

# Kliničko-patološki prognostički čimbenici u raku bubrežnih stanica s posebnim osvrtom na angiogenezu

---

**Mozetič, Vladimir**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2005**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:888697>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vladimir Mozetič**

**KLINIČKO-PATOLOŠKI PROGNOŠTIČKI  
ČIMBENICI U RAKU BUBREŽNIH STANICA S  
POSEBNIM OSVRTOM NA ANGIOGENEZU**

**Doktorska disertacija**

**Rijeka, 2005.**

# PODACI O AUTORU I DOKTORSKOM RADU

## 1. AUTOR

IME I PREZIME	Vladimir Mozetič
DATUM I MJESTO RODENJA	16. veljače 1967., Rijeka
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA DODIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 1991.
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA POSLIJEDIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 1996.
SADAŠNJE ZAPOSLENJE, ADRESA	KBC Rijeka, Klinika za kirurgiju, Tome Stržića 3, 51000 Rijeka

## 2. DOKTORSKI RAD

NASLOV	Kliničko – patološki prognostički čimbenici u raku bubrežnih stanica s posebnim osvrtom na angiogenezu
USTANOVA NA KOJOJ JE PRIJAVLJEN I IZRAĐEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
BROJ STRANICA, SLIKA, GRAFIKONA, TABLICA I BIBLIOGRAFSKIH PODATAKA	Stranica 78, slika 14, tablica 23, shema 6, bibliografskih podataka 125
ZNANSTVENO PODRUČJE, POLJE I GRANA	Znanstveno područje <i>biomedicina i zdravstvo</i> , znanstveno polje <i>kliničke medicinske znanosti</i> , znanstvena grana <i>urologija</i>
IME I PREZIME MENTORA	Prof.dr.sc. Nives Jonjić, prof.dr.sc. Željko Fučkar
FAKULTET NA KOJEM JE OBRANJEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

## 3. OCJENA I OBRANA

DATUM PRIJAVE TEME	29. lipnja 1998.
DATUM PREDAJE RADA	17. lipnja 2005.
DATUM SJEDNICE FAKULTETSKOG VIJEĆA NA KOJOJ JE RAD PRIHVAĆEN	19. srpnja 2005.
POVJERENSTVO ZA OCJENU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Elvira Mustač, prof.dr.sc. Petar Orlić, doc.dr.sc. Ksenija Lučin
POVJERENSTVO ZA OBRANU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Elvira Mustač, prof.dr.sc. Petar Orlić, doc.dr.sc. Ksenija Lučin, prof.dr.sc. Nives Jonjić, prof.dr.sc. Željko Fučkar
DATUM OBRANE	14. rujna 2005.

**Mentori rada: prof.dr.sc. Nives Jonjić i prof.dr.sc. Željko Fučkar**

Doktorska disertacija obranjena je dana \_\_\_\_\_ na

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Elvira Mustać
2. prof.dr.sc. Petar Orlić
3. doc.dr.sc. Ksenija Lučin
4. prof.dr.sc. Nives Jonjić
5. prof.dr.sc. Željko Fučkar

Rad ima 87 listova.

**UDK 616-037:616-006:616.61:616-089:616-085**

**Zahvaljujem se Nives, Željku, Gordani, Danijeli, Kovički, Vanji i Ireni.  
Oni znaju zbog čega.**

**Hvala i svim kolegicama i kolegama s Urološkog odjela Kirurške klinike KBC Rijeka i  
Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, kao i medicinskim sestrama,  
tehničarima i laborantima bez čije pomoći mozaik ne bi bio potpun.**

# SADRŽAJ

Stranica

## 1. UVOD

1.1. <i>Incidencija karcinoma bubrežnih stanica</i>	1
1.2. <i>Epidemiološki čimbenici</i>	2
1.3. <i>Obiteljske forme</i>	3
1.4. <i>Probir (screening) za rano otkrivanje karcinoma bubrežnih stanica</i>	4
1.5. <i>Klinička slika</i>	5
1.6. <i>Diferencijalna dijagnoza</i>	6
1.7. <i>Klasifikacija tumora bubrega</i>	6
1.8. <i>Patohistološki prognostički čimbenici u karcinomu bubrežnih stanica</i>	13
1.9. <i>Ostali prognostički čimbenici u karcinomu bubrežnih stanica</i>	15
1.10. <i>„Imaging“ metode u prikazivanju karcinoma bubrežnih stanica</i>	17
1.11. <i>Operacijsko liječenje</i>	18
1.12. <i>Medikamentozna terapija kod metastatskog karcinoma bubrežnih stanica</i>	20
1.13. <i>Postoperacijsko praćenje</i>	22
1.14. <i>Tumorska angiogeneza i čimbenik proliferacije Ki-67</i>	23
1.14.1. <i>Tumorska angiogeneza</i>	23
1.14.2. <i>Čimbenik proliferacije Ki67</i>	25

<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>26</b>
<b>3. BOLESNICI I METODE</b>	
3.1. <i>Kliničko-patološki podaci</i>	27
3.2. <i>Imunohistokemijska analiza</i>	31
3.3. <i>Statistička obrada</i>	32
<b>4. REZULTATI</b>	
4.1. <i>Kliničko-patološke karakteristike tumora bubrežnih stanica</i>	36
4.2. <i>Povezanost VEGF-a s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma bubrežnih stanica</i>	37
4.3. <i>Usporedba nuklearnog gradusa u odnosu na kliničko-patološke karakteristike karcinoma bubrežnih stanica</i>	40
4.4. <i>Broj krvnih žila u odnosu na kliničko-patološke karakteristike bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica</i>	43
4.5. <i>Kliničko-patološki parametri u bolesnika s i bez metastaza</i>	45
4.6. <i>Petogodišnje preživljenje bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica u odnosu na analizirane kliničko-patološke parametre</i>	45
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>54</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>62</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>63</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b>	<b>78</b>

## SAŽETAK

**Cilj.** U ovom istraživanju postavljeni su sljedeći ciljevi: odrediti kliničke parametre karcinoma bubrežnih stanica (RCC), procijeniti značaj angiogeneze unutar karcinoma bubrežnih stanica, analizirati medijatore angiogeneze i čimbenike proliferacije, usporediti angiogenezu i vrijednosti proliferacijskih čimbenika s kliničkim parametrima i to svaki parameter zasebno, usporediti stupanj angiogeneze i vrijednosti proliferacijskih čimbenika u bolesnika sa i bez metastaza, te dokazati korelaciju stupnja angiogeneze i vrijednosti proliferacijskih čimbenika s kliničkim parametrima u cilju uporabe tih metoda u prognostičke svrhe.

**Ispitanici i metode.** U studiju je uključeno 175 bolesnika u kojih je u razdoblju od 1.1.1989. do 31.12.1994. na Urološkom odjelu Kirurške klinike KBC Rijeka učinjena radikalna nefrektomija zbog tumora bubrega. Nakon postavljene dijagnoze na histološkim preparatima (fiksirani u formalinu i uloženi u parafin), rezovi su imunohistokemijski obojani i pregledani na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Klasificiranje tumora učinjeno je po WHO klasifikaciji karcinoma bubrežnih stanica, a stupnjevanje po TNM klasifikaciji, dok je nuklearni gradus (NG) određivan po četverostupanjskom modelu Fuhrmana i suradnika. Bolesnici su podijeljeni po dobi i spolu. Istaknuti su simptomatologija i dijagnostičke pretrage, tipovi operacija i postoperacijskog liječenja. Opisani su broj i mjesto metastaza te petogodišnje preživljavanje. Imunohistokemijskom analizom, koristeći standardnu imunoperoxidaza ABC tehniku na parafinskim rezovima, određen je broj krvnih žila (BKŽ) i ekspresija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF). Krvne žile prikazane su bojeći endotelne stanice na CD31 antigen (DAKO, klon JC70A, Dakocytomation, Denmark). U područjima najveće gustoće BKŽ je mjereno koristeći računalni program analize slike (ISSA 3.1 software). Temelj statističke analize bila je procjena ekspresije VEGF i vrijednosti BKŽ i njihov odnos prema nuklearnom gradusu, veličini tumora, dobi bolesnika i proliferaciji Ki-67 koristeći Pearsonovu parametrijsku korelaciju.



Odnos između VEGF ekspresije i BKŽ procijenjen je Student T testom. Usporedba petogodišnjeg preživljenja s ekspresijom VEGF, Ki67 proliferativnog indeksa i BKŽ analizirana je Coxovom regresijom proporcionalnog rizika. Preživljenje je analizirano Kaplan-Meier krivuljama.

**Rezultati.** Oko 88% RCC pripadalo je svijetlostaničnom ili konvencionalnom tipu. Nuklearni gradusi 1 i 2 bili su zastupljeni u oko 62% karcinoma bubrežnih stanica. Metastaze su većinom bile prisutne (66%) u tumorima s većim gradusom (NG3 i 4). Više od polovice tumora (54%) otkriveno je u asimptomatskoj fazi, ultrazvučnom dijagnostikom. Tumori s većim postotkom i perimembranozno obojenim stanicama na VEGF imali su veći BKŽ, dok je manji postotak VEGF pozitivnih stanica s heterogenom distribucijom u tumoru i s jačim intenzitetom obojenja bio udružen s većim Ki67 proliferacijskim indeksom. Broj krvnih žila bio je obrnuto proporcionalan s Ki67 ekspresijom. Veći NG obilježavao je tumore većeg promjera, većeg Ki67 proliferacijskog indeksa i većeg BKŽ. Metastaze su bile više zastupljene u bolesnika s tumorima većeg promjera i većeg proliferacijskog indeksa. Analiza preživljenja pokazala je da bolesnici s heterogenom tumorskom distribucijom VEGF, većim NG, većim Ki67 proliferacijskim indeksom tumorskih stanica i s prisutnim metastazama imaju značajnije kraće preživljenje.

