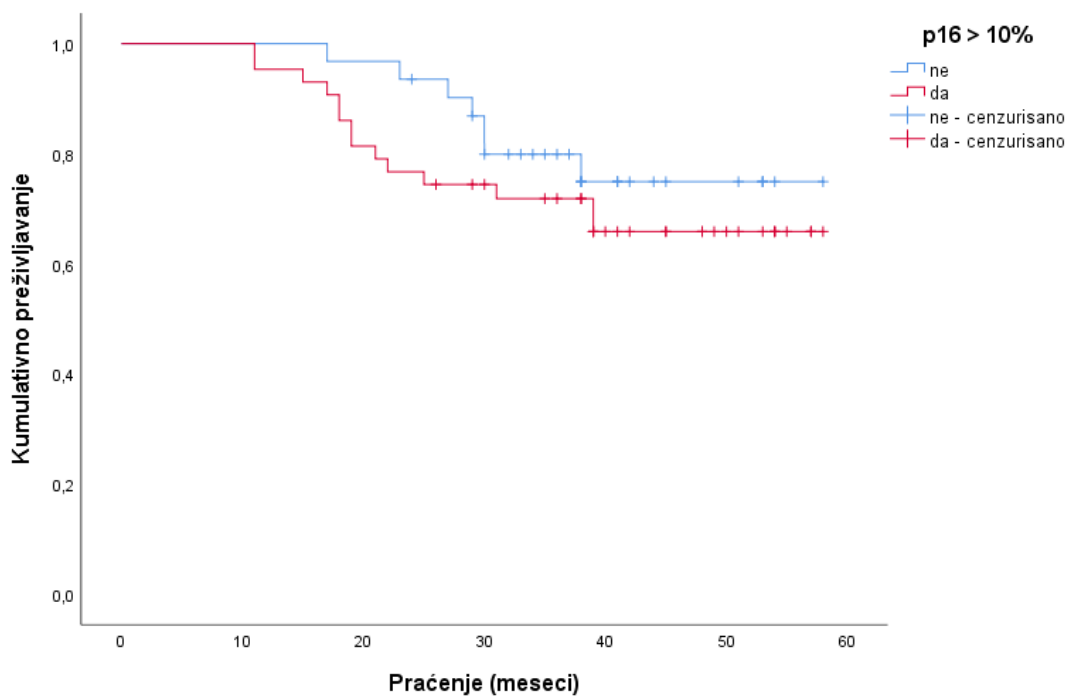
Tabela 21. p16 u odnosu na preživljavanje

	p16 > 10%	
	Ne	Da
Broj umrlih	7/31 (22,6%)	14/43 (32,6%)
AS preživljavanja	50,6 (45,7-55,4)	45,9 (40,5-51,2)

Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da je procenat umrlih nešto veći u grupi pacijenata koji imaju ekspresiju veću od 10%. Takođe, prosečno preživljavanje je manje u istoj grupi.

Na osnovu Log-rank testa, utvrđeno je da razlika u preživljavanju nije statistički značajna ($X^2=0,869$; $p=0,351$).

Preživljavanje u odnosu na p16 je i grafički prikazano (grafikon 31).



Grafikon 31. Preživljavanje u odnosu na ekspresiju p16

CDKN2A u odnosu na kliničko-morfološke parametre

Distribucija pacijenata u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike tumora prema CDKN2A je prikazana u tabeli 22.

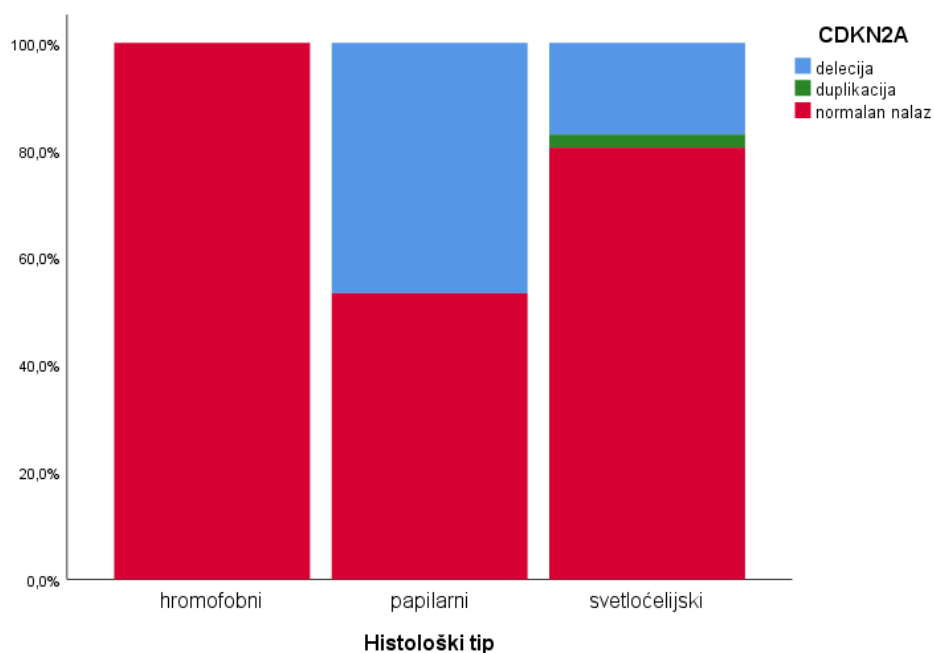
Tabela 22. CDKN2A u odnosu na kliničko-morfološke parametre

		CDKN2A						Sve tri grupe ^a	Bez duplikacije ^a
		delecija		normalan nalaz		duplikacija			
		N	%	N	%	N	%		
Pol	muški	11	26,8%	29	70,7%	1	2,4%	0.561	0.347
	ženski	3	15,0%	17	85,0%	0	0,0%		
Starost	≤50	5	38,5%	8	61,5%	0	0,0%	0.330	0.218
	51-65	8	22,9%	26	74,3%	1	2,9%		
	66+	1	7,7%	12	92,3%	0	0,0%		
Dimenzije (cm)	≤4	5	26,3%	13	68,4%	1	5,3%	0.534	0.598
	4.1-7	8	25,0%	24	75,0%	0	0,0%		
	>7	1	10,0%	9	90,0%	0	0,0%		
Histološki tip	hromofobni	0	0,0%	5	100,0%	0	0,0%	0.089	0.040
	papilarni	7	46,7%	8	53,3%	0	0,0%		
	svetloćelijski	7	17,1%	33	80,5%	1	2,4%		
Gradus	niži	8	22,9%	26	74,3%	1	2,9%	1.000	1.000
	viši	6	23,1%	20	76,9%	0	0,0%		
Stadijum	niži	11	28,9%	26	68,4%	1	2,6%	0.260	0.211
	viši	3	13,0%	20	87,0%	0	0,0%		
Smrtni ishod	ne	12	27,3%	31	70,5%	1	2,3%	0.502	0.310
	da	2	11,8%	15	88,2%	0	0,0%		

^aFišerov test tačne verovatnoće

Iz tabele se vidi da je razlika jedino značajna kod histološkog tipa i to na konvencionalnom nivou značajnosti samo kada se iz analize isključe pacijenti koji imaju duplikaciju. Praktično, postoji statistički značajna razlika između ove tri grupe u odnosu na deleciju ili normalan nalaz. Kada se analizira distribucija po histološkom tipu, evidentno je da kod hromofobnih svi pacijenti imaju normalan nalaz (ali je mali broj pacijenata u ovoj grupi), kod papilarnih je podjednako zastupljen i normalan nalaz i duplikacija, a kod svetloćelijskog tipa dominira normalan nalaz.

Rezultati komparacije po histološkom tipu su i grafički prikazani (grafikon 32).



Grafikon 32. CDKN2A u odnosu na histološki tip

CDKN2A i preživljavanje

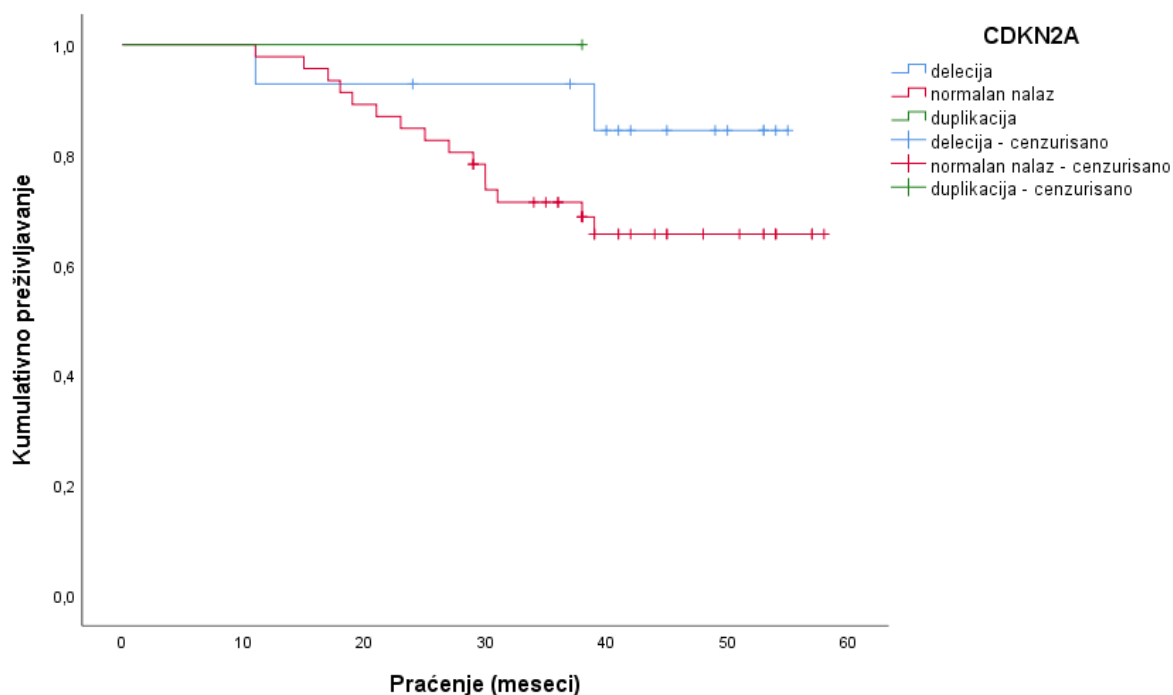
Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na CDKN2A je prikazana u tabeli 23.