**Zaključak.** Angiogeneza, procijenjena kroz BKŽ u RCC pokazala se povezana s ekspresijom VEGF na tumorskim stanicama. Iako su čimbenici angiogeneze BKŽ i VEGF obično udruženi s prognostički nepovoljnijim faktorima kao što su to NG, Ki67 proliferacijski indeks i veličina tumora, oni sami za sebe ipak nisu značajni u procijeni preživljenja bolesnika s RCC. Za razliku od njih, Ki67 proliferacijski indeks i NG tumorskih stanica, kao i prisustvo metastaza, predstavljaju neovisne prognostičke čimbenike RCC.

**Ključne riječi:** rak bubrežnih stanica, prognostički čimbenici, angiogeneza, VEGF, broj krvnih žila, Ki67

## SUMMARY

**Aim.** The aim of this study was: to determine clinical parameters of the renal cell carcinoma (RCC), to evaluate angiogenesis in RCC, to analyze angiogenetic parameters and proliferation factors, to compare angiogenesis and value of proliferation factors with clinical parameters; each parameter separately, to compare the level of angiogenesis and value of proliferation factors in patients with and without metastasis, and to prove the correlation between the level of angiogenesis and the value of proliferation factors with clinical parameters, and the prognostic significance of those methods.

**Patients and Methods.** The study included 175 patients who underwent radical nephrectomy due to renal cancer, between January 1<sup>st</sup> 1989 and December 31<sup>st</sup> 1994 at the Department of Urology of the University Hospital Rijeka. Histological specimens (fixed in formalin and embedded in paraffin), were immunohistochemically stained and examined at the Department for Pathology of the Faculty of Medicine in Rijeka. Tumor classifications were done according to WHO classification of RCC, TNM classification was used in staging, while the Fuhrman four-label model was used to asses nuclear grading scheme. Patients were grouped according to age and sex, symptoms and diagnostic methods were emphasized as well as operative methods and postoperative treatment. Number and location of metastasis were described as well as five-year survival. Tumor samples were processed for immunohistological analysis in order to determinate microvessels density (MVD), VEGF expression and Ki67 proliferative index using standard immunoperoxidase ABC technique on paraffin-embedded sections. The microvessels were visualized by staining endothelial cells for CD31 antigen (DAKO, clone JC70A, Dakocytomation, Denmark). In areas of neovascularisation MVD were quantified by image analysis computer system ("ISSA 3.1 software"). The basis of statistical evaluation were VEGF expression and the values of the MVD counts, and their relation to nuclear grade, tumor size, patients age and KI67

proliferation index using Pearson's parametric correlation. The relation between VEGF expression and MVD was assessed using Student's t-test. Correlation between five-year survival rate with Ki67 proliferation and MVD was assessed with Cox proportional-hazards regression. Angiogenesis and five-year survival rate were correlated using Kaplan-Meier method for cumulative proportion surviving.

**Results.** There was a preponderance of clear cell or conventional tumor types (about 88%), mainly in nuclear grade 1 and 2 (62%). Metastasis were mainly (66%) present in nuclear 3 and 4. More than half of tumors (54%) were discovered in asymptomatic phase with ultrasound. Correlation between VEGF groups and nuclear grade with microvessels density, tumor size, patients' age and Ki67 expression showed statistically significant link between the percentage of positive VEGF tumor cells and VEGF histological pattern with MVD. Nuclear grade was correlated with tumor size and Ki67 expression, with higher Ki67 expression in higher nuclear grade. Expression Ki67 was statistically higher in tumors with higher number of blood vessels. Five-year survival rate within VEGF expression was significant only in correlation with VEGF cytoplasmic pattern. Patients with higher nuclear grade and metastasis and with higher Ki67 proliferation had poorer five-year survival.

**Conclusion.** The angiogenesis, emphasized through MVD in RCC, showed correlation with VEGF expression in tumor cells. Although angiogenesis factors, MVD and VEGF, are connected with unfavourable factors, as nuclear grade, Ki67 and tumor size, they are not independent factors in evaluation of five-years survival rate in patients with RCC. On the other hand, higher expression of Ki67 in RCC with higher stage and grade, with metastasis and poor survival rate singles out this proliferation factor as an independent prognostic factor.

**Key words:** renal cell carcinoma, prognostic factors, angiogenesis, VEGF, Ki67 proliferative index, MVD

## 1. UVOD

### 1.1. Incidencija karcinoma bubrežnih stanica

Karcinom bubrežnih stanica (renal cell carcinoma – RCC) predstavlja raznoliku skupinu tumora, te se smatra grupom novotvorina, a ne jednim entitetom. U grupi urogenitalnih tumora dolazi na treće mjesto s prosjekom od 9 novootkrivenih na 100000 godišnje. U SAD se godišnje otkrije oko 30000 novih bolesnika, dok je broj u Europskoj zajednici oko 20000 <sup>(1)</sup>. U Republici Hrvatskoj je 2002. godine otkriveno 556 novih slučajeva <sup>(2)</sup>.

RCC predstavlja oko 3% svih tumora u odrasloj dobi, a zamijećeno je povećanje incidencije veće od 30% (godišnji rast 2,3-4,3%) u posljednja 2 desetljeća što se objašnjava široko rasprostranjenom uporabom dijagnostičkih, tzv. »imaging» metoda : ultrazvuk (UZ), kompjutorizirana tomografija (CT), nuklearna magnetska rezonancija (NMR) <sup>(3-8)</sup>. Klasični trijas simptoma: bol u lumbalnoj regiji, makrohematurija i palpabilna masa, danas se susreću u manje od 10% bolesnika <sup>(1,3)</sup>.

Na velikim studijama prosječno ukupno petogodišnje preživljenje je oko 60%, što ovisi o stadiju (TNM):

Tablica 1. Prikaz petogodišnjeg preživljenja bolesnika s rakom bubrežnih stanica u odnosu na stadij tumora

Stadij	Petogodišnje preživljenje (%)
I	90-100
II	74-96
III	59-70%
IV	16-32%

Odnos spolova je 3:2, s muškom predominacijom. Prema dobi najčešća pojavnost je od druge polovice petog do sedmog desetljeća života. Najniža incidencija je zabilježena u Azijskim zemljama, slijede SAD i Kanada, dok je najviša prisutna u nekim državama srednje Europe <sup>(4,5)</sup>.

### **1.2. Epidemiološki čimbenici**

Nekoliko mogućih rizičnih čimbenika povezano je s povećanim pojavljivanjem RCC. Najznačajniji su pušenje cigareta, cigara, lula i sličnog <sup>(4)</sup>.

Debljina, pri čemu tzv. «indeks tjelesne mase» (BMI), naročito u žena, utječe na povećanu učestalost RCC i to direktnim povećanjem endogenog estrogena, kao i povećanjem razine inzulina sličnog faktora rasta koji može utjecati na karcinogenezu <sup>(9-11)</sup>.

Kao mogući čimbenik rizika spominje se i hipertenzija <sup>(9)</sup>, te uporaba nekih antihipertenzivskih lijekova tijazidske skupine.

Prehrana se navodi kao jedan od ponekad presudnih čimbenika u stvaranju karcinoma, prvenstveno prženi mesni proizvodi, dok se voće i povrće spominju kao zaštitni čimbenici (vitamin E i karotenoidi) <sup>(12-14)</sup>.

Radna mjesta koja uzrokuju česte kontakte sa željezom, naftom, azbestom i kadmijem mogu također biti uzročni čimbenici <sup>(9)</sup>.

Ranije bolesti bubrega - u bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega, pri čemu je uzrok stečena cistična bolest bubrega, primijećena je veća incidencija RCC <sup>(15)</sup>.

### 1.3. Obiteljske forme

Razvoj molekularne genetike u okviru biologije i imunobiologije doveo je do spoznaje o raznolikosti histoloških oblika RCC, koji se tako dijele u četiri oblika: karcinom svijetlih stanica, papilarni, kromofobni i onkocitom. Genetske anomalije koje dovode do razvoja novotvorine posljedica su: inaktivacije tumorskih supresorskih gena, aktivacije onkogeni i poremećaja u procesu obnavljanja DNA <sup>(16)</sup>.

#### A) Karcinom svijetlih stanica

##### 1. Von Hippel-Lindau-ova bolest (VHL)

VHL-ova bolest je obiteljski oblik RCC svijetlih stanica. To je autosomno-dominantni poremećaj koji se zamjećuje u 1 na 40000 živorođene djece. Genetska promjena jest defekt na kratkom kraku kromosoma 3 (3p25-26) pri čemu je tumor supresorski gen u potpunosti razdvojen <sup>(17)</sup>. Povezan je s drugim vaskularnim tumorima po tijelu (retinalnim hemangiomom, hemangioblastomom u CNS-u), feokromocitomom, adenokarcinomom i cistom gušterače te epididimalnim cistadenomom <sup>(18)</sup>. Vjerojatnost nastanka RCC do 7. desetljeća života je kod VHL-a čak 70% <sup>(19)</sup>. Također se dokazala i povećana incidencija RCC-a u dobi do 35 godine života, uz učestaliju bilateralnost i multifokalnost. Metastatski RCC je najčešći uzrok smrti u VHL bolesti <sup>(20)</sup>.

##### 2. Obiteljski karcinom svijetlih stanica

Opisano je nekoliko bolesnika s RCC u kojih je pronađena translokacija na 3p14 kromosomu <sup>(16)</sup>.

## B) Papilarni tumori

### 1. Hereditarni papilarni RCC (HPRCC)

HPRCC je drugi najčešći histološki podtip RCC. Nasljeđuje se autosomno-dominantno. Genetske studije pokazale su mutacije na MET proto-onkogenu na dugačkom kraku kromosoma 7 (7q31,3), ali i promjenama na 8.,12.,16.,17. i 2. kromosomu. Nastanak bolesti najčešći je, u bilateralnoj i multifokalnoj formi, oko 45. godine života <sup>(21,22)</sup>.