Tabela 23. CDKN2A u odnosu na preživljavanje

	CDKN2A		
	Delecija	Normalan nalaz	Duplikacija
Broj umrlih	2/14 (14.3%)	15/46 (32.6%)	0/1 (0%)
AS preživljavanja	50.5 (44.2-56.7)	48.8 (42.1-51.6)	

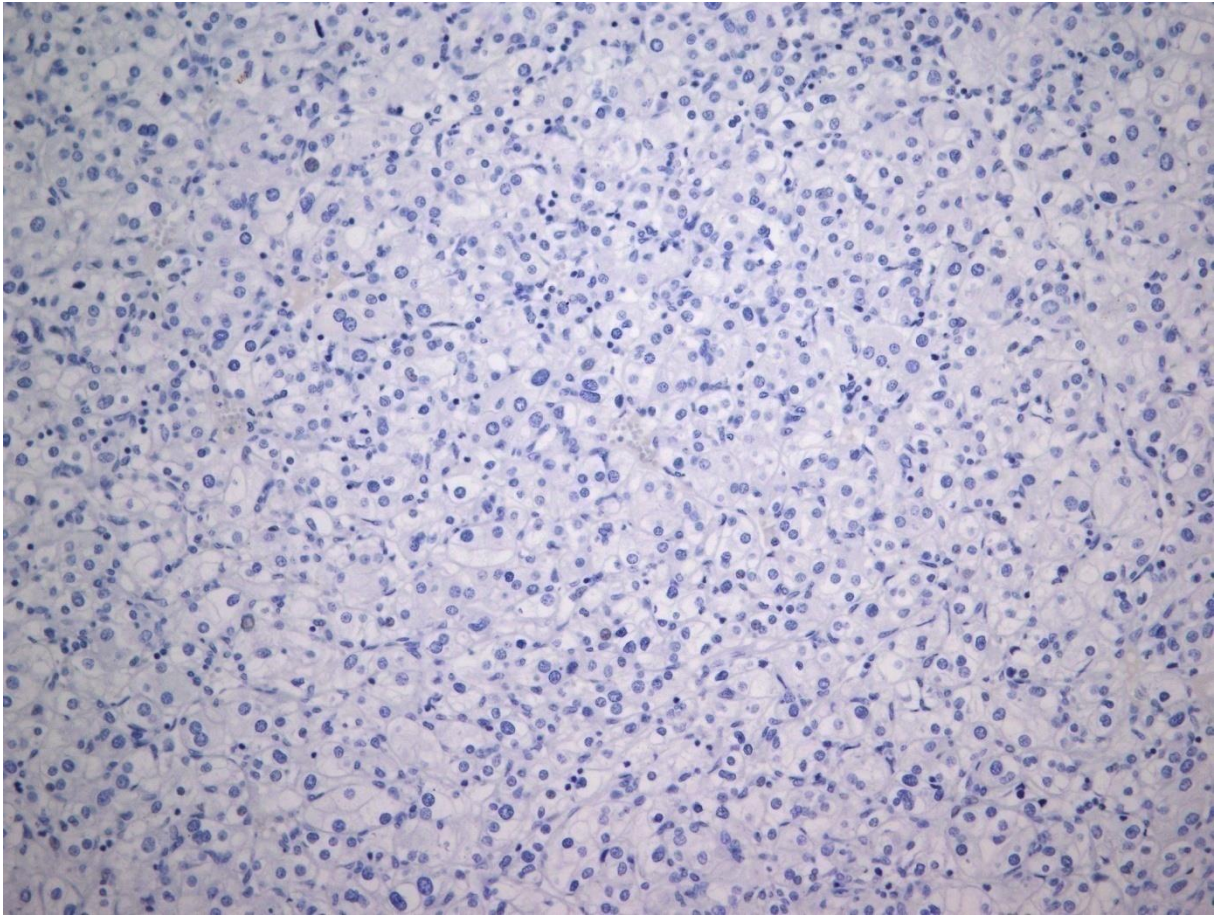
Na osnovu distribucije pacijenata po smrtnom ishodu, evidentno je da je broj umrlih daleko manji kod pacijenata sa delecijom nego kod pacijenata sa normalnim nalazom. Ali prosečno vreme preživljavanja je gotovo identično u obe ispitivane grupe. Statističkom analizom, Log rank testom, kada se izuzme grupa pacijenata sa duplikacijom, utvrđeno je da nema značajne razlike po preživljavanju između ove dve grupe ($X^2=1,724$; $p=0,189$).

Preživljavanje u odnosu na CDKN2A je i grafički prikazano (grafikon 33).



Grafikon 33. Preživljavanje u odnosu na ekspresiju CDKN2A

p57



Slika 11. p57: negativno imunohistohemijsko bojenje, hromofobni tip, gradus III, 200x.

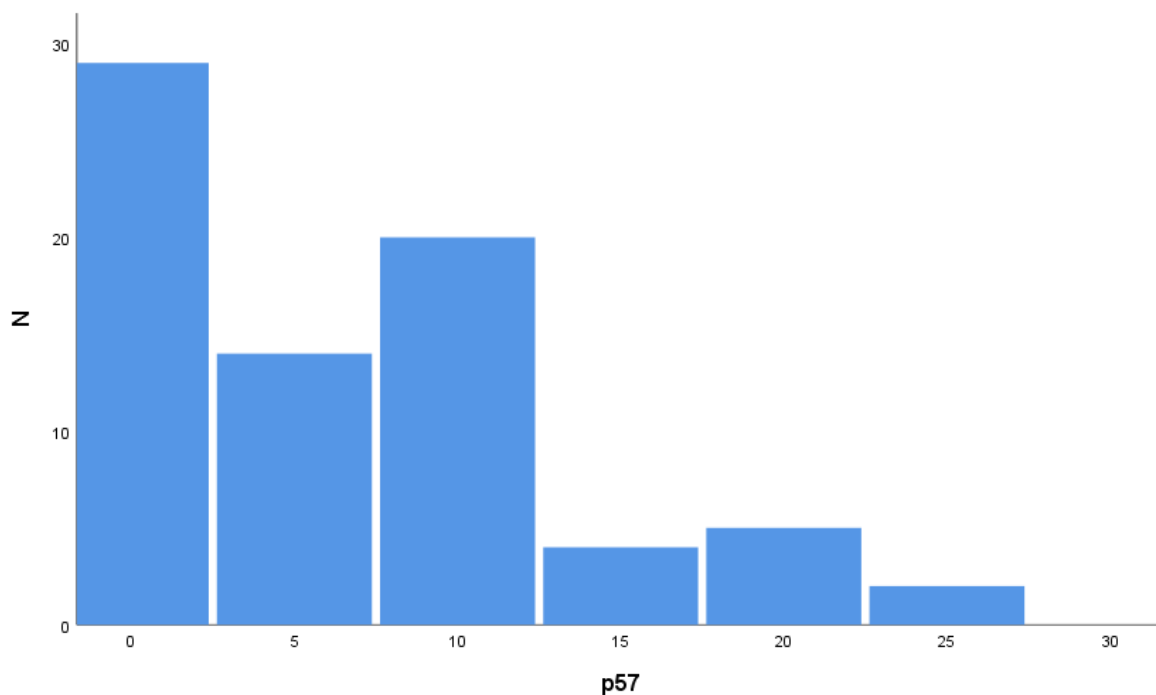
Deskriptivna statistika p57 i CDKN1C

Deskriptivna statistika p57 je prikazana u tabeli 24.

Tabela 24. p57

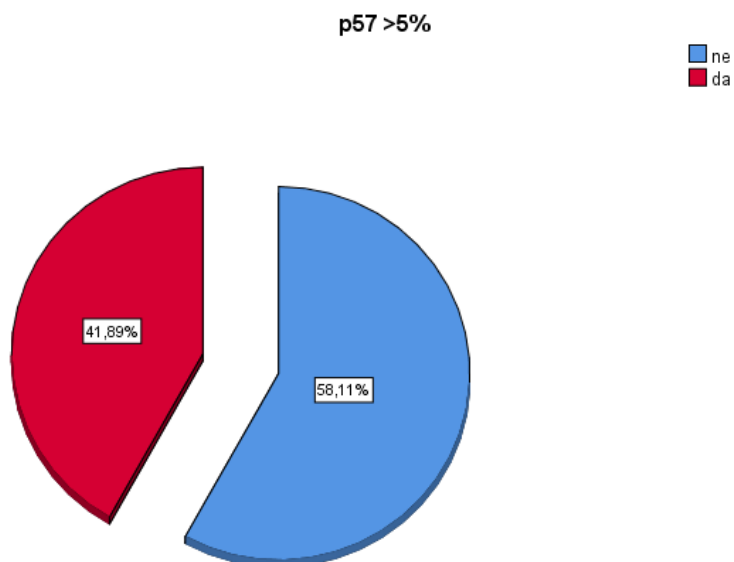
	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75
p57	6.5	6.8	5.0	.0	10.0

Distribucija pacijenata u odnosu na vrednost p57 je prikazana i grafički (grafikon 34).



Grafikon 34. Distribucija pacijenata u odnosu na p57

Pacijenti su u odnosu na p57 podeljeni u dve grupe. Od ukupnog broja pacijenata, vrednost do 5% imaju 43 pacijenata (58,1%), a preko 5% ima 31 (41,9%). Distribucija pacijenata je prikazana i grafički (grafikon 35).



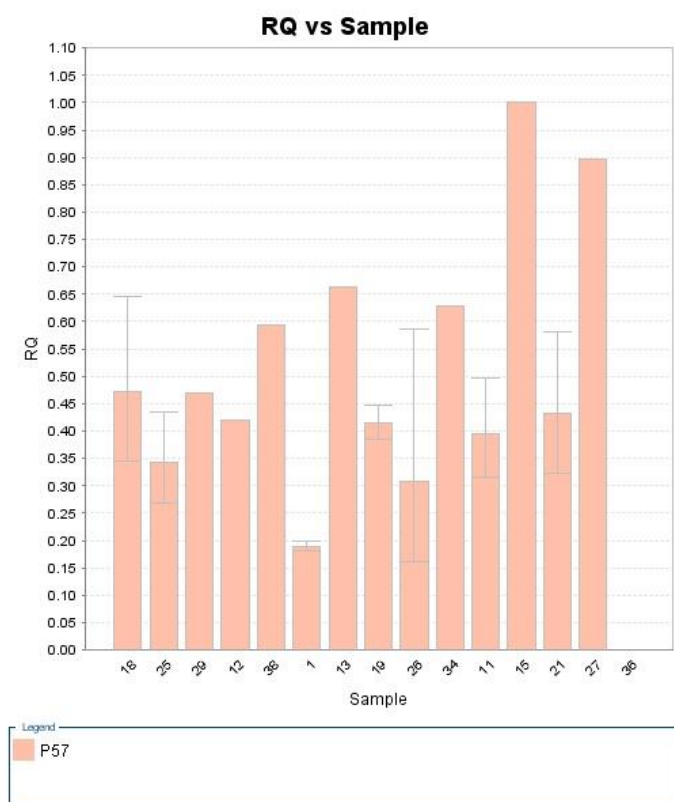
Grafikon 35. Distribucija pacijenata prema p57

CDKN1C

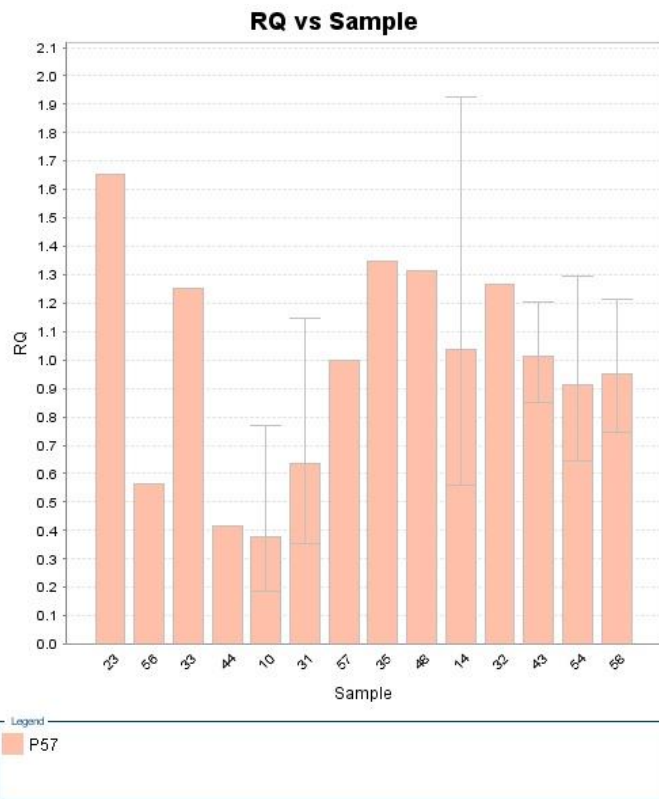
Od ukupnog broja pacijenata, za 13 pacijenata nije uspela analiza (17.6%).

Pacijenti su u odnosu na CDKN1C podeljeni u tri grupe, oni koji imaju normalan nalaz, njih 41 (67,2%), deleciju, njih 19 (31,1%) i duplikaciju, jedan pacijent (1,6%).

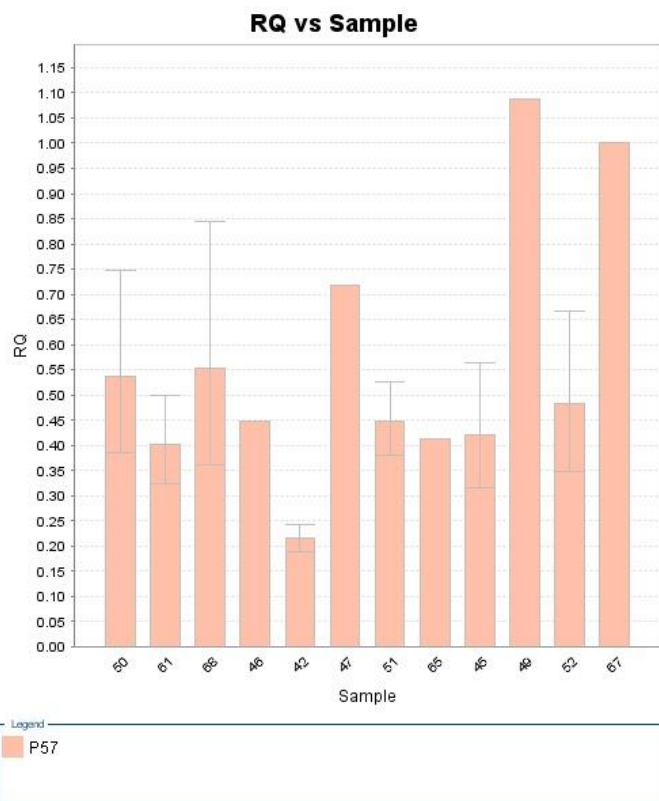
Dobijeni su sledeći rezultati primenom qRT-PCR za gen CDKN1C (grafikoni 36(a-e)):



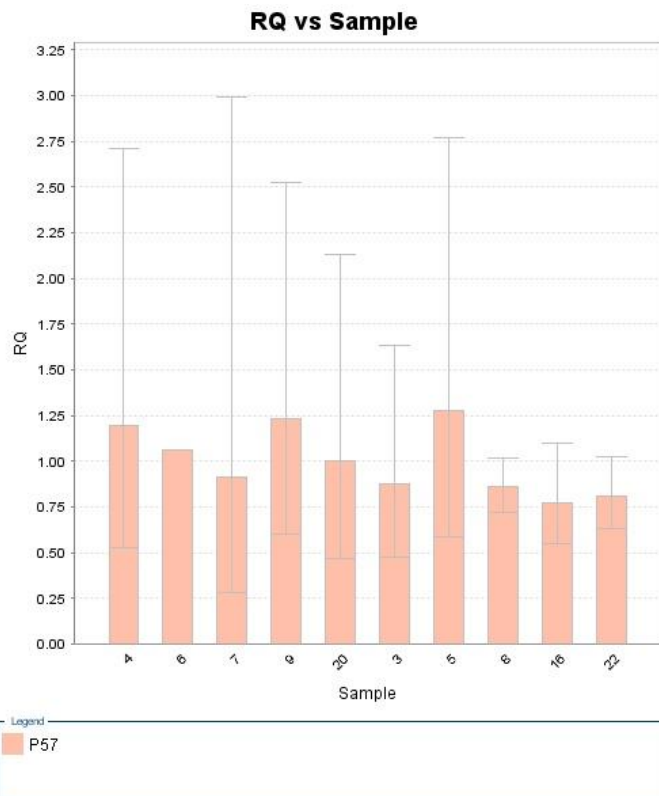
Grafikon 36 (a).



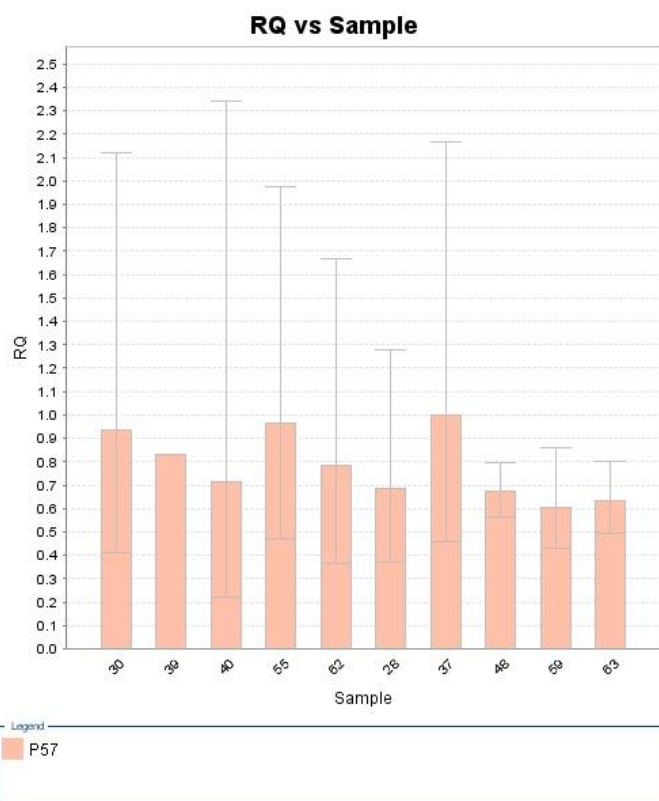
Grafikon 36 (b).



Grafikon 36 (c).



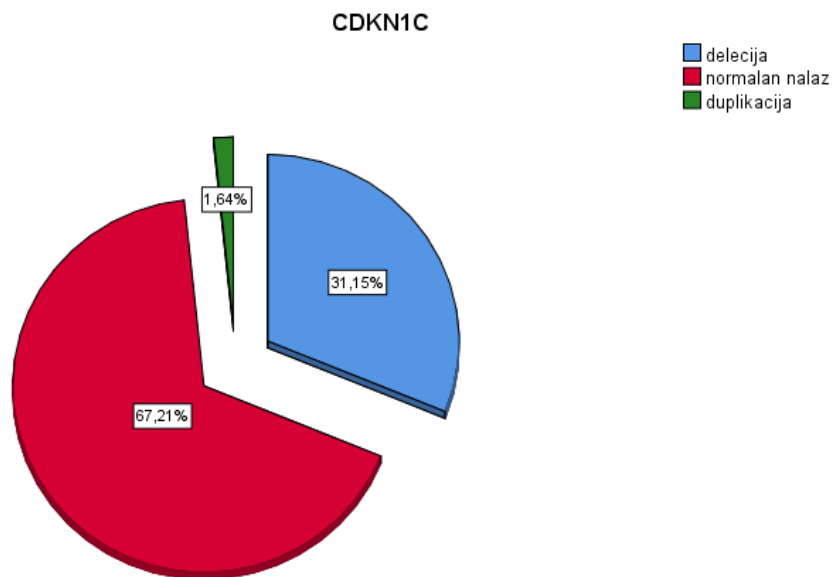
Grafikon 36 (d).



Grafikon 36 (e).

Grafikon 36 (a-e). Rezultati qRT-PCR za gen CDKN1C

Distribucija pacijenata u odnosu na CDKN1C je prikazana grafički (grafikon 37).



Grafikon 37. Distribucija pacijenata u odnosu na CDKN1C

Distribucija CDKN1C u odnosu na ekspresiju p57

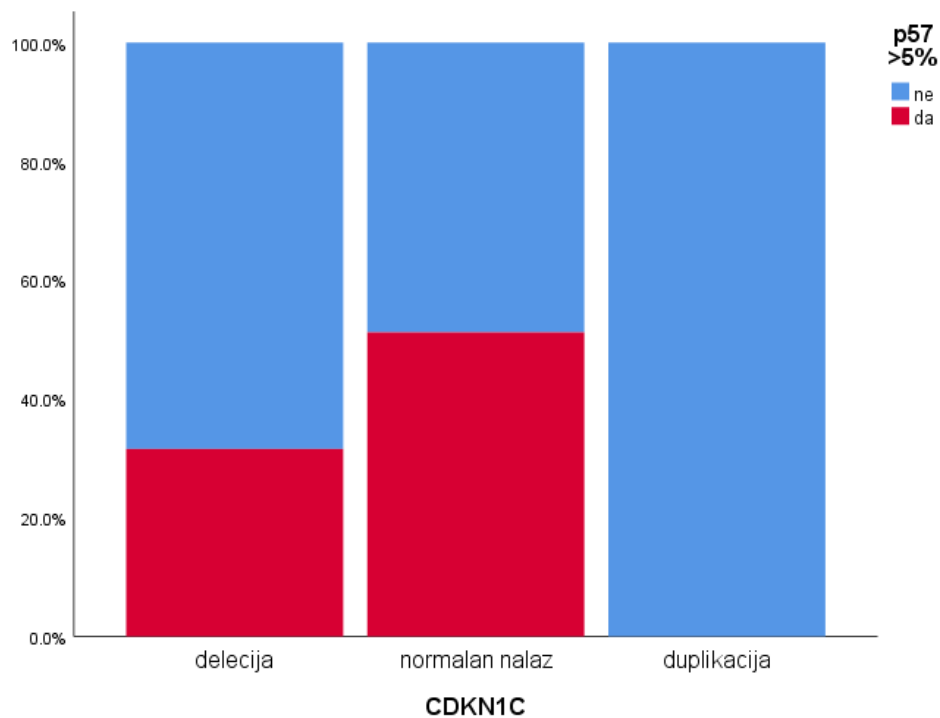
Distribucija pacijenata sa CDKN1C varijantama u odnosu na ekspresiju p57 je prikazana u tabeli 25.

Tabela 25. CDKN1C u odnosu na ekspresiju p57

		p57 >5%			
			ne	Da	Ukupno
CDKN1C delecija	N	13	6	19	
	%	68.4%	31.6%	100.0%	
normalan nalaz	N	20	21	41	
	%	48.8%	51.2%	100.0%	
duplikacija	N	1	0	1	
	%	100.0%	0.0%	100.0%	
Ukupno		N	34	27	61
		%	55.7%	44.3%	100.0%

Pacijenti sa normalnim nalazom u najvećem procentu imaju ekspresiju p57 više od 5%. U manjem procentu su pacijenti sa delecijom, dok samo jedan pacijent ima duplikaciju i isti nema p57 više od 5%. Statističkom analizom, Fišerovim testom tačne verovatnoće je utvrđeno da nema statistički značajne razlike između ove tri grupe po ekspresiji p57 ($p=0,217$). Kada se iz analize, zbog malog broja pacijenata isključi kategorija „duplikacija“, Pirsonovim hi kvadrat testom je utvrđeno da nema značajne razlike između pacijenata sa normalnim nalazom i delecijom po ekspresiji p57 ($X^2=2,024$; $p=0,155$).

Rezultati su i grafički prikazani (grafikon 38).



Grafikon 38. CDKN1C u odnosu na ekspresiju p57

Kliničko-morfološke karakteristike u odnosu na ekspresiju p57

Ispitivana je povezanost ekspresije p57 sa kliničkim karakteristikama pacijenata. p57 je analiziran i kao kontinuirano (izvorno mereno) obeležje posmatranja i kao kategorijalno (dve grupe, $\leq 5\%$ i $> 5\%$).

U tabeli 26 prikazana je deskriptivna statistika p57 u odnosu na kliničke karakteristike (p57 kao kontinuirano obeležje posmatranja).