### 2. Hereditarni leiomiom i RCC (HLRCC)

HLRCC je autosomno dominantno nasljedno oboljenje koje uz RCC prate i brojni kožni leiomiomi i fibroleiomiomi maternice, uz brzi rast tumora i nastanak metastaza. Genetski se nalaze mutacije fumarat hidraze na 1q kromosomu <sup>(23)</sup>.

## C) Onkocitno/kromofobna histološka slika

### **1.4. *Probir (screening) za rano otkrivanje karcinoma bubrežnih stanica***

Iako RCC ima visoku smrtnost, naročito u uznapredovanoj fazi, zbog relativno male incidencije te neisplativosti, probir nije uveden u redovitu praksu <sup>(24,25)</sup>. Probir bi trebao biti provoden u ciljanim grupama:

- bolesnici s terminalnim stadijem renalne bolesti (pretežno muškarci, na hemodijalizi, s očekivanim dužim životnim vijekom),
- bolesnici s VHL bolesti,
- rođaci bolesnika s VHL koji imaju specifične genske defekte,
- rođaci bolesnika s ostalim obiteljskim oblicima RCC i

- bolesnici s tuberoznom sklerozom <sup>(26)</sup> .

Probir uključuje:

- godišnje fizikalne preglede,
- mjerenje katekolamina u urinu od 2 godine života svake druge godine,
- NMR mozga dva puta godišnje počevši od 11. godine života,
- UZ trbuha i zdjelice jedanput godišnje nakon 11. godine života,
- CT u slučaju prikaza solidne ili cistične formacije i
- povremena audiometrijska praćenja <sup>(27,28)</sup> .

Kod tuberozne skleroze (autosomno dominantan poremećaj s razvojem adenoma sebaceuma, epilepsije, mentalne retardacije i angiomiolipoma) incidencija RCC je povećana, te se zbog toga preporuča probir <sup>(28)</sup> .

### **1.5. Klinička slika**

Tumor bubrežnih stanica je najčešće asimptomatsko oboljenje koje se slučajno dijagnosticira. U slučaju prisutnosti jednog od tri ranije navedena najučestalija simptoma prisutnost metastaza je veća od 50% <sup>(29)</sup> . Hematurija može biti prisutna u oko trećine bolesnika. Simptomi poput opće slabosti, bolova, gubitka težine, mučnina, većih varikocela ili otoka nogu znak su uznapredovale bolesti.

Paraneoplastični sindrom javlja se kod 10-40% bolesnika s RCC <sup>(30)</sup> . Sindrom se javlja kao posljedica stvaranja biološki aktivnih tvari iz tumora ili imunog odgovora normalnog tkiva na tumor. Hormoni koji se povećavaju kod RCC-a su: paratireoidni hormon, gonadotropini, renin, eritropoetin, glukagon, ljudski korionski gonadotropin, inzulin, placentalaktogen, adrenokortikotropni hormon, te enzim alkalna fosfataza <sup>(30,31)</sup> .



Također se javljaju hiperkalcemija, policitemija, hipertenzija. Nemetastaska jetrena disfunkcija (tzv. Staufferov sindrom), opisuje se uz RCC, s povišenom serumskom alkalnom fosfatazom, produženim protrombinskim vremenom, povišenim alfa-globulinima, hipoalbuminijom, porastom bilirubina, transaminaza i interleukina-6. U 65% bolesnika sindrom se nakon nefrektomije povlači <sup>(31,32)</sup>.

### **1.6. Diferencijalna dijagnoza**

U sklopu obrade bolesnika solidne žarišne lezije bubrega koje oponašaju RCC mogu biti: renalni infarkt, Bertinijeva kolumna, absces, arteriovenska fistula te angiomiolipom. Karcinomi urotela također mogu sličiti RCC-u, kao i limfomi <sup>(33,34)</sup>.

### **1.7. Klasifikacija tumora bubrega**

Tumori bubrega su u obliku RCC prisutni u oko 90% bolesnika.

- Primarni tumori bubrega u odraslih dijele se u:
  - epitelne (benigne i maligne),
  - mezenhimalne (benigne i maligne),
  - blastemalne,
  - neuroendokrine i
  - metastatske.

Maligni epitelni tumori su pak podijeljeni u pet podtipova:

- konvencionalni RCC, uključujući tumor svijetlih i eozinofilnih (granuliranih) stanica,
- kromofobni RCC,

- papilarni (ili kromofilni) RCC,
- karcinom sabirnih kanalića, s medularnim karcinomom bubrega i
- neklasificirani RCC <sup>(35)</sup>.

RCC nastaje u zreloj tubularnoj strukturi bubrega. Većina ih je porijekla iz stanica proksimalnog tubula, dok se za kromofobni i tumor sabirnih stanica smatra da su porijekla donjeg nefrona, odnosno sabirnih kanalića <sup>(36,37)</sup>.

#### A) Konvencionalni RCC (karcinom svjetlih stanica)

U ukupnom broju RCC konvencionalni tip zauzima oko 70%. Većina tumora je solitarna, uz 4% multifokalnosti na jednom bubregu i 0,5-3% bilateralnih nalaza. Najčešća je periferna kortikalna lokalizacija, pretežno u jednom polu. Granica prema normalnom tkivu bubrega je u većini slučajeva dobro određena, s formiranjem pseudokapsule koja dodatno odvaja tumor od zdravog tkiva. Tek u kasnijoj fazi dolazi do probijanja tumora u okolinu. Makroskopski je tipična slika zlatno-žutog tkiva ( područje svjetlih stanica), sa smeđim dijelovima (područje eozinofilnih stanica). U većih tumora prisutna je nekroza, s pseudocističnim dijelovima, uz moguću hemoragiju te kalcifikaciju. Tipična zlatno žuta boja tumora objašnjava se prisutnošću citoplazmatskih lipida i glikogena. Te citoplazmatske komponente tijekom kemijske obrade histoloških preparata postaju vidljive kao tipična svjetla citoplazma. Svijetle stanice često su pomiješane sa stanicama eozinofilnih citoplazmi. Jezgre mogu biti različitih veličina i oblika ovisno o nuklearnom gradusu tumora (podjela po Fuhrmanu u 4 gradusa), koji predstavlja i prognostički čimbenik. Arhitektura stanica može biti acinarna, tubularna, cistična ili solidna, s malo strome, ali uz obilnu vaskularizaciju <sup>(38-41)</sup>. / SLIKA 1 /

### B) Papilarni (ili kromofilni) RCC

Javlja se u 10-15% RCC. Papilarni karcinom mora biti veći od 0,5 cm, obzirom da ga inače nije moguće razlikovati od papilarnog kortikalnog adenoma. Makroskopski uobičajeno je dobro ograničen od okoline tankom pseudokapsulom, periferno smješten prema polovima bubrega, ograničen korteksom. Na presjeku je žute do brončane boje. Intratumorska hemoragija i nekroza čest su nalaz. U odnosu na RCC češće je multifokalan (39%), bilateralan (4%) te udružen s kortikalnim adenomom <sup>(39,42)</sup>.

Patohistološka dijagnoza temelji se na predominantnoj papilarnoj i tubulopapilarnoj arhitekturi, bez svijetlih stanica <sup>(42)</sup>. Papile imaju tanki fibrovaskularni centar pokriven s jednim slojem tumorskih stanica. Prema stanicama koje prekrivaju papile papilarni RCC dijeli se u 2 tipa: Tip 1 - male stanice, s blijedom, svjetlom citoplazmom, malim jezgrama i neupadljivim nukleolima; Tip 2 - stanice su veće, eozinofilne, s većim jezgrama i izraženijim nukleolima (po Fuhrmanu – viši gradus). Kao prognostički čimbenik to je značajan histološki podatak u dijagnozi, obzirom da Tip 2 tumori imaju lošiju prognozu <sup>(43)</sup>. / SLIKA 2 /

### C) Kromofobni RCC

Njihova učestalost je oko 5% u ukupnom broju RCC. Najčešće su jednostrani, makroskopski svjetlo smeđe boje, ponekad sivi ili žuti, često bez nekroze ili hemoragije <sup>(38,39)</sup>. Mikroskopski su solidne arhitekture, s mnoštvom malih krvnih žila. Stanice variraju u veličini, s najčešće blijedom eozinofilnom citoplazmom, prikazujući se kao

priljubljene stanice ili s granuliranom citoplazmom (brojni mitohondriji) i s dobro izraženom staničnom membranom <sup>(38,39)</sup>.

Kromofobni RCC mora se razlikovati od onkocitoma obzirom na isto porijeklo. Diferencijalna dijagnoza temelji se na morfološkim kriterijima tzv. jake koloidalne obojenosti željezom. Ovom tehnikom stanice kromofobnog RCC su jako i difuzno obojene, za razliku od apikalne citoplazmatske obojenosti onkocitoma. / SLIKA 3 /

#### D) Karcinom sabirnih kanalića (Bellinijev tumor)

Ovaj rijetki oblik RCC (do 1%) izuzetno je agresivan, uz vrlo lošu prognozu. Veličinom je manji od ostalih oblika RCC (prosjeak je 5 cm). Najčešće je lokaliziran u meduli uz širenje prema kanalnom sustavu, te prodorom ka korteksu. Makroskopski je bijelo-siv, ponekad cističan, uz odsustvo nekroze ili hemoragije <sup>(38,39)</sup>. Mikroskopski se sastoji od tubularnih struktura, manje ili više proširenih, složenih u jednom redu velikih eozinofilnih stanica, s većom jezgrom uz tipičnu sliku čavla s velikom glavom <sup>(45)</sup>.

/ SLIKA 4 /

#### D) Neklasificirani RCC

Ova grupa čini oko 4-5% RCC, a nju sačinjavaju tumori koji po svojim karakteristikama ne odgovaraju ranije navedenima.