Tabela 26. Kliničko-morfološke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju p57 (kontinuirano)

		p57						Rezultati testiranja
		N	AS	SD	Median	Perc. 25	Perc. 75	
Pol	muški	48	7.7	7.4	5.0	.0	10.0	Z=-1,866 p=0,062 ^a
	ženski	26	4.2	4.8	2.5	.0	10.0	
Starost	≤50	13	7.3	8.3	5.0	.0	10.0	H=0,552 p=0,759 ^b
	51-65	44	6.1	6.9	5.0	.0	10.0	
	66+	17	6.8	5.6	10.0	.0	10.0	
Dimenzije (cm)	≤4	25	5.0	5.4	5.0	.0	10.0	H=2,122 p=0,346 ^b
	4.1-7	35	6.6	6.9	5.0	.0	10.0	
	>7	14	8.9	8.4	10.0	.0	10.0	
Histološki tip	hromofobni	7	2.9	3.9	.0	.0	5.0	H=2,304 p=0,316 ^b
	papilarni	18	6.1	6.3	5.0	.0	10.0	
	svetloćelijski	49	7.1	7.2	5.0	.0	10.0	
Gradus	niži	41	6.0	7.1	5.0	.0	10.0	Z=-1,013 p=0,311 ^a
	viši	33	7.1	6.5	5.0	.0	10.0	
Stadijum	niži	42	6.4	6.2	5.0	.0	10.0	Z=-0,308 p=0,758 ^a
	viši	32	6.6	7.7	5.0	.0	10.0	
Smrtni ishod	ne	53	6.0	6.5	5.0	.0	10.0	Z=-0,740 p=0,459 ^a
	da	21	7.6	7.7	10.0	.0	10.0	

^aMann-Whitney U test ^bKruskal-Wallis test

Medijana p57 je dva puta veća kod muškaraca u odnosu na žene i ova razlika je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Medijana p57 je veća kod starijih i pacijenata sa većim dimenzijama tumora. Razlika postoji i kod histoloških tipova, ali bez statističke značajnosti. Niži i viši gradus i stadijum imaju identične medijane, dok pacijenti sa smrtnim ishodom imaju veću medijanu od onih koji su još uvek živi. Ali, sve ove razlike nisu statistički značajne.

S obzirom na to da su starost i dimenzije tumora obeležja posmatranja ordinalnog tipa u ovom slučaju (gradacija), urađena je i Spirmanova korelaciona analiza kojom je takođe utvrđeno da nema povezanosti između ekspresije i starosti ($\rho=0,039$; $p=0,744$), kao i ekspresije i dimenzija tumora ($\rho=0,166$; $p=0,158$).

p57 ekspresija u odnosu na kliničko-morfološke karakteristike, analizirana po grupama pacijenata sa ekspresijom do 5% i većom od 5% je prikazana u tabeli 27.

Tabela 27. Kliničko-morfološke karakteristike pacijenata u odnosu na ekspresiju p57 (kategorijalno)

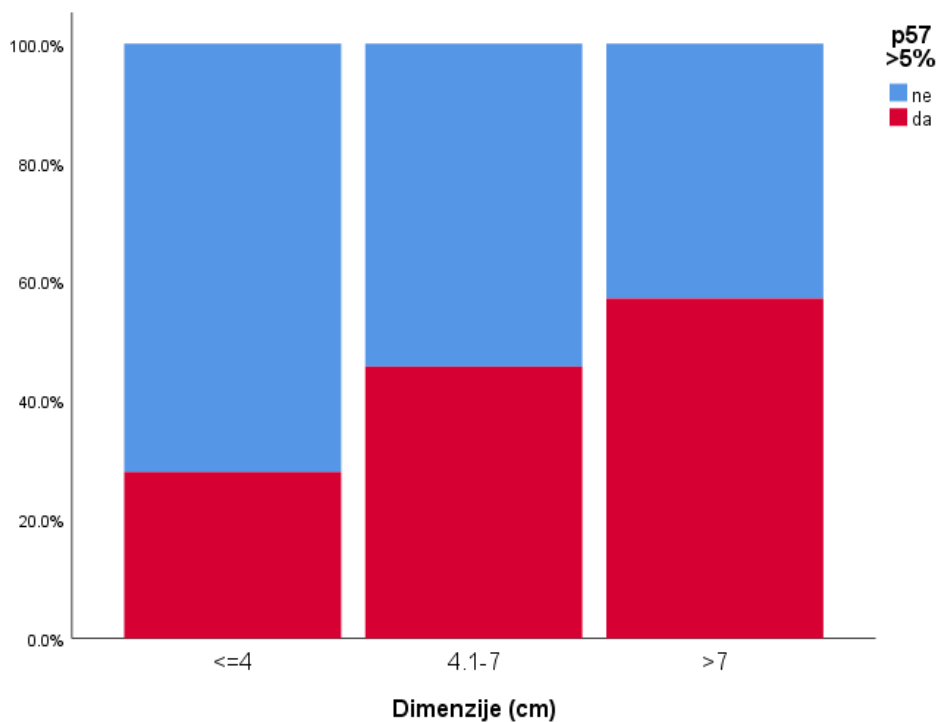
		p57 >5%				Rezultati testiranja
		ne		da		
		N	%	N	%	
Pol	muški	25	52,1%	23	47,9%	$X^2=2,037$ $p=0,154^a$
	ženski	18	69,2%	8	30,8%	
Starost	≤50	8	61,5%	5	38,5%	$X^2=1,504$ $p=0,220^b$
	51-65	28	63,6%	16	36,4%	
	66+	7	41,2%	10	58,8%	
Dimenzije (cm)	≤4	18	72,0%	7	28,0%	$X^2=3,411$ $p=0,065^b$
	4.1-7	19	54,3%	16	45,7%	
	>7	6	42,9%	8	57,1%	
Histološki tip	hromofobni	6	85,7%	1	14,3%	$p=0,288^c$
	papilarni	11	61,1%	7	38,9%	
	svetloćelijski	26	53,1%	23	46,9%	
Gradus	niži	26	63,4%	15	36,6%	$X^2=1,064$ $p=0,302^a$
	viši	17	51,5%	16	48,5%	
Stadijum	niži	24	57,1%	18	42,9%	$X^2=0,037$ $p=0,847^a$
	viši	19	59,4%	13	40,6%	
Smrtni ishod	ne	33	62,3%	20	37,7%	$X^2=1,325$ $p=0,250^a$
	da	10	47,6%	11	52,4%	

^aPirsonov hi kvadrat test ^bHi kvadrat test za trend (Mantel-Hanszel) ^cFišerov test tačne verovatnoće

Pacijenti sa ekspresijom p57 većom od 5% su u većem procentu u grupi muškaraca, više kod starijih, sa većim dimenzijama tumora. U najvećem procentu su kod pacijenata sa svetloćelijskim histološkim tipom. U nešto većem procentu su u grupi sa višim gradusom, ali je zato procenat gotovo identičan po stadijumima. Pacijenti sa smrtnim ishodom imaju u većem procentu zastupljen p57>5%. Statističkom analizom je utvrđeno da je razlika jedino blizu konvencionalnog nivoa značajnosti kada je su pitanju dimenzije tumora.

S obzirom na to da su starost i dimenzije tumora gradacija, primarno je urađena analiza razlike po trendu. Ali, da bismo proverili da li postoji razlika po učestalosti, naknadno je urađen Pirsonov hi kvadrat test i utvrđeno je da nema značajne razlike između starosnih grupa po ekspresiji ($X^2=2,617$; $p=0,270$), kao ni po dimenzijama tumora ($X^2=3,530$; $p=0,171$). Rezultat je isti i kada se analizira razlika po učestalostima i po trendu.

Distribucija pacijenata po ekspresiji p57 u odnosu na dimenzije tumora je prikazana i grafički (grafikon 39).



Grafikon 39. Dimenzije tumora u odnosu na ekspresiju p57

p57 i preživljavanje

Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na ekspresiju p57 je prikazana u tabeli 28.

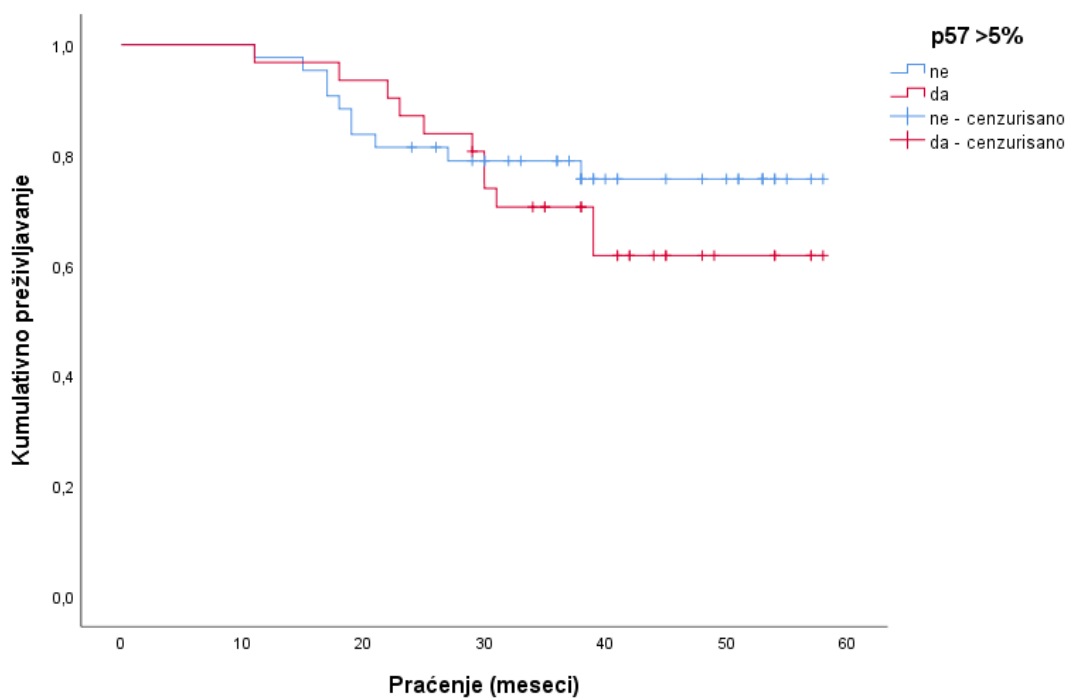
Tabela 28. p57 u odnosu na preživljavanje

	p57 > 5%	
	Ne	Da
Broj umrlih	10/43 (23,3%)	11/31 (35,5%)
AS preživljavanja	48,9 (44,0-53,9)	46,4 (40,8-52,0)

Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da je veći procenat umrlih u grupi pacijenata koji imaju ekspresiju p57 veću od 5%. Takođe, vidimo da su aritmetičke sredine preživljavanja vrlo slične.

Na osnovu Log-rank testa, utvrđeno je da je razlika u preživljavanju nije statistički značajna ($X^2=0,683$; $p=0,408$).

Preživljavanje u odnosu na p57 je i grafički prikazano (grafikon 40).



Grafikon 40. Preživljavanje u odnosu na ekspresiju p57

CDKN1C u odnosu na kliničko-morfološke parametre

Distribucija pacijenata u odnosu na kliničke karakteristike prema CDKN1C je prikazana u tabeli 29.

Tabela 29. CDKN1C u odnosu na kliničko-morfološke parametre

		CDKN1C						Sve tri Bez grupe duplikacije	
		delecija		normalan nalaz		duplikacija			
		N	%	N	%	N	%		
Pol	muški	12	29,3%	28	68,3%	1	2,4%	p=0,847 ^a	X ² =0,154 p=0,695 ^b
	ženski	7	35,0%	13	65,0%	0	0,0%		
Starost	≤50	7	53,8%	6	46,2%	0	0,0%	p=0,293 ^a	p=0,181 ^a
	51-65	9	25,7%	25	71,4%	1	2,9%		
	66+	3	23,1%	10	76,9%	0	0,0%		
Dimenzije (cm)	≤4	6	31,6%	13	68,4%	0	0,0%	p=0,490 ^a	X ² =0,014 p=0,993 ^b
	4.1-7	10	31,3%	22	68,8%	0	0,0%		
	>7	3	30,0%	6	60,0%	1	10,0%		
Histološki tip	hromofobni	1	20,0%	4	80,0%	0	0,0%	p=0,183 ^a	p=0,246 ^a
	papilarni	7	46,7%	7	46,7%	1	6,7%		
	svetloćelijski	11	26,8%	30	73,2%	0	0,0%		
Gradus	niži	13	37,1%	21	60,0%	1	2,9%	p=0,324 ^a	X ² =1,564 p=0,211 ^b
	viši	6	23,1%	20	76,9%	0	0,0%		
Stadijum	niži	13	34,2%	24	63,2%	1	2,6%	p=0,734 ^a	X ² =0,537 p=0,464 ^b
	viši	6	26,1%	17	73,9%	0	0,0%		
Smrtni ishod	ne	15	34,1%	28	63,6%	1	2,3%	p=0,669 ^a	X ² =0,726 ^b p=0,394 ^b
	da	4	23,5%	13	76,5%	0	0,0%		

^aFišerov test tačne verovatnoće ^bPirsonov hi kvadrat test

Na osnovu dobijenih rezultata evidentno je da nema statistički značajnih razlika između CDKN1C kategorija po kliničkim karakteristikama, bilo da se radi o sve tri kategorije, bilo kada se izuzme kategorija „duplikacija“.