#### E) Ostali češći dobroćudni tumori bubrega

1. Onkocitom je epitelni tumor koji potpada u grupu dobroćudnih tumora. Čini oko 2-5% novotvorina na bubregu. U više od 95% bolesnika nalazi se unilateralno i dobro je ograničen <sup>(38,39)</sup>.

2. Angiomiolipom je mezenhimalni benigni tumor koji čini 0,5-2% tumora bubrega, češći je u žena, često je bilateralan, uz mogućnost nepredviđenog rasta <sup>(38)</sup>.

#### F) Rijetki primarni tumori bubrega

1. Epitelni tumori: jukstaklomerularni tumori i metanefrički adenom,

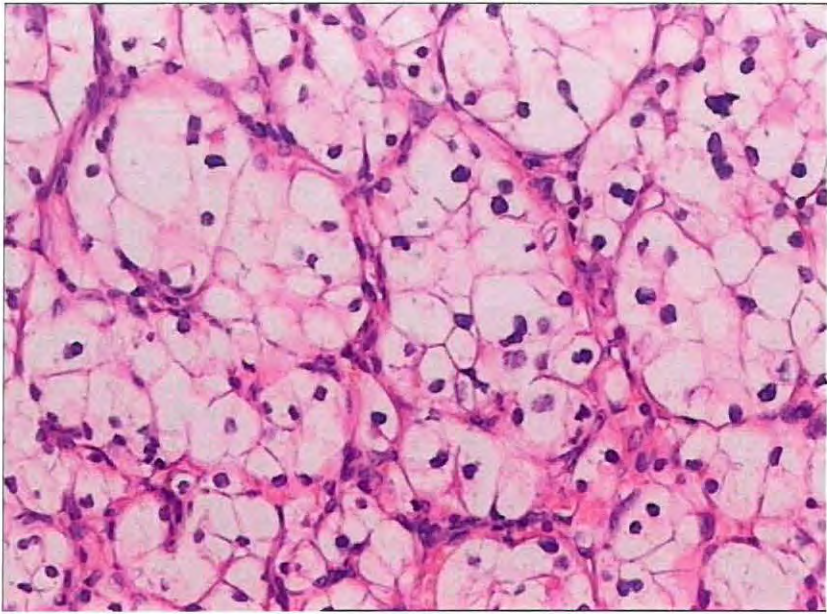
2. Neepitelni tumori:

- benigni mezenhimalni tumori (leomiom, pilom, hemangiom, limfangiom),
- maligni mezenhimalni tumori,

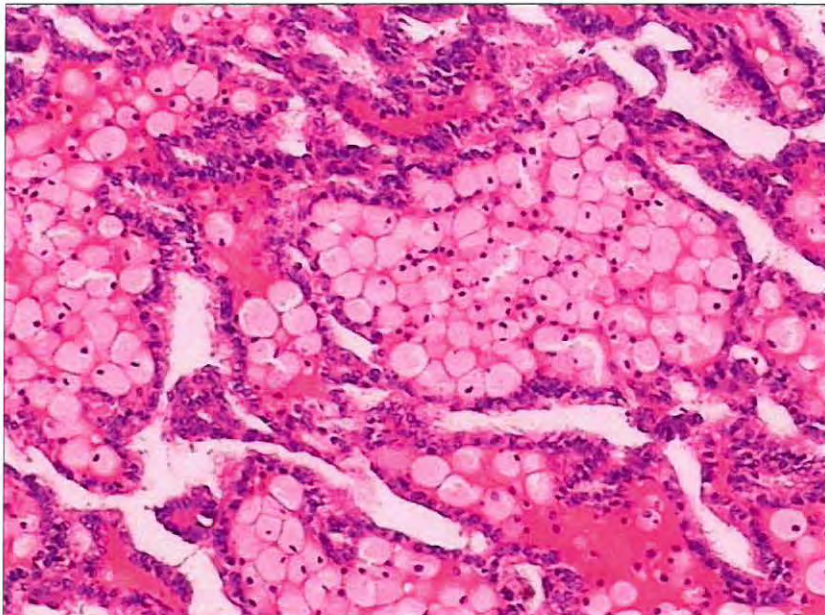
3. Limfomi,

4. Blastemalni tumori: a) mezoblastični nefrom, b) adultni nefroblastom i

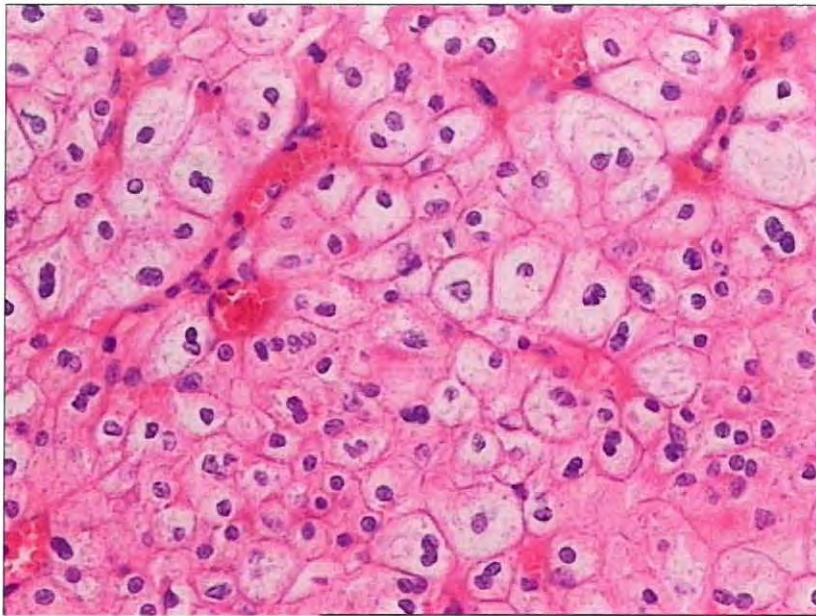
5. Neuroendokrini tumori



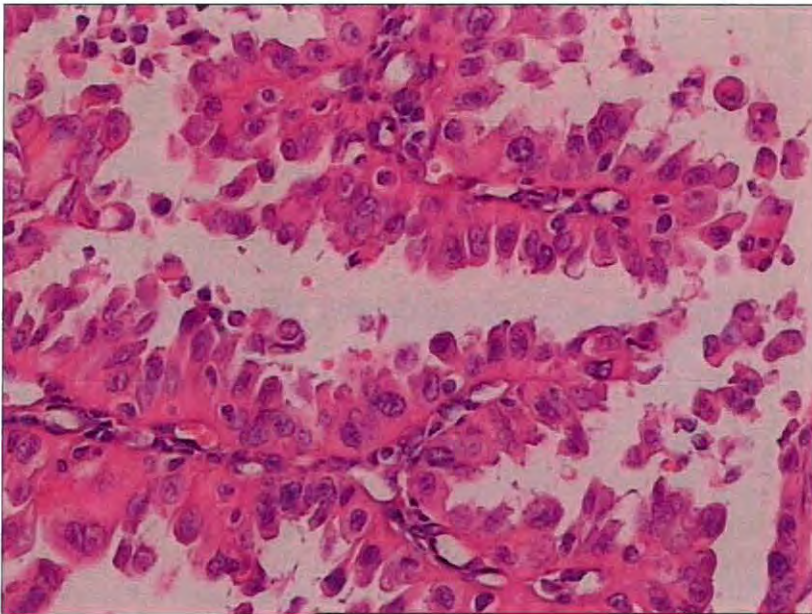
SLIKA 1. Karcinom svijetlih stanica. Vidi se alveolarni raspored stanica izrazito svijetle citoplazme.



SLIKA 2. Papilarni karcinom bubrega. Vidi se tubulopapilarna struktura s nakupinama sačastih makrofaga u stromi papila. Papile su obložene malim stanicama citoplazme raspoređenim u jednom sloju na papilarnu bazalnu membranu.



SLIKA 3. Kromofobni karcinom bubrega. Klasična varijanta ovog tipa tumora prikazuje solidna područja velikih stanica s prosvjetljenjem citoplazme centralno i prominentnim staničnim membranama. Neke od stanica su binuklearne.



SLIKA 4. Karcinom sabirnih kanalića (Bellini tumor). Tubulopapilarna arhitektura karakteristična je za ovaj tumor. Papile su obložene atipičnim epitelom koji pokazuje visoku citološku atipiju i "hob-nailing" fenomen.

## 1.8. Patohistološki prognostički čimbenici

- **Stadij**

Stadij se određuje po TNM (tumor-node-metastasis) i p TNM (pathological tumor-node-metastasis) klasifikaciji <sup>(46,49)</sup>.