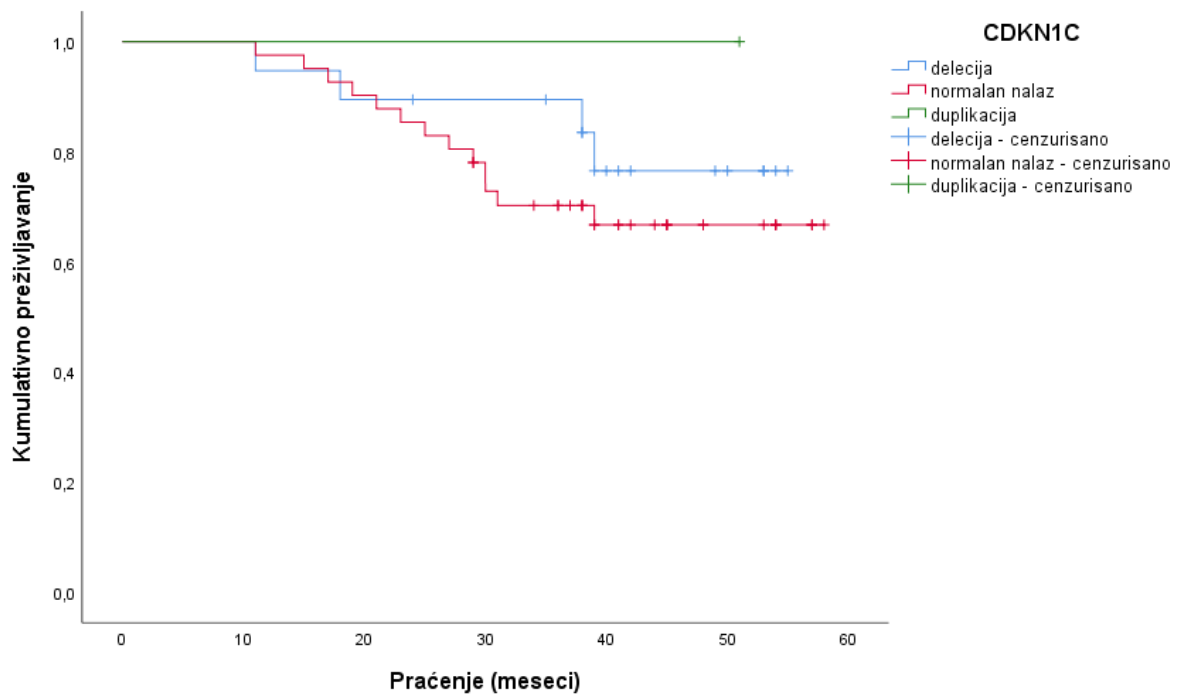
CDKN1C i preživljavanje

Deskriptivna statistika preživljavanja pacijenata u odnosu na CDKN1C je prikazana u tabeli 30.

Tabela 30. CDKN1C u odnosu na preživljavanje

	CDKN1C		
	Delecija	Normalan nalaz	Duplikacija
Broj umrlih	4/19 (21,1%)	13/41 (31,7%)	0/1 (0%)
AS preživljavanja	46,8 (42,6-54,6)	47,0 (41,9-52,0)	

Procenat umrlih pacijenata najveći je u grupi pacijenata sa normalnim nalazom. Ali prosečno preživljavanje je gotovo identično u obe ispitivane grupe (grupa pacijenata sa duplikacijom nije uzeta u dalju analizu zbog malog broja pacijenata). Statističkom analizom, Log rank testom, kada se izuzme grupa pacijenata sa duplikacijom, utvrđeno je da nema značajne razlike u preživljavanju između ove dve grupe ($X^2=0,763$; $p=0,382$). Preživljavanje u odnosu na CDKN1C je i grafički prikazano (grafikon 41).



Grafikon 41. CDKN1C i preživljavanje

PREŽIVLJAVANJE

Na kraju, ispitivano je preživljavanje pacijenata sa RCC i eventualne diskriminacije prognostičkih faktora. Obzirom da u starosnoj kategoriji ≤ 50 godina nijedan pacijent nije imao smrtni ishod tokom praćenja, umesto analize sa kategorijalnim obeležjem posmatranja, koristimo kontinuiranu. Takođe, kod genetskih analiza je problem malog broja pacijenata sa delecijom ili duplikacijom, pa je urađena i analiza sa restrukturiranim varijablama u vidu patološki (delecija ili duplikacija) i normalan nalaz.

U tabeli 31 prikazana je univarijabilna Koksova regresiona analiza.

Tabela 31. Univarijabilna Koksova regresiona analiza – kliničko-morfološke karakteristike

	p vrednost	HR (95% IP)
Pol ženski	0,413	1,435 (0,604-3,408)
Starost (godine)	0,001	1,098 (1,041-1,158)
Dimenzije (mm)	0,015	1,018 (1,003-1,033)
≤4 cm	0,021	ref.
4,1-7 cm	0,163	2,505 (0,689-9,104)
>7 cm	0,008	5,965 (1,579-22,530)
Histološki tip		
svetloćelijski	0,759	ref.
hromofobni	0,489	0,489 (0,064-3,719)
papilarni	0,864	1,087 (0,417-2,835)
Gradus – viši	0,003	4,681 (1,714-12,787)
Stadijum – viši	<0,001	18,491 (4,278-79,934)

Iz tabele vidimo da su značajni faktori preživljavanja starost, dimenzije tumora, gradus i stadijum.

Dalja analiza obuhvatila je sve prediktore preživljavanja koji imaju signifikantnost manju od 0,1 u univarijabilnoj analizi.

Tabela 32. Univarijabilna Koksova regresiona analiza – ekspresija i genetika

	p vrednost	HR (95% IP)
Ciklin A	0,054	1,020 (0,999-1,041)
Ciklin A >5%	0,060	2,482 (0,962-6,402)
CCNA patološki	0,518	1,375 (0,523-3,615)
Ciklin D1	0,516	0,993 (0,972-1,015)
Ciklin D1 >10%	0,523	0,755 (0,318-1,792)
CCND patološki	0,268	0,434 (0,099-1,899)
p16	0,609	1,005 (0,987-1,023)
p16 > 10%	0,357	1,533 (0,617-3,808)
CDKN2A patološki	0,178	0,362 (0,083-1,587)
p57	0,525	1,020 (0,960-1,083)
p57 > 5%	0,413	1,430 (0,607-3,367)
CDKN1C patološki	0,334	0,575 (0,187-1,766)

Od svih ispitivanih prediktora, jedino bi ciklin A mogao da predstavlja prediktor za smrtni ishod kod pacijenata sa RCC.

Urađena je multivarijabilna analiza da bi se ispitalo koji su prediktori ključni za preživljavanje (tabela 33).

U modelovanje su uzeti starost i dimenzije tumora kao kontinuirana obeležja posmatranja, gradus i stadijum kao viši/nži i ciklin A kao kontinuirano obeležje posmatranja.

Tabela 33. Multivarijabilni model – Enter metod

	p vrednost	HR (95% IP)
Starost	0,004	1,097 (1,031-1,167)
Dimenzije (mm)	0,416	1,007 (0,990-1,026)
Gradus viši	0,104	2,510 (0,828-7,608)
Stadijum viši	<0,001	16,757 (3,528-79,584)
Ciklin A	0,089	1,023 (0,997-1,049)

Prvo je urađen Enter metod pri čemu se odmah izdvajaju stadijum i starost kao značajni prediktori i ciklin A koji je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti.

Backward metodom su eliminisani prediktori koji nisu značajni i dobijen je model prikazan u tabeli 34.

Tabela 34. Multivarijabilni model – Backward metod

	p vrednost	HR (95% IP)
Starost	0,005	1,088 (1,025-1,154)
Stadijum viši	<0,001	22,782 (5,065-102,4)
Ciklin A	0,012	1,031 (1,007-1,056)

Značajni prediktori preživljavanja su starost, stadijum bolesti i ciklin A.

5. DISKUSIJA

Do danas su objavljeni rezultati velikog broja studija koje su za predmet istraživanja imale analizu ekspresije proteina koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa u različitim humanim tumorima.

U uvodnom delu je pojašnjena uloga ciklina A u ćelijskom ciklusu-od svih ciklina on je jedini koji ima dvostruku ulogu- u DNK replikaciji tokom S faze, i u inicijaciji mitoze (53). Ciklin A deluje na „dve tačke“ ćelijskog ciklusa, što je jedan od razloga zbog čega je analiziran u ovoj studiji.

Iako nije pokazana statistička značajnost, među ispitanicima je zabeležena veća medijana ekspresije ciklina A kod žena, pacijenata starije životne dobi, sa većim dimenzijama tumora, višim gradusom i stadijumom bolesti. Statistička značajnost je pokazana u odnosu na histološki tip RCC- kod papilarnog RCC ekspresija ciklina A je viša nego kod ostalih.

U odnosu na preživljavanje, statistički značajno viša ekspresija ciklina A bila je kod bolesnika kod kojih je nastupio smrtni ishod, što implicira lošiju prognozu sa povećanom ekspresijom ciklina A. Kako je istaknuto, ciklin A je snažan prediktor lošeg kliničkog ishoda.

Studija čiji su rezultati saglasni sa našim sprovedena je u Finskoj, na uzorku od 118 bolesnika sa RCC, i Aaltoma i koautori zaključuju da je povišena ekspresija ciklina A udružena sa proliferacijom RCC, predstavlja prognostički faktor u svim stadijumima RCC, prediktor je preživljavanja bez ponovnog javljanja bolesti, te zaključuju da je nivo ekspresije ciklina A koristan za planiranje terapije (73).

U istraživanju koje su sprovedeli Santala i saradnici istaknut je povišen nivo ekspresije ciklina A kod žena sa dijagnostikovanim adenokarcinomom endometrijuma (endometrioidni tip), koji je nedvosmisleno ukazivao na udruženost sa lošijom prognozom, višim FIGO stadijumom i gradusom tumora (74).

Studija koju su sprovedeli Jernman i saradnici analizira ekspresiju ciklina A zajedno sa Ki67 i njihovi rezultati govore u prilog razvoja metastaza i posledičnog višeg stadijuma bolesti kod ispitanika sa neuroendokrinim tumorom rektuma. Pacijenti su imali metastatske depozite u vezi sa povišenom ekspresijom pomenutih ispitivanih imunohistohemijskih markera (75).

Metwally i saradnici su pokazali povećanu ekspresiju ciklina A i ciklina E i ulogu u nastanku karcinoma endometrija kod žena obolelih od karcinoma dojke, na terapiji tamoksifenom (76).

Istraživanje koje je obuhvatalo obolele od karcinoma dojke autora Mu i saradnika ističe značaj određivanja proliferativnog statusa kvantifikacijom imunohistohemijske ekspresije Ki67 i ciklina A. U ovoj studiji je značajan rezultat da nivo ekspresije ciklina A može biti korišćen kao komplementarni marker za određivanje proliferativnog indeksa, pre svega u slučajevima kad je Ki67 na graničnom nivou (77).

U literaturi nailazimo na istraživanja nivoa ekspresije ciklina A u malignim tumorima. Istraživanje koje je sproveo Chen i saradnici analizira ekspresiju ciklina A kod skvamoznog karcinoma usne duplje, gde je utvrđena progresija bolesti u vezi sa povišenom ekspresijom (78). Studija (Bahnassy i saradnici) koja je obuhvatila 60 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom kod kojih je analizirana ekspresija ciklina A, ciklina D i Ki67, pokazala je da je povišena ekspresija ciklina A u vezi sa lošom diferencijacijom i većim dimenzijama tumora (79).

Kod karcinoma bešike povišena ekspresija ciklina A korelira sa tumorima višeg gradusa i ekspresijom Ki67 (80). Wang i saradnici ukazuju na posrednu ulogu ciklina A u tumorigenezi kod pacijenata sa nesitnoćelijskim tumorom pluća. Autori objašnjavaju ulogu proteina koji putem regulacije ekspresije ciklina A dovodi do inhibicije apoptoze i proliferacije tumorskih ćelija (posredovani ciklinom A) (81).

Prekomerna ekspresija ciklina A u pomenutim tumorima, koji su bili predmet istraživanja pomenutih studija, u korelaciji je sa nepovoljnim prognostičkim faktorima, što je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja.

RT-PCR metodom došli smo do jednog od značajnijih rezultata analize ekspresije CCNA u odnosu na gradus bolesti- postoji statistička značajnost kad posmatramo grupu bolesnika sa nižim gradusom, gde je pretežno normalna ekspresija, u odnosu na one sa višim gradusom, gde je normalna ekspresija i duplikacija.

Wang i ostali ispitivali su ulogu 19 gena i različitih regulatornih mehanizama u ccRCC-u, među njima su i CCNA i njihovi rezultati ističu značaj ekspresije CCNA kod različitih stadijuma svetloćelijskog histološkog tipa, kao i ključnu ulogu disregulacije ćelijskog ciklusa u nastanku ccRCC (82).

Ispitivana korelacija ekspresije CCNA i ciklina A nije pokazala statističku značajnost između normalne ekspresije i duplikacije gena u odnosu na ekspresiju ciklina A.

U karcinomu dojke pokazana je povezanost ekspresije CCNA i dobro diferentovanih tumora, što ukazuje na ulogu ciklina A u kontroli ćelijskog ciklusa, a ne u proliferaciji, a povišena ekspresija CCNA utiče na povoljniji klinički ishod (83).

Iako nije statistički značajan, jedan od rezultata naše studije je kraće vreme preživljavanja i češći smrtni ishod kod detektovane duplikacije CCNA, što ipak treba tumačiti oprezno, s obzirom na to da je istraživanje obuhvatalo relativno mali broj pacijenata.

Istraživanjem uloge ciklina A u nastanku akutne mijeloidne leukemije metodom qRT-PCR nije dokazana statistička značajnost, te autori ističu da nije pogodan za ciljanu terapiju (84).

Tumačenjem rezultata statističkih metoda, pokazano je da su kod naših ispitanika nivoi ekspresije ciklina D1 nedovoljno ubedljivi, u odnosu na stadijum, gradus, pol, sa diskretnom tendencijom opadanja kod starijih pacijenata i većim dimenzijama tumora.

Rezultati studije koja je već pomenuta u delu analize ekspresije ciklina A, pokazuju povišenu ekspresiju ciklina D1 kod pacijenata starijih od 65 godina, nižeg gradusa i sa udruženom ekspresijom p53. Dobijeni rezultati su statistički značajni (73).

Nasuprot tome, jedan od značajnijih rezultata naše studije je signifikantna ekspresija ciklina D1 kod svetloćelijskog histološkog tipa.

Studija koja je pokazala statistički značajno povišenu ekspresiju u svetloćelijskom RCC u odnosu na hromofobni i papilarni tip, takođe visok nivo ekspresije u vezi je sa dobrom prognozom (85). Autori studije u kojoj je imunohistohemijskom i Western blot metodom analizirana ekspresija proteina G1/S faze ćelijskog ciklusa (među kojima je i ciklin D1) saglasni su sa ovim rezultatom, i ističu da je niži nivo ekspresije ciklina D1 kod konvencionalnog RCC udružena sa lošijom prognozom (73). Povišenu ekspresiju u korelaciji sa dobrom prognozom pronašli su Leroy i saradnici kod svetloćelijskog papilarnog RCC (34).

U istraživanju koje je sproveo Bishoy i saradnici analizirana je između ostalih i imunohistohemijska ekspresija p16, p57 i ciklina D, te su autori ustanovili vezu sa lošijim ishodom kod svetloćelijskog RCC, i istakli da je prognostički skor lošiji ukoliko postoji disregulacija 4 i više markera (86).

Još jedna studija koja je sprovedena u Brazilu na većem uzorku od našeg (109 pacijenata) potvrđuje da je povišena ekspresija ciklina D1 u korelaciji sa dobrom prognozom, ali multivarijantna analiza nije potvrdila da je ciklin D1 nezavisan prognostički faktor za RCC (85).

Nizak nivo ekspresije ciklina D1 i p27 kod svetloćelijskog tipa udruženo sa lošijom prognozom pokazali su i Hedberg i saradnici na uzorku koji je obuhvatao 127 muškaraca i 91 ženu sa dijagnostikovanim RCC (87).

Studija sprovedena u grupi pacijenata obolelih od karcinoma pluća pokazala je da je povišena ekspresija ciklina D1 udružena sa lošijim preživljavanjem u zavisnosti od histološkog tipa (bez recidiva), tako da u grupi kod kojih je dijagnostikovao adenokarcinom pluća prognoza je lošija, dok to nije slučaj u grupi pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom pluća, i ovi rezultati su statistički značajni (88).

Ekspresija gena CCND je pokazala zanimljiv rezultat u odnosu na papilarni histološki tip- trećina ispitanika ima deleciju, dok kod ostalih histoloških tipova dominira normalan nivo ekspresije, i to sa značajnošću blizu signifikantne.

Prema Diksonu i saradnicima, kod 40% slučajeva karcinoma dojke je povišena ekspresija ciklina D1 (89). Postoje i druge studije koje ukazuju na amplifikaciju i povišenu ekspresiju ciklina D1 u tumoru dojke (90).

Iz prikazanih rezultata vidimo da se medijana p16, kao i procenat pacijenata sa ekspresijom p16>10% povećava sa godinama i kod pacijenata kod kojih je nastupio smrtni ishod. U uvodnom delu istaknuto je da se nivo p16 sa godinama i starenjem u ćeliji povećava (65).

U našem uzorku nismo našli statističku značajnost u odnosu na ispitivane kliničko-morfološke parametre, izuzev kod histološkog tipa. Tanaka i saradnici su 1999. ukazali da inaktivacija p15 i p16 proteina ima ulogu u nastanku RCC kod pacova mehanizmom oksidativnog stresa (91).

Imajući na umu da je p16 tumor supresor protein, koji u sadejstvu sa drugim regulatorima ćelijskog ciklusa omogućava normalno odvijanje ćelijske deobe, zanimljivi su rezultati studije koja je pokazala ulogu proteina p16 u supresiji rasta i proliferacije tumorskih ćelija kod RCC, te prepoznala ovaj protein kao terapijski target uz transportni protein (92).

Ekspresija u različitim histološkim tipovima odnosi se na analizu p16 i kategorijalno i kontinuirano, i rezultat je visoko statistički značajan ($p < 0,001$). Svi pacijenti sa papilarnim histološkim tipom imaju visoku ekspresiju proteina p16.

Kako je već istaknuto, u odnosu na analizirane parametre postoji razlika u ekspresiji gena kod različitih histoloških tipova, tako da su kod papilarnog i normalan nivo ekspresije i delecija jednako zastupljeni, a hromofobni i svetloćelijski imaju dominantno normalan nalaz. Drugim rečima, papilarni histološki tip karcinoma bubrežnih ćelija češće ima deleciju gena CDKN2A, što je statistički značajno, u odnosu na druge zastupljene histološke varijante.

Jasno je da su ovi rezultati na neki način u suprotnosti, jer u papilarnom histološkom tipu postoji značajan nivo delecije gena i isto tako značajan nivo povišene ekspresije proteina koji ga kodira.

Postoje rezultati drugih studija koji ukazuju na značaj hipermetilacije gena koji kodira p16 u približno 23% slučajeva kod pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija i kod kojih nije detektovan p16, dok je u istom uzorku zabeležena smanjena ekspresija p16 u više od 50% ispitanika, što ukazuje da je kod njih verovatno u pitanju drugi mehanizam regulacije. Dobijeni rezultati ukazivali su na bolju prognozu (93).

Ovakve rezultate je potrebno analizirati dalje na većem uzorku, i preciznije odrediti mehanizam njihovog nastanka, moguće na nivou transkripcije, čime bi se objasnio i njihov značaj.

Kod pacijenata sa visokom ekspresijom proteina p16 zabeleženo je kraće preživljavanje i veći broj smrtnih ishoda. Ovi rezultati nisu statistički značajni, ali u poređenju sa rezultatima preživljavanja u odnosu na ekspresiju gena, dobijaju na značaju. Pacijenti sa delecijom gena imaju bolji klinički ishod, takođe bez statističke značajnosti.

Analizu ekspresije p16 kod RCC uradio je Ikuerowo sa saradnicima, u studiji koja je obuhvatila 397 pacijenata nakon nefrektomije. Autori su dosli do zaključka da nedostatak p16 u tumorskim ćelijama ukazuje na ulogu p16 u tumorigenezi, kao i da povišen nivo ekspresije ukazuje na bolje preživljavanje (94).

Studija koja se bavila ulogom proteina p16 u preživljavanju kod pacijenata sa karcinomom želuca ističe da je preživljavanje bez ponovnog javljanja bolesti znatno kraće kod p16-negativnih pacijenata ($p < 0,001$) (95).

U studiji iz 2019. kod 547 pacijenata sa karcinomom orofarinksa, pored drugih faktora (starost, pušenje, stadijum bolesti, pol i drugi kliničko-morfološki parametri od značaja), analiziran je i p16 status. Rezultati su govorili u prilog činjenici da je p16-negativan status pacijenta udružen sa pojavom udaljenih metastaza (96).

Nakon sumiranja rezultata dobijenih statističkom analizom, iako nema statističke značajnosti, možemo izvući neke korisne zaključke u vezi sa ekspresijom CDKN1C i p57.

U odnosu na sve ispitivane karakteristike, ekspresiju proteina p57 > 5% imaju u većem procentu ispitanici muškog pola, starije životne dobi, sa svetloćelijskim histološkim tipom i sa većim dimenzijama tumora. U odnosu na dimenzije tumora razlika je blizu statističke značajnosti. Medijana ekspresije p57 je dvostruko veća kod pacijenata muškog pola, i ovaj rezultat je takođe blizu konvencionalnog nivoa značajnosti. Visoku ekspresiju proteina i pretežno normalan nivo ekspresije gena CDKN1C imaju u većem procentu pacijenti kod kojih je nastupio smrtni ishod. Ali, sve ove razlike u nivou ekspresije nisu pokazale statističku signifikantnost.

Uporedili smo naše rezultate sa rezultatima studije koja je ispitivala imunohistohemijsku ekspresiju ciklina D, ciklina E, p16, p21, p27, p53 i p57 kod pacijenata sa karcinomom bubrežnih ćelija, na velikom uzorku od 452 pacijenta, s tim što su svi pacijenti obuhvaćeni ovom studijom imali dijagnostikovan svetloćelijski histološki tip. Pacijenti su praćeni u proseku tokom perioda od 24 meseca, i kod svih je određen prognostički marker-skor, koji je smatran nepovoljnim ukoliko je ustanovljena alteracija više od 4 ispitivana proteina ćelijskog ciklusa (približno u 12% slučajeva), a autori su u zaključku istakli da je kumulativan broj aberantno eksprimiranih proteina ćelijskog ciklusa u korelaciji sa lošijim ishodom i generalno težom kliničkom slikom (97). U našoj studiji skor nije određivan, ali rezultati govore u prilog pomenutog zaključka.