### *TNM klasifikacija* <sup>(46)</sup>:

#### T: Primarni tumor

Tx/pTx: primarni tumor nije nađen

TO/pTO: bez znakova primarnog tumora

T1/pT1: tumor veličine do 7 cm, ograničen na bubreg

T1a/pT1a: tumor veličine do 4 cm, ograničen na bubreg

T1b/pT1b: tumor veći od 4 cm, ali manji od 7 cm, ograničen na bubreg

T2/pT2: tumor veći od 7 cm, ograničen na bubreg

T3/pT3: tumor proširen u glavnu venu (vene) ili zahvaća nadbubrežnu žlijezdu ili perinefritičko tkivo ne prelazivši Gerotinu kapsulu

T3a/pT3a: tumor zahvaća nadbubrežnu žlijezdu ili perinefritičko tkivo, ali ne izvan Gerotine kapsule,

T3b/pT3b: tumor se širi u renalnu venu (vene) ili donju šuplju venu ispod ošita,

T3c/pT3c: tumor se nalazi unutar donje šuplje vene iznad ošita

T4/pT4: tumor prodire izvan Gerotine kapsule

#### N: regionalni limfni čvorovi (hilarni, abdominalni paraaortalni i parakavalni čvorovi)

Nx: regionalni čvorovi se ne nalaze

NO: bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima



N1: metastaza u jednom regionalnom limfnom čvoru

N2: metastaze u više od jednom regionalnom limfnom čvoru

M: udaljene metastaze

MX: udaljene metastaze se ne nalaze

MO: bez udaljenih metastaza

M1: prisutne udaljene metastaze

• **Nuklearni gradus**

U klasifikaciji nuklearnog gradusa koristi se Fuhrmanova 4-stupanjska podjela<sup>(47)</sup> koja se temelji na: veličini jezgre, iregularnosti, nukleolarnoj prominenciji ili prisustvu neobičnih multilobularnih jezgara i grubo grudastog kromatina:

1. STUPANJ: male (do 10  $\mu\text{m}$ ), okrugle, pravilne jezgre s nezamjetnim nukleolima,

2. STUPANJ: jezgre srednje veličine (oko 15 $\mu\text{m}$ ), s nepravilnim rubovima i mali nukleoli (vidljiv pod x400 povećanjem),

3. STUPANJ: velike (oko 20  $\mu\text{m}$ ) jezgre s izraženo nepravilnim rubovima i istaknutim nukleolima,

4. STUPANJ: jezgre veličinom kao u trećem stupnju uz bizarne, često multilobularne oblike s grubo grudastog kromatinom.

• **Histološki tip**

Dokazan je porast agresivnosti RCC prema tipu stanica sa sljedećim redoslijedom :

1. Kromofobni RCC (najslabija agresivnost),
2. Papilarni RCC,

3. RCC svjetlih stanica i
4. RCC sabirnih kanalića (najjača agresivnost) <sup>(36,41,48)</sup> .

- **Mikrovaskularna invazija**

Ovaj prognostički čimbenik koji korelira s progresivnošću tumora nije se pokazao neovisnim čimbenikom <sup>(50-53)</sup> , dok se uloga angiogeneze (broja malih krvnih žila) unutar intratumoralne cirkulacije i dalje ispituje, što je i predmet ovog istraživanja.

### **1.9. Ostali prognostički čimbenici u RCC**

Osim ranije navedenih, u literaturi se navode i slijedeći prognostički čimbenici vezani uz tumor:

- DNA ploidiya (DNA citometrijom je moguće odrediti količinu DNA u tumorskim stanicama, te identificirati tumore s diploidnim odnosno aneuploidnim staničnim sastavom). Aneuploidni tumori mogu biti povezani sa slabijim preživljenjem,
- AgNOR (srebrom obojene nukleolarne organizacijske regije) <sup>(54,55)</sup> ,
- PCNA (antigen proliferacije staničnih jezgara) kojega povišena razina može značiti slabiju prognozu <sup>(55)</sup> ,
- p105 <sup>(54)</sup> ,
- mitotski indeks koji je povišen u agresivnijih oblika tumora <sup>(55)</sup> ,
- Ki67 (MIB-1) je jezgrin antigen povezan uz proliferaciju i prisutan je u svim fazama umnožavanja ljudskih stanica. U radovima se opisuje njegov značaj kao izdvojenog prognostičkog čimbenika <sup>(56)</sup> ,

- stanična morfometrija, koja se temelji na hipotezi o veličini jezgre kao parametru veće količine DNA , povezana je sa stupnjem i gradusom tumora (57) ,
- p53 je tumor supresorski gen koji se nalazi na kromosomu 17p i uključen je u „popravak“ DNA. Mutacijom se povećava njegov broj, zbog produžavanja poluživota, te iako se pokazao mogućim prognostičkim čimbenikom u mnogih tumora kod RCC to nije slučaj (56,58) ,
- Bcl-2, mdm-2, c-myc i ras onkogeni - ispitivana prognostička vrijednost nije dala značajnijih rezultata,
- faktori rasta EGFR (receptor epidermalnog faktora rasta) i alfa TGF (faktor tumorskog rasta) povezani su s nuklearnim gradusom.

Od čimbenika vezanih uz bolesnika izdvajaju se:

- vrijeme otkrivanja bolesti (s novim „imaging“ metodama broj slučajnih nalaza dosegao je u pojedinim studijama i 60%),
- laboratorijski nalazi krvi (pad hemoglobina, trombocitoza, povišena alkalna fosfataza, gama GT, interleukin 6 , CA 125, eritropoetin) (18) ,
- nasljedne bolesti, naročito Von Hippel-Lindau-ova (16) .

Čimbenici vezani uz tip liječenja:

- radikalna nefrektomija je i dalje „zlatni standard“, iako je uloga adrenalektomije i limfadenektomije kontroverzna,
- radikalna operacija uz adjuvantnu imunoterapiju kod uznapredovale bolesti pokazala se boljim prognostičkim čimbenikom od imunoterapije same <sup>(16,18)</sup>.

#### **1.10. „Imaging“ metode u prikazivanju karcinoma bubrežnih stanica**

Tijekom proteklih desetljeća razvoj urološke/radiološke dijagnostike umnogome je doprinio u pronalaženju novotvorina organa genitourinarnog sustava, pa tako i RCC-a. Ranijih godina radiološko prikazivanje RCC temeljilo se na nalazima intravenske urografije i angiografije.

Ultrazvuk (UZ) je od uvođenja 60-ih, a naročito 80-ih godina prošlog stoljeća donio revoluciju u kvaliteti i točnosti prikaza, te odigrao glavnu ulogu u ranom otkrivanju tumora. Danas je poznato da se više od 80% slučajnih nalaza RCC temelji na ultrazvučnom prikazu. Ograničavajući čimbenici kod ultrazvučnog pregleda su veličina tumora (kod onih manjih od 3 cm osjetljivost je ispod 80%, dok je 1,5 cm smatra najmanjom realnom veličinom za detekciju) i njegovi odjeci (ehogenost) koji mogu varirati od hiper, izo do hipoehogenih pri čemu se prikaz izoehogenih tumora ponekad ne uspije odvojiti od okolnog tkiva. Uvođenjem Dopplera, Power-Doplera i kontrasta uvelike se poboljšala ultrazvučna vizualizacija patološkog tkiva. Dodatnu ulogu ultrazvuk (sa i bez Dopplera) ima i tijekom pošteđenih operacija tumora (parcijalne resekcije, enukleacije), pri čemu može pomoći u razgraničenju normalnog od patološkog tkiva i žilja. Osim prikaza same novotvorine, ultrazvukom se

prijeoperacijski vizualizira i okolne organe i krvne žile zbog mogućeg pronalaska širenja tumora, te time i određivanja stadij tumora. Naravno, ultrazvuk nam služi i pri uzimanju perkutanih bioptata i aspirata tankom iglom („fine needle aspiration biopsy“) u nejasnih formacija <sup>(60-62)</sup>.

Kompjuterizirana tomografija (CT) s kontrastom pokazala je veću točnost nalaza u odnosu na UZ (90% :75%), naročito pri tumorima manjim od 1,5 cm. Uvođenjem, tzv. „multislice“ CT-a kvaliteta prikaza se kroz sve manje debljine presjeka pokazala metodom izbora u preoperacijskoj procjeni stadija bolesti, obzirom da je uporabom kontrasta i trodimenzionalne slike moguće dobiti vrlo detaljan i siguran prikaz.

Temeljni nedostaci CT-a su u količini iradijacije, te mogućim alergijskim reakcijama na kontrastna sredstva <sup>(60,61)</sup>.

Magnetska rezonancija (MR) se koristi kao nadopuna nejasnim UZ ili CT nalazima, kao i kod bolesnika osjetljivim na jodne kontraste, obzirom da na MR kontrastno sredstvo (gadoliniumski helat) nije dokazana alergija. Točnost nalaza je približna onoj na CT-u <sup>(60-61)</sup>.

### **1.11. Operacijsko liječenje**

**Radikalna nefrektomija** i dalje je „zlatni standard“ u terapiji RCC. Ona sadržava: nefrektomiju bubrega zajedno sa Gerotinom kapsulom, istostranu adrenalektomiju, te regionalnu limfadenektomiju. Operacija se može učiniti otvorenim, „klasičnim“, putem (lumbotomijom ili transabdominalno) ili laparoskopski, što danas postaje rutinska metoda. Naravno da unutar ponuđenih metoda postoje i varijacije. Naime, studije su pokazale sa kod tumora smještenih u donjem polu bubrega adrenalektomija

nije potrebna, a regionalna limfadenektomija koliko je bila korisna u procjeni stadija bolesti, toliko se nije pokazala značajnom za bolju prognozu. Tehnike ovise o stavovima unutar ustanova <sup>(63-67)</sup>.

**Parcijalna nefrektomija** (enukleacija, segmentalna nefrektomija ili heminefrektomija) ili tzv. poštedna nefrektomija („nephron sparing surgery“) ima slijedeće indikacije:

- apsolutne: tumor na solitarnom bubregu, agenezija bubrega, ranije operacije ili trauma bubrega, obostrani tumor bubrega, multifokalni tumori u bolesnika s obiteljskim RCC (von Hippel-Lindau),
- relativne: tumor kod stenozе renalne arterije na kontralateralnom bubregu, hidronefroza, učestali pijelonefritisi, učestale kalkuloze, dijabetes, nefroskleroza, stenozа pijelo-ureteričnog vrata kontralateralnog bubrega,
- elektivne: slučajni nalaz tumora manjeg od 4 cm, uredan kontralateralni bubreg ili mlad i u drugim segmentima zdrav bolesnik <sup>(63,68)</sup>.

I ovaj tip operacije se izvodi otvorenim ili laparoskopskim putem. Ona sa sobom donosi i određene rizike vezane uz prognozu bolesti. Oni se u prvom redu odnose na moguću multifokalnost RCC-a (4-25%) i nepogodan položaj tumora (mezorenalno, blizina hilusa)<sup>(68)</sup>.

Odluke o parcijalnoj nefrektomiji su, iako standardizirane, uvijek individualne, shodno statusu bolesnika, te učinjenim „imaging“ pretragama.

## Operacije kod uznapredovanog RCC

U ovom slučaju postoje čimbenici koji govore za i protiv operacije:

Tablica 2. Prikaz stavova o operaciji kod uznapredovanog karcinoma bubrežnih stanica <sup>(70)</sup>

<b>ZA</b>	<b>PROTIV</b>
Prevenција komplikacija (krvarenje, bolovi) Moguće spontano smanjenje metastaza Otklanjanje uzroka novim metastazama Smanjenje tumorske mase zbog boljeg djelovanja dodatne terapije Kvaliteta života	Postoje druge metode (embolizacija, zračenje) Bespotrebnost (gubljenje vremena) Opasnost (perioperativni morbiditet i mortalitet) Ne produžuje se preživljavanje Može oslabiti imunološki sustav Kvaliteta života

Iako dileme postoje, naročito obzirom na preživljavanje i kvalitetu života, u bolesnika s metastatskom bolesti preostaju sljedeće mogućnosti: nefrektomija s ili bez uklanjanja metastaza, smanjivanje tumorske mase nakon koje slijedi imunoterapija, inicijalna imunoterapija uz nefrektomiju u slučaju primjerenog odgovora ili samo imunoterapija. Pokazalo sa da istovremeno korištenje više načina liječenja usporava progresiju bolesti i produžava preživljavanje <sup>(69,70)</sup>.

### **1.12. *Medikamentozna terapija kod metastatskog karcinoma bubrežnih stanica***

U gotovo četvrtine bolesnika s RCC prisutne su metastaze, a u petine su i nakon radikalne nefrektomije mogući lokalni recidivi. Obzirom na poznatu otpornost RCC na zračenje u liječenju metastatskog RCC koristi se:

- hormonalna terapija (medroksiprogesteron),

- kemoterapija (vinblastine, carboplatin, 5-fluorouracil, gemcitabin, doxetaxel, retinoidi...)
- imunoterapija (interferon alfa, beta i gama, interleukin-2, te njihove kombinacije bez ili s kemoterapeutikom, najčešće 5-fluorouracilom).

Ukupno jednogodišnje preživljavanje je u prosjeku do 20%, a dvogodišnje 5-10% <sup>(71-74)</sup> .

- inhibitori angiogeneze, odnosno njihovih čimbenika u fazi su ispitivanja i eksperimentalno donose dobre rezultate <sup>(72)</sup> .



### 1.13. Postoperacijsko praćenje

Po preporukama Europske urološke asocijacije (EAU) shema praćenja bolesnika operiranih zbog RCC je slijedeća <sup>(75)</sup>:

STADIJ	PREGLEDI	PRETRAGE	MOGUĆE DODATNE PRETRAGE	RAZLOZI PRETRAGA
Svi T	4-6 tjedana nakon operacije	Klinički pregled  Kreatinin  HB	Alkalna fosfataza	Isključiti postoperacijske komplikacije  Utvrđiti funkciju preostalog bubrega  Provjeriti oporavak od peri ili postoperacijskog gubitka krvi
T1 i T2	Svakih 6 mjeseci tijekom prve 3 godine  Svake godine od 3-5. godine	Klinički pregled  RTG snimka pluća	Ultrazvučni ili CT pregled bubrega	Isključiti komplikacije operacije, ili prisustvo lokalnog recidiva ili metastaza u limfnim čvorovima  Isključiti metastaze na plućima ili lokalni recidiv nakon parcijalne nefrektomije
T3 i T4	Svakih 6 mjeseci u prve 3 godine  Svake godine od 3-10. godine	Klinički pregled  RTG snimka pluća  Ultrazvuk ili CT retroperitoneuma		Isključiti komplikacije operacije, ili prisustvo lokalnog recidiva ili metastaza u limfnim čvorovima  Isključiti metastaze na plućima ili lokalni recidiv nakon parcijalne nefrektomije  Prikazati mogući lokalni recidiv ili kontralateralnu metastazu

## **1.14. Tumorska angiogeneza i čimbenik proliferacije Ki-67**

### **1.14.1. Tumorska angiogeneza**

Angiogeneza, stvaranje novih kapilara iz postojećih krvnih žila, ključna je stepenica u razvoju tumora <sup>(76)</sup>, a slijed je nekoliko kaskadnih zbivanja: a) dezintegracije bazalne membrane krvnih žila, najčešće na nivou postkapilarnih venula, b) migracije endotelnih stanica u tumor, c) proliferacije endotelnih stanica pri kraju migracije, d) kanaliziranja, grananja i stvaranja vaskularnih petlji i e) formiranja nove bazalne membrane. Dakle, angiogeneza uvijek počinje na nivou postojećih kapilara i venula, a nikad iz arterija, arteriola ili vena. Ostale promjene u građi krvnih žila uključuju ubrzanu arteriolizaciju unutar koje glatki mišići oblažu novostvorene arterije <sup>(77)</sup>.

Endotelne stanice koje su probile bazalnu membranu postojećih kapilara ili venula ulaze u tumorsku stromu, stvaraju vaskularni tračak, proliferiraju, te se diferenciraju. Vaskularni tračci počinju stvarati bazalnu membranu nove kapilare uz prisutnost cirkulacije krvi.

Angiogeneza je zbivanje koje se, osim u rastu tumora, događa i u različitim drugim stanjima, kao što su razvoj embrija, kronične upale, zarašćivanje rana, reumatoidni artritis, psorijaza i dr. <sup>(78)</sup>.

Angiogeneza je proces koji ovisi o međusobnom nadmetanju faktora rasta i proangiogenih citokina s jedne strane, te inhibitora neovaskularizacije s druge strane <sup>(77,79)</sup>.

Mnogi uzročnici stimuliraju angiogenezu, a najvažniji su: vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), placentarni faktor rasta (PLGF), angiogenin, temeljni fibroblastni faktor rasta (BFGF), heparinaza, timidin-fosforilaza i somatostatin <sup>(80)</sup>.

U angiogenezi kod karcinoma bubrežnih stanica (RCC) najčešće opisivani pokretač je VEGF. To je stanični endotelni citokin koji se stvara i oslobađa iz stanice RCC, te pokreće tumorsku angiogenezu na nivou mikrovaskularnog spleta. Djeluje selektivno i direktno na endotelne stanice vaskularnog stabla putem dvaju receptora za tirozin-kinazu klase III (flt-1 i KDR), povećavajući propusnost mikrovaskularnog spleta za cirkulirajuće makromolekule. Jedan je od najjačih čimbenika propusnosti, uz djelovanje pri koncentraciji manjoj od 1 nmol/l.

Povećana propusnost mikrovaskularnog spleta nastaje pojačavanjem aktivnosti tzv. vezikulo-vakuolarnih organela koje tada dopuštaju prolaz proteinima plazme u tumorsko tkivo. Proteini u početnoj fazi tvore privremeni ekstraluminalni matriks u tumorskoj stromi što omogućava nastavak migracije endotelnih stanica iz kojih nastaju nove krvne žile.

U tumorskom tkivu VEGF je prisutan u većoj mjeri unutar mRNA i proteina. Također se pokazala njegova pojačana prisutnost u duktalnim karcinomima dojki i prije znakova tumorskog prodora <sup>(81,83,84)</sup>. U nastanku tumorskih metastaza proces angiogeneze isti je kao i ranije opisan. <sup>(77,84)</sup>.

Istraživanja <sup>(77,80)</sup> upućuju na potrebu za daljnjim naporima u otkrivanju karakteristika medijatora angiogeneze. Do sada otkriveni prirodni antiangiogenetski čimbenici (angiostatin, trombocitni faktor 4, prolaktinski fragmenti, trombospondin-1, inhibitori proteinaze TIMP-1 ...) dobivaju svoje efikasnije sintetske analoge poput TNP-470 <sup>(82)</sup>, koji su se "in vitro" i u nehumanim živim eksperimentima pokazali kao efikasan lijek u zaustavljanju tumorskog rasta.

### 1.14.2. Čimbenik proliferacije Ki-67

Ki-67 je nuklearni antigen koji se nalazi u stanicama koje proliferiraju. Gen, molekulske težine 35-40 kiloDaltona, nalazi se na 10. kromosomu. Iako mu prava uloga nije do kraja poznata zna se da sudjeluje u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1,S,G2,M), te je pogodan kao biljeg određivanja proliferacije tumorskih stanica. Tijekom staničnog ciklusa lokalizacija antigena unutar jezgre se mijenja. Fosforilacijom u mitozu dolazi do kondenzacije kromosoma i odvajanja sestrinske kromatide. Defosforilacijom se oslobađaju od kondenziranih kromosoma stvarajući perikromosomalne ovojnice. Ovaj slijed upućuje da Ki-67 sudjeluje reformaciji i dezintegraciji nukleola. Istovremeno sudjeluje i u transportu ciklina B iz citoplazme u jezgru što dodatno izaziva raspad nukleola. Kao prognostički čimbenik ima svoje značenje te je u imunohistokemijskim studijama prikazano kako ekspresija pozitivne proteinske frakcije Ki-67 korelira s povišenjem gradusa tumora bubrega, dok je u dobroćudnih cista nesigifikantna. <sup>(85,86)</sup> .

Novija istraživanja upućuju na mogućnost inhibiranja ekspresije Ki-67 gena s oligonukleotidima izazivajući apoptozu <sup>(87)</sup> .

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na početku istraživanja postavljeni su slijedeći ciljevi:

- odrediti kliničke parametre karcinoma bubrežnih stanica (RCC),
- procijeniti značaj angiogeneze unutar karcinoma bubrežnih stanica,
- analizirati medijatore angiogeneze i čimbenike proliferacije,
- usporediti angiogenezu i vrijednosti proliferacijskih čimbenika s kliničkim parametrima i to svaki parameter zasebno,
- usporediti stupanj angiogeneze i vrijednosti proliferacijskih čimbenika u bolesnika s i bez metastaza i
- dokazati korelaciju stupnja angiogeneze i vrijednosti proliferacijskih čimbenika s kliničkim parametrima u cilju uporabe tih metoda u prognostičke svrhe.