Istraživanje iz 2017-te godine koje je obuhvatalo tumore kore nadbubrežne žlezde u pedijatrijskoj populaciji, ukazuje na značaj p57 kao dostupnog markera za razlikovanje benignih od malignih neoplazmi kore nadbubrega, usled promena na hromozomu 11p15 (98).

6. ZAKLJUČCI

1. Postoji statistički značajno viša ekspresija ciklina A i p16 u papilarnom histološkom tipu i ciklina D1 u svetloćelijskom histološkom tipu karcinoma bubrežnih ćelija.
2. Kod pacijenata sa višim gradusom bolesti postoji duplikacija gena CCNA što je statistički značajan rezultat.
3. Postoji statistički značajno viša ekspresija ciklina A kod bolesnika kod kojih je nastupio smrtni ishod.
4. Trećina pacijenata sa papilarnim histološkim tipom ima deleciju gena CCND, dok polovina pacijenata sa papilarnim histološkim tipom ima duplikaciju gena CDKN2A, što je blizu statističkog nivoa značajnosti.
5. p57 ima povišen nivo ekspresije kod tumora većih dimenzija, što je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti.
6. Značajni prediktori preživljavanja su starost, stadijum bolesti i ciklin A.

Karcinom bubrežnih ćelija je klinički, histomorfološki i genetski raznolika bolest, a kako do sad nema nijednog zvanično priznatog molekularnog prognostičkog markera za RCC, pažljivim tumačenjem dobijenih rezultata nametnuo se niz novih pitanja i ideja za dalja istraživanja. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju dobru osnovu za studije koje bi obuhvatale veći broj uzoraka, uz dostupno dugotrajno praćenje bolesnika, sa ciljem definisanja pouzdanog i preciznog tumorskog markera, koji bi omogućio ranu dijagnostiku (pre nego je bolest uznapredovala), dobru procenu efikasnosti primene terapijskog protokola, dužine očekivanog preživljavanja i verovatnoće pojave rekurentne bolesti.

7. LITERATURA

1. Moch H, Humphrey PA, Ulbright T, Reuter VM, editors. WHO Classification of tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. (4th). Lyon: IARC; 2016. 11–76 p.
2. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins and Coutran's Pathologic Basis of Disease. Book. 2009.
3. Moinuddin Z, Dhanda R. Anatomy of the kidney and ureter. Anaesthesia and Intensive Care Medicine. 2015.
4. Moorthy AV, Blichfeldt TC. Anatomy and Physiology of the Kidney. In: Pathophysiology of Kidney Disease and Hypertension. 2008.
5. Linehan WM, Ricketts CJ. The metabolic basis of kidney cancer. Seminars in Cancer Biology. 2013.
6. Mescher A. Junqueira Basic Histology Text and Atlas 14th Edition. McGraw-Hill Education. 2016.
7. &NA; 3. Anatomy of the Kidney. Am J Med Sci. 2007;
8. Tisher CC. Functional anatomy of the kidney. Hosp Pract. 1978;
9. Delahunt B TA. Renal cell carcinoma. A historical perspective. J Urol Pathol. 1996;4:31–49.
10. Delahunt B. History of Renal Neoplasia. 1889;1–5.
11. CP Robin. Memoire sur l'epithelioma du rein et sur les minces failments granuleux des tubes uriniparees expulses avec les urines. Gaz d Hop Civ Mil. 1855;(28):186–203.
12. PA Grawitz. Die Entstehung von Nierentumoren aus Nebennierengewebe. Arch Klin Chir. 1884;(30):824–34.
13. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. Eur Urol. 2016;

14. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *European Urology*. 2006.
15. Hunt JD, Van Der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;
16. Kelsh MA, Alexander DD, Mink PJ, Mandel JH. Occupational Trichloroethylene Exposure and Kidney Cancer. *Epidemiology*. 2009;
17. Wagstaff J, Jones R, Hawkins R, Porfiri E, Pickering L, Bahl A, et al. Treatment patterns and clinical outcomes in patients with renal cell carcinoma in the UK: Insights from the RECCORD registry. *Ann Oncol*. 2016;
18. Hidayat K, Du X, Shi BM. Body fatness at a young age and risks of eight types of cancer: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Obesity Reviews*. 2018.
19. Amling CL. The association between obesity and the progression of prostate and renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2004;22(6):478–84.
20. Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Increased risk of renal cell carcinoma subsequent to hysterectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;
21. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. 2008;
22. Denton MD, Magee CC, Ovuworie C, Mauiyyedi S, Pascual M, Colvin RB, et al. Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: A pathologic analysis. *Kidney Int*. 2002;
23. Tsang SH, Sharma T. Von Hippel-Lindau disease. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018.
24. Shen C, Kaelin WG. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2013;23(1):18–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.06.001>
25. Delahunt B, Egevad L, Samaratunga H, Martignoni G, Nacey JN, Srigley JR. Gleason and Fuhrman no longer make the grade. *Histopathology*. 2016.

26. Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, McCredie MRE, Martignoni G, Eble JN, et al. Fuhrman grading is not appropriate for chromophobe renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2007;
27. Belsante M, Darwish O, Youssef R, Bagrodia A, Kapur P, Sagalowsky AI, et al. Lymphovascular invasion in clear cell renal cell carcinoma-Association with disease-free and cancer-specific survival. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2014;32(1):30.e23-30.e28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.11.002>
28. May M, Brookman-Amissah S, Roigas J, Peter Gilfrich C, Pflanz S, Hoschke B, et al. Evaluation of renicapsular involvement in Stages I and II renal cell carcinoma from the morphological and prognostic point of view. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2010;28(3):274–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.07.008>
29. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*. 2010.
30. Szabó KG, Szentkereszty Z, Tóth LA, Damjanovich L, Sáyó P. [Distal pancreas resection for metastasis of clear cell renal cancer]. *Magy sebészet*. 2010;
31. Suzigan S, López-Beltrán A, Montironi R, Drut R, Romero A, Hayashi T, et al. Multilocular Cystic Renal Cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2008;
32. Zhao W, Tian B, Wu C, Peng Y, Wang H, Gu WL, et al. DOG1, cyclin D1, CK7, CD117 and vimentin are useful immunohistochemical markers in distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from clear cell renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2015;211(4):303–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.12.014>
33. Müller-Höcker J, Babaryka G, Schmid I, Jung A. Overexpression of cyclin D1, D3, and p21 in an infantile renal carcinoma with Xp11.2 TFE3-gene fusion. *Pathol Res Pract*. 2008;204(8):589–97.
34. Leroy X, Camparo P, Gnemmi V, Aubert S, Flamand V, Roupret M, et al. Clear cell papillary renal cell carcinoma is an indolent and low-grade neoplasm with overexpression of cyclin-D1. *Histopathology*. 2014;64(7):1032–6.

35. Sukov WR, Ketterling RP, Lager DJ, Carlson AW, Sinnwell JP, Chow GK, et al. CCND1 rearrangements and cyclin D1 overexpression in renal oncocytomas: frequency, clinicopathologic features, and utility in differentiation from chromophobe renal cell carcinoma. *Hum Pathol* [Internet]. 2009;40(9):1296–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2009.01.016>
36. Handbook of Practical Immunohistochemistry. Handbook of Practical Immunohistochemistry. 2015.
37. Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J. Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. *Rev Urol*. 2002;
38. Ding G xiong, Feng C chen, Song N hong, Fang Z jun, Xia G wei, Jiang H wen, et al. Paraneoplastic symptoms: Cachexia, polycythemia, and hypercalcemia are, respectively, related to vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in renal clear cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2013;31(8):1820–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.03.021>
39. Uppot RN, Harisinghani MG, Gervais DA. Imaging-guided percutaneous renal biopsy: Rationale and approach. *American Journal of Roentgenology*. 2010.
40. Sankineni S, Brown A, Cieciera M, Choyke PL, Turkbey B. Imaging of renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2016;34(3):147–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.05.020>
41. Zhang J, Lefkowitz RA, Bach A. Imaging of Kidney Cancer. *Radiologic Clinics of North America*. 2007.
42. Pedrosa I, Sun MR, Spencer M, Genega EM, Olumi AF, Dewolf WC, et al. MR Imaging of Renal Masses: Correlation with Findings at Surgery and Pathologic Analysis. *RadioGraphics*. 2008;
43. Kunath F, Schmidt S, Krabbe LM, Miernik A, Dahm P, Cleves A, et al. Partial nephrectomy versus radical nephrectomy for clinical localised renal masses. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017.
44. Merrill MM, Wood CG, Tannir NM, Slack RS, Babaian KN, Jonasch E, et al. Clinically nonmetastatic renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation: Natural history and outcomes after surgical resection with curative intent. *Urol Oncol*

- Semin Orig Investig [Internet]. 2015;33(4):166.e21-166.e29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.11.021>
45. Adibi M, Thomas AZ, Borregales LD, Merrill MM, Slack RS, Chen HC, et al. Percentage of sarcomatoid component as a prognostic indicator for survival in renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2015;33(10):427.e17-427.e23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.04.011>
 46. Kunene V, Miscoria M, Pirrie S, Islam MR, Afshar M, Porfiri E. Sarcomatoid renal cell carcinoma: Clinical outcome and survival after treatment with sunitinib. *Clin Genitourin Cancer*. 2014;
 47. Merrill MM, Wood CG, Tannir NM, Slack RS, Babaian KN, Jonasch E, et al. Clinically nonmetastatic renal cell carcinoma with sarcomatoid dedifferentiation: Natural history and outcomes after surgical resection with curative intent. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015;
 48. Grünwald V, McKay RR, Krajewski KM, Kalanovic D, Lin X, Perkins JJ, et al. Depth of remission is a prognostic factor for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2015;67(5):952–8.
 49. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153–66.
 50. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:21–32.
 51. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. 2003.
 52. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev Cell*. 2008;14(2):159–69.
 53. Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(8):1317–26.
 54. Salazar G, Liu D, Liao C, Batkiewicz L, Arbing R, Chung SSW, et al. Apoptosis in male germ cells in response to cyclin A1-deficiency and cell cycle arrest. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1571–9.

55. Juengel E, Nowaz S, Makarevi J, Natsheh I, Werner I, Nelson K, et al. HDAC-inhibition counteracts everolimus resistance in renal cell carcinoma in vitro by diminishing cdk2 and cyclin A. *Mol Cancer*. 2014;13(1).
56. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1995.
57. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age [see comments]. [Review]. *Cell*. 1994;79(4):573–82.
58. Mao X, Orchard G, Vonderheid EC, Nowell PC, Bagot M, Bensussan A, et al. Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. *J Invest Dermatol*. 2006;
59. Zhang Q, Sakamoto K, Wagner KU. D-type cyclins are important downstream effectors of cytokine signaling that regulate the proliferation of normal and neoplastic mammary epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;
60. Alarcon-Vargas D, Zhang Z, Agarwal B, Challagulla K, Mani S, Kalpana G V. Targeting cyclin D1, a downstream effector of INI1/hSNF5, in rhabdoid tumors. *Oncogene*. 2006;25(5):722–34.
61. Mirkovic J, Calicchio M, Fletcher CD, Perez-Atayde AR. Diffuse and strong cyclin D1 immunoreactivity in clear cell sarcoma of the kidney. *Histopathology*. 2015;67(3):306–12.
62. Hedberg Y, Davoodi E, Roos G, Ljungberg B, Landberg G. Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;
63. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol* [Internet]. 2013;183(1):3–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.001>
64. Kim MK, Park GH, Eo HJ, Song HM, Lee JW, Kwon MJ, et al. Tanshinone i induces cyclin D1 proteasomal degradation in an ERK1/2 dependent way in human colorectal cancer cells. *Fitoterapia* [Internet]. 2015;101:162–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.010>
65. Martin N, Beach D, Gil J. Ageing as developmental decay: Insights from p16 INK4a. *Trends Mol Med*. 2014;20(12):667–74.