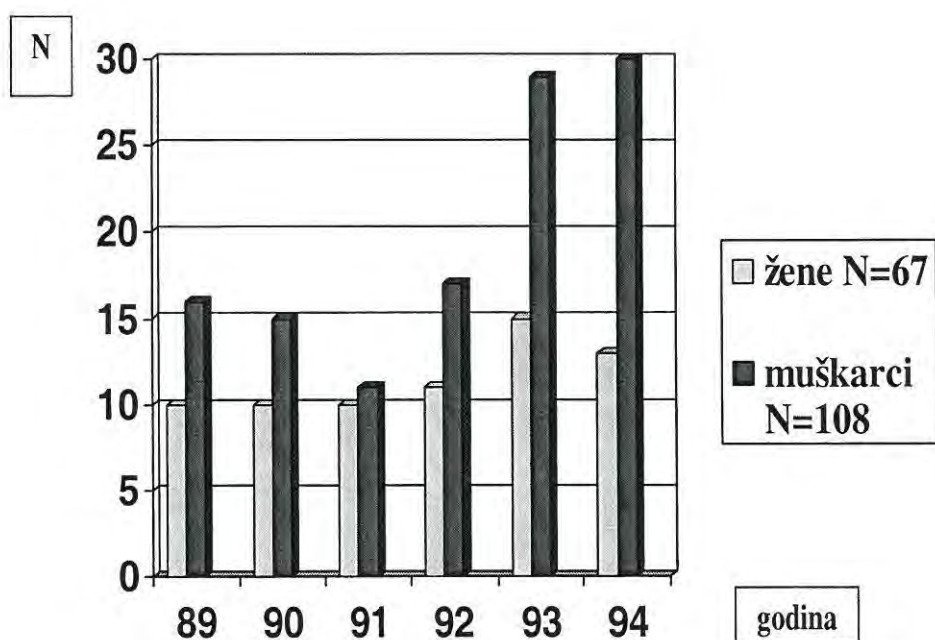
### 3. BOLESNICI I METODE

#### 3.1. Kliničko-patološki podaci

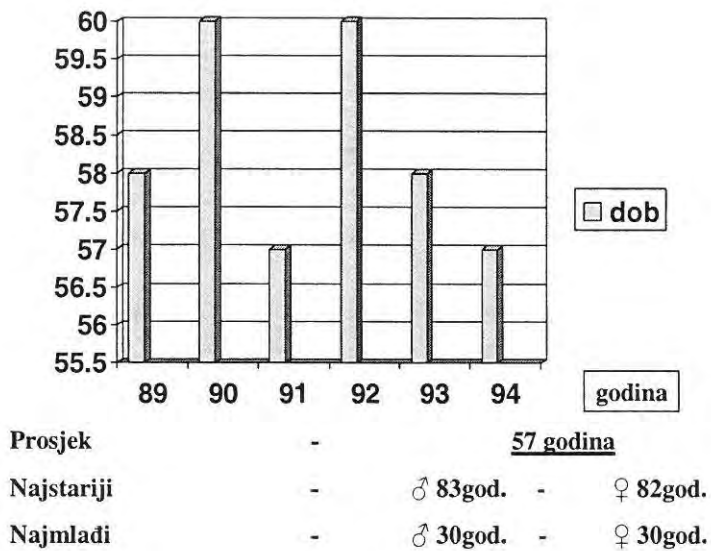
U ovu studiju uključeno je 175 bolesnika u kojih je u razdoblju od 1.1.1989. do 31.12.1994. na Urološkom odjelu Kirurške klinike KBC Rijeka učinjena radikalna nefrektomija zbog tumora bubrega. Nakon postavljene dijagnoze na histološkim preparatima (fiksirani u formalinu i uloženi u parafin), rezovi su pripremljeni za imunohistokemijsku analizu koja je učinjena na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Klasificiranje tumora provedeno je po WHO klasifikaciji karcinoma bubrežnih stanica <sup>(35)</sup>, a stupnjevanje po TNM klasifikaciji, dok je nuklearni gradus određivan po četverostupanjskom modelu Fuhrmana i suradnika <sup>(16)</sup>.

Žena je bilo 67 (38,2%), a muškaraca 108 (61,8%) – (shema 1). Prosječna životna dob bolesnika u trenutku otkrivanja bolesti bila je 57 godina (najstarija žena bila je u dobi od 82, a muškarac od 83 godina, dok su najmlađi bolesnici u oba spola imali 30 godina) – (shema 2). U 90 (51,5%) bolesnika karcinom bubrega otkriven je slučajno (prilikom ultrazvučnog pregleda ili intravenske urografije zbog drugog razloga). Bol je bila prisutna kao inicijalni simptom u 38 (21,8%) bolesnika, hematurija u 16 (9,2%), opća slabost u 12 (6,9%), mršavljenje u 11 (6,2%), febrilitet u 6 (3,4%), a hemoptiza i palpabilna formacija u po jednog (0,5%) bolesnika – (shema 3). Prosječna veličina tumora bila je 6,58 cm (raspon 1,5 -15 cm). U svih bolesnika ultrazvukom je potvrđena ekspanzivna tvorba. Intravenska urografija je učinjena u svih bolesnika (u 34, /19,4%/ kao prva pretraga). U 90 bolesnika (51,5%) nalaz je upućivao na moguću ekspanzivnu formaciju (potisnuće čašica kanalnog sustava ili prodor u iste). Kompjuterizirana tomografija primijenjena je kao dodatna pretraga u 23 (13,1%) bolesnika. Prijeoperacijska embolizacija renalnih

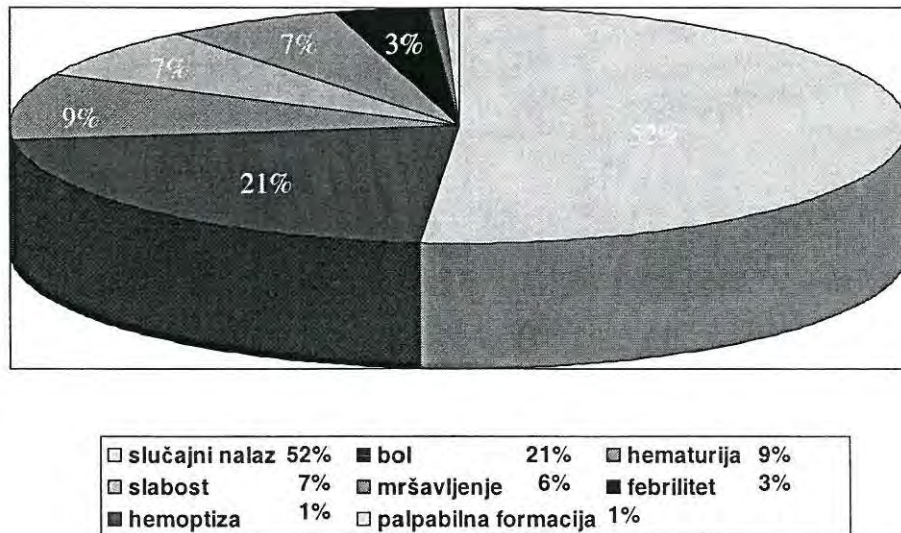
arterija učinjena je u 12 bolesnika (6,8%) – (shema 4). Lokalne ili udaljene metastaze nađene su u 30 (17,1%) bolesnika (13 u regionalnom limfnom čvoru /43,8%, 12 na plućima /40%, 2 u kostima /6,7%, te po jedna na jetri, u mozgu i medijastinumu /3,3%) – (shema 5). Ukupno petogodišnje preživljenje bilo je 66,8% (117 bolesnika) – (shema 6).



Shema 1. Prikaz bolesnika sa rakom bubrežnih stanica prema spolu

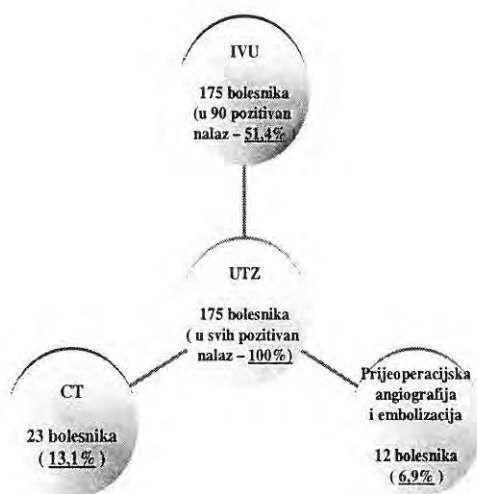


Schema 2. Prosječna dob bolesnika sa rakom bubrežnih stanica

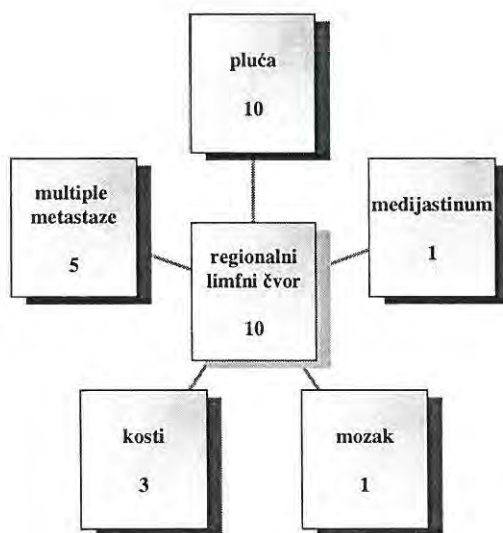


Schema 3. Prikaz simptoma u bolesnika u kojih je otkriven rak bubrežnih stanica

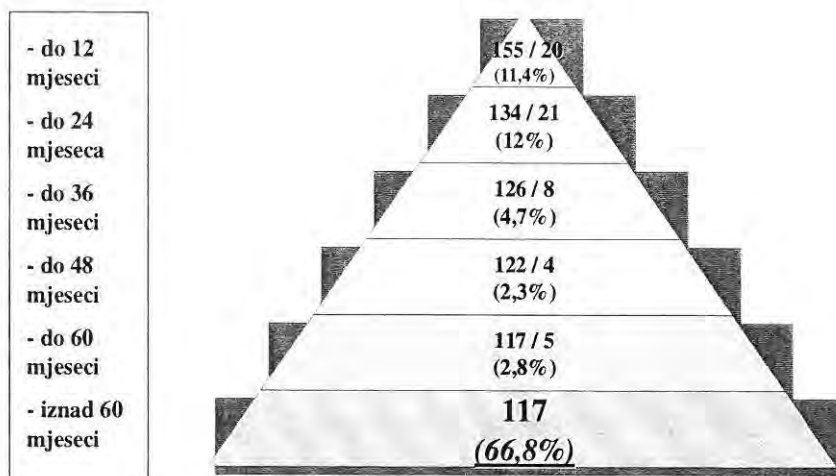




Shema 4. Prikaz učinjenih pretraga u otkrivanju raka bubrežnih stanica (UTZ-ultrazvuk, IVU-intravenozna urografija, CT-kompjuterizirana tomografija)