66. Ball E, Bond J, Franc B, DeMicco C, Wynford-Thomas D. An immunohistochemical study of p16INK4a expression in multistep thyroid tumorigenesis. *Eur J Cancer*. 2007;43(1):194–201.
67. Kavanagh E, Joseph B. The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2011;1816(1):50–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.03.002>
68. Higashimoto K, Soejima H, Saito T, Okumura K, Mukai T. Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: The molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. In: *Cytogenetic and Genome Research*. 2006.
69. Du QY, Wang EY, Huang Y, Guo XY, Xiong YJ, Yu YP, et al. Blastocyst culture and transfer: Analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*. 2016;29(January):617–31.
70. Yanagida A, Chikada H, Ito K, Umino A, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, et al. Liver maturation deficiency in p57 Kip2 ^{-/-} mice occurs in a hepatocytic p57 Kip2 expression-independent manner. *Dev Biol* [Internet]. 2015;407(2):331–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.07.004>
71. Hagiwara K, Li Y, Kinoshita T, Kunishima S, Ohashi H, Hotta T, et al. Aberrant DNA methylation of the p57KIP2 gene is a sensitive biomarker for detecting minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Res*. 2010;34(1):50–4.
72. Kimura T, Kitaura H, Masuda H, Kameyama S, Saito Y, Sugai K, et al. Characteristic expression of p57/Kip2 in balloon cells in focal cortical dysplasia. *Neuropathology*. 2015;
73. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Syrjänen K, Kosma V. Renal Cell Cancer and Their Relation To Clinicopathological Variables and Patient Survival. 2007;80(1999):2001–7.
74. Santala S, Talvensaari-Mattila A, Soini Y, Honkavuori-Toivola M, Santala M. High expression of cyclin A is associated with poor prognosis in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Tumor Biol*. 2014;35(6):5395–9.
75. Jernman J, Välimäki MJ, Hagström J, Louhimo J, Haapasalo H, Arola J, et al. Cyclin A predicts metastatic potential of rectal neuroendocrine tumors. *Hum Pathol* [Internet].

- 2014;45(8):1605–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2014.03.012>
76. Metwally AM, Refaat LA, Shaaban HA, Megm S, Emara M, Tohamy AA, et al. Role of cyclins A and E in endometrial carcinogenesis in breast cancer patients under tamoxifen treatment. *J Egypt Natl Canc Inst* [Internet]. 2013;25(4):193–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2013.07.002>
 77. Mu K, Li L, Yang Q, Yun H, Kharaziha P, Ye DW, et al. A standardized method for quantifying proliferation by Ki-67 and cyclin A immunohistochemistry in breast cancer. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2015;19(4):243–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2015.05.002>
 78. Chen HM, Kuo MYP, Lin KH, Lin CY, Chiang CP. Expression of cyclin A is related to progression of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*. 2003;
 79. Bahnassy AA, Zekri ARN, El-Houssini S, El-Shehaby AMR, Mahmoud MR, Abdallah S, et al. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol*. 2004;
 80. Tut VM, Charlton FE, Wilson Dorne CH, Neal DE, Mellon JK. Cyclin A expression in bladder cancer: Correlation with Ki67 index. *Br J Urol*. 1998;
 81. Wang L, Chen Z, Wang Y, Chang D, Su L, Guo Y, et al. WWTR1 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis through cyclin A and CTGF regulation in non-small cell lung cancer. *Tumor Biol*. 2014;35(1):463–8.
 82. Wang S-M, Sun Z-Q, Li H-Y, Wang J, Liu Q-Y. Temporal Identification of Dysregulated Genes and Pathways in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Based on Systematic Tracking of Disrupted Modules. *Comput Math Methods Med*. 2015;2015:1–11.
 83. Giannella C, Mangia A, Primavera AT, Schittulli F. HER-2 / jzew , c-Myc and cyclin-A in human breast cancer. 1996;111–5.
 84. Bäumer N, Bäumer S, Haak M, Koschmieder S, Schönig K, Berdel WE, et al. A limited role for the cell cycle regulator cyclin A1 in murine leukemogenesis. *PLoS One*. 2015;10(6):1–11.
 85. Lima MS, Pereira RA, Costa RS, Tucci S, Dantas M, Muglia VF, et al. The prognostic value of cyclin D1 in renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(5):905–13.

86. Gayed BA, Youssef RF, Bagrodia A, Kapur P, Darwish OM, Krabbe LM, et al. Prognostic role of cell cycle and proliferative biomarkers in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* [Internet]. 2013;190(5):1662–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2013.06.037>
87. Hedberg Y, Ljungberg B, Roos G, Landberg G. Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. *Br J Cancer*. 2003;88(9):1417–23.
88. Lee E, Jin DH, Lee B Bin, Kim Y, Han J, Shim YM, et al. Negative effect of cyclin D1 overexpression on recurrence-free survival in stage II-III A lung adenocarcinoma and its expression modulation by vorinostat in vitro. *BMC Cancer*. 2015;15(1):1–11.
89. Dickson C, Fantl V, Gillett C, Brookes S, Bartek J, Smith R, et al. Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett*. 1995;
90. Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, et al. Amplification and Overexpression of Cyclin D1 in Breast Cancer Detected by Immunohistochemical Staining. *Cancer Res*. 1994;
91. Tanaka T, Iwasa Y, Kondo S, Hiai H, Toyokuni S. High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15(INK4B) and p16(INK4A) tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinoma of rats. *Oncogene*. 1999;18(25):3793–7.
92. Zennami K, Yoshikawa K, Kondo E, Nakamura K, Yamada Y, De Velasco MA, et al. A new molecular targeted therapeutic approach for renal cell carcinoma with a p16 functional peptide using a novel transporter system. *Oncol Rep*. 2011;26(2):327–33.
93. Vidaurreta M, Maestro ML, Sanz-Casla MT, Maestro C, Rafael S, Veganzones S, et al. Inactivation of p16 by CpG hypermethylation in renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2008;26(3):239–45.
94. Ikuerowo SO, Kuczyk MA, von Wasielewski R, Shittu OB, Jonas U, Machtens S, et al. p16INK4a Expression and Clinicopathologic Parameters in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2007;51(3):732–8.
95. Ma JM, Shi ZJ, Chen L, Hu HZ, Wang WG, Su CQ, et al. Expression of multiple

- tumor suppressor gene p16 and its relationship with prognosis of gastric cancer patients. *Chinese J Oncol.* 2012;
96. Beitler J, MD MBA, Switchenko J, Dignam J, McDonald M, Saba N, et al. Smoking, age, nodal disease, T stage, p16 status, and risk of distant metastases in patients with squamous cell cancer of the oropharynx. *Cancer.* 2019;
 97. Gayed BA, Youssef RF, Bagrodia A, Kapur P, Darwish OM, Krabbe LM, et al. Prognostic role of cell cycle and proliferative biomarkers in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Urol.* 2013;
 98. Giovannoni I, Boldrini R, Benedetti MC, Inserra A, De Pasquale MD, Francalanci P. Pediatric adrenocortical neoplasms: Immunohistochemical expression of p57 identifies loss of heterozygosity and abnormal imprinting of the 11p15.5. *Pediatr Res.* 2017;

SPISAK SKRAĆENICA

AK- aminokiselina

BHD- Birt- Hogg-Dube syndrome

BMI- Body Mass Index

CCNA: CCNB; CCND; CDKN2A; CDKN1C- Geni koji kodiraju ispitivane proteine

CDK- Ciklin zavisna kinaza

CDKI- Inhibitor ciklin zavisne kinaze

CT- Kompjuterizovana tomografija

DAB- Diaminobenzidin

DLBCL- Difuzni krupnoćelijski B-ćelijski limfom

DNK- Dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA- Ethylenediaminetetraacetic acid

FH- Fumarat hidrataza

FIGO- International Federation of Gynecology and Obstetrics

GIST- Gastrointestinalni stromalni tumor

HE- Hematoksilin-eozin

HiF1 α - Hypoxia-inducible factor 1-alpha

IARC- International Agency for Research on Cancer

IHH- Imunohistohemija

MITF- Microphthalmia-associated Transcription Factor

MR- Magnetna rezonancija

PBS- Phosphate Buffered Saline

PCNA- Proliferating Cell Nuclear Antigen

Rb- Retinoblastom

RCC- Renal Cell Carcinoma

SDH- sukcinat dehidrogenaza

SDS- Sodium Dodecyl Sulfate

SZO- Svetska zdravstvena organizacija

TGF- β - Transforming Growth Factor- β

TNM- T-tumor; N-node; M-metastasis

qRT-PCR- Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

VHL- Von Hippel Lindau

WHO- World Health Organization

WHO/ISUP- World Health Organization/ International Society of Urological Pathology

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Dragana Latić rođena je 08.02.1983. godine u Beogradu, Srbija.

Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 2001/2002.godine, a diplomirala je 25.12.2007. sa srednjom ocenom 8,54.

Lekarski staž je obavila u Beogradu, stručni ispit položila je u Srbiji u julu 2008. godine, a stručni ispit u Crnoj Gori položila je u junu 2010. godine.

Bila je zaposlena u „Vana“ d.o.o. na poziciji lekar-saradnik od maja 2008. do decembra 2010. godine. Posao lekara u timu HMP u jedinicama Nikšić i Pljevlja u Zavodu za hitnu medicinsku pomoć Crne Gore obavljala je od 2010. do 2013. godine. Početkom 2014. godine bila je zaposlena na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao istraživač-pripravnik na projektu. Od februara 2014. godine zaposlena je na neodređeno vreme u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore u Podgorici kao specijalizant, a od jula 2018. kao specijalista patologije.

Specijalistički staž obavljala je na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu od aprila 2014. do aprila 2018. godine, a specijalistički ispit položila je 13.07.2018. godine sa ocenom vrlo dobar na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Autor i koautor je u 13 radova i sažetaka radova, objavljenih u domaćim i međunarodnim časopisima i prezentovanih na domaćim i međunarodnim stručnim okupljanjima.

Od 2011. godine angažovana je na projektu „Optičko-mikroskopska, imunomorfološka, molekularno-biološka i genetska ispitivanja malignih i nemalignih bolesti bubrega“, broj 175059, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, čiji je rukovodilac prof. dr Gordana Basta-Jovanović.

Član je Srpskog lekarskog društva, Udruženja patologa i citologa Srbije, Evropskog udruženja patologa i citologa i Ljekarske komore Crne Gore.

Govori engleski (B2) i ruski jezik (C1), služi se turskim i portugalskim jezikom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Dragana Latić

Potpisani-a _____

broj upisa _____ mm 085002 _____

Izjavljujem

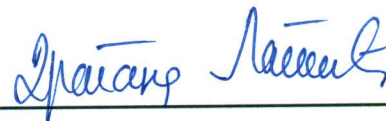
da je doktorska disertacija pod naslovom

»Ispitivanje ekspresije proteina ćelijskog ciklusa kod bolesnika sa karcinomom 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, 05.04.2019.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Dragana Latić

Ime i prezime autora _____

Broj upisa mm 085002

Studijski program molekularna medicina

Naslov rada »Ispitivanje ekspresije proteina ćelijskog ciklusa kod bolesnika sa karcinomom bubrežnih ćelija«

Mentor prof. Dr Sanja Radojević-Škodrić

dr Dragana Latić

Potpisani _____


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, 05.04.2019.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

»Ispitivanje ekspresije proteina ćelijskog ciklusa kod bolesnika sa karcinomom 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, _05.04.2019.