Shema 5. Prikaz položaja metastaza u bolesnika s rakom bubrežnih stanica



Shema 6. Prikaz petogodišnjeg preživljenja u bolesnika sa rakom bubrežnih stanica (N=175)

### 3.2. Imunohistokemijska analiza

Preparati tumorskog tkiva proslijeđeni su za imunohistokemijsku analizu u cilju određivanja broja krvnih žila (BKŽ) i ekspresije VEGF koristeći standardnu imunoperoksidaza ABC tehniku na parafinskim rezovima.

Krvne žile prikazale su se bojeći endotelne stanice na CD31 antigen (DAKO, klon JC70A, Dakocytomation, Denmark). Kvaliteta obojenja procjenjivana je usporedbom s krvnim žilama u dijelovima normalnog bubrežnog parenhima. Detekcija krvnih žila vršena je pri srednjem povećanju (x 200), kojim su prikazana područja s najvećim brojem žila u tumoru. U svakom tumoru određena su tri područja s najjačom vaskularizacijom ("hot spots"), a nakon toga su se na najvećem povećanju (x 400,) u detektiranim područjima brojile krvne žile. Najveći broj je zabilježen za dalju obradu. Žile s gustim mišićnim slojem ili žile u skleroziranim područjima nisu korištene u analizi. Samostalne

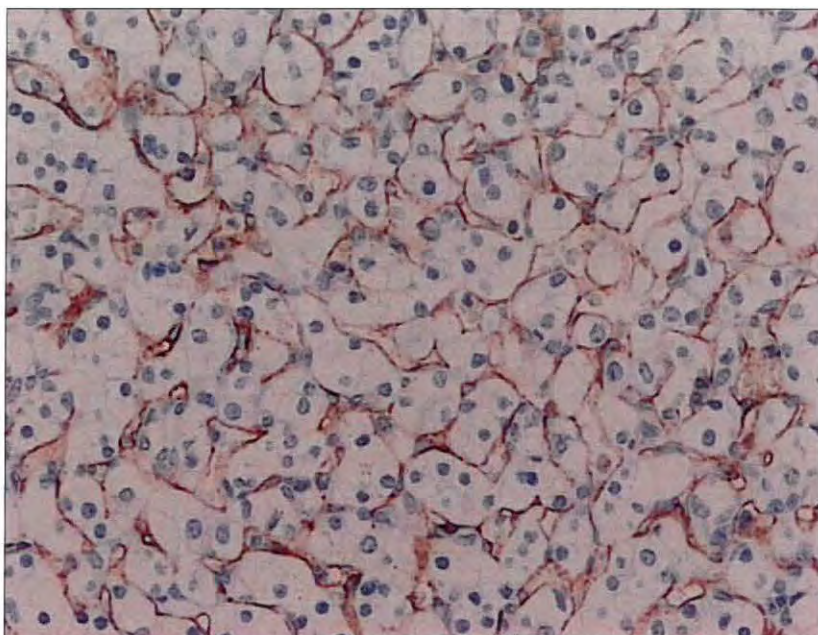
endotelne stanice ili nakupine endotelnih stanica s ili bez lumena brojile su se kao zasebna krvna žila. U područjima neovaskularizacije broj krvnih žila mjeren je kompjuterskim sustavom analize slike ( "ISSA 3.1 software" ). / SLIKE 5 i 6 /

Anti-VEGF poliklonalno antitijelo (PU360-UP, BioGenex) korišteno je za određivanje ekspresije VEGF. Glatko mišićno tkivo unutar krvožilne stjenke korišteno je kao unutarnja pozitivna kontrola. VEGF pozitivitet, dobiven imunohistokemijskim bojenjem, analiziran je na više načina. Semikvantitativno je procijenjen postotak VEGF pozitivnih tumorskih stanica i rezultati su podijeljeni u dvije grupe: 0-75% i 76-100% VEGF pozitivnih stanica. Nadalje, analiziran je intenzitet obojenja, koji je označavan kao slab i srednji/jak. Obojenje s VEGF-om unutar citoplazme označavano je kao difuzno ili perimembranozno, a u tumorskom tkivu kao homogeno ili heterogeno. / SLIKE 7 i 8 /

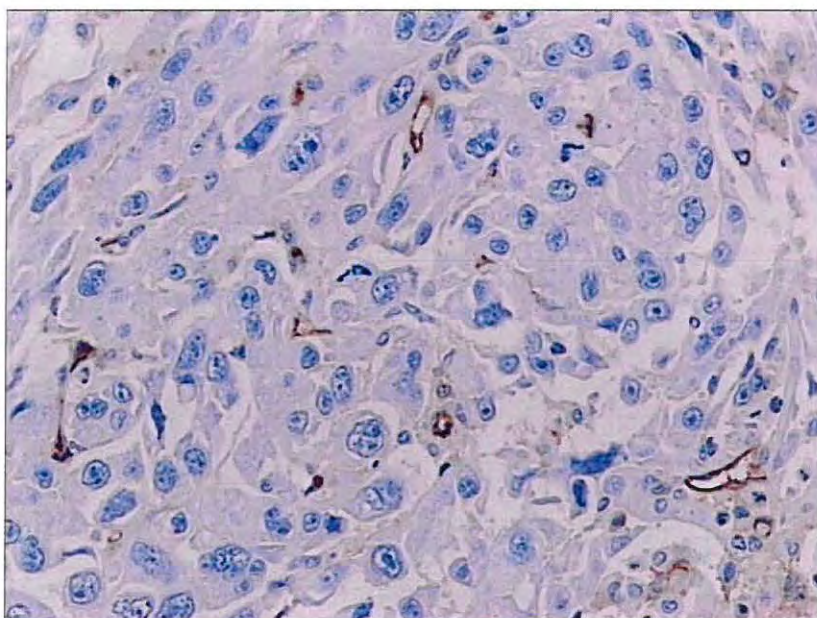
Proliferacija unutar tumora procijenjena je prikazivanjem Ki-67 proteina s monoklonalnim antitijelom MIB-1 (klon MIB-1, DAKO, razrjeđenje 1:50). Imunoreakcija na Ki-67 antigen u jezgrama tumorskih stanica analizirana je koristeći "ISSA 3.1 software" i procijenjena je brojeći 500 tumorskih stanica pri 400x povećanju u područjima najveće proliferacijske aktivnosti.

### 3.3. Statistička obrada

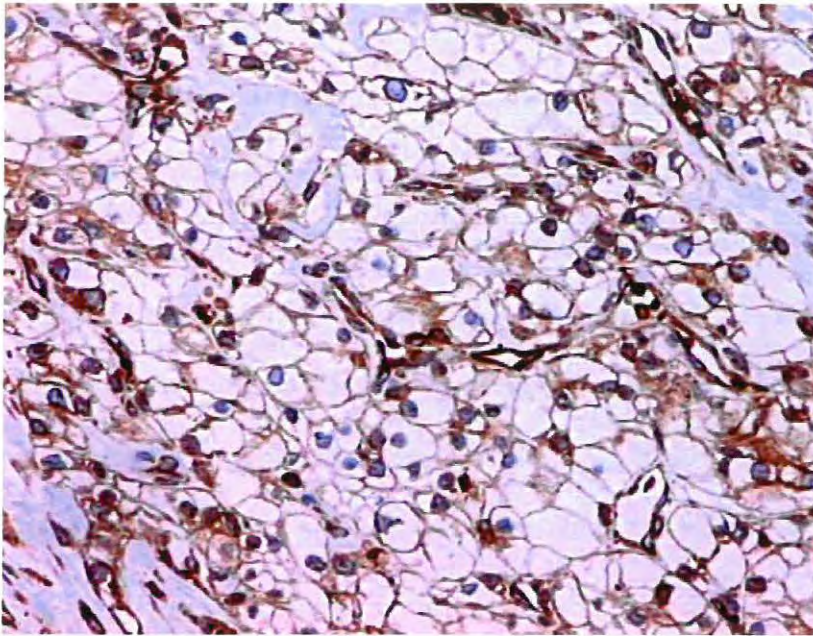
Temelj statističke procjene bila je procjena ekspresije VEGF i vrijednosti broja krvnih žila i njihov odnos prema nuklearnom gradusu, veličini tumora, dobi bolesnika i proliferaciji Ki-67 koristeći Pearsonovu parametrijsku korelaciju. Odnos između VEGF ekspresije i BKŽ procijenjena je Student T testom. Usporedba petogodišnjeg preživljenja s ekspresijom VEGF, Ki67 i BKŽ procijenjena je Coxovom regresijom proporcionalnog rizika. Preživljenje je obrađeno Kaplan-Meier krivuljama.



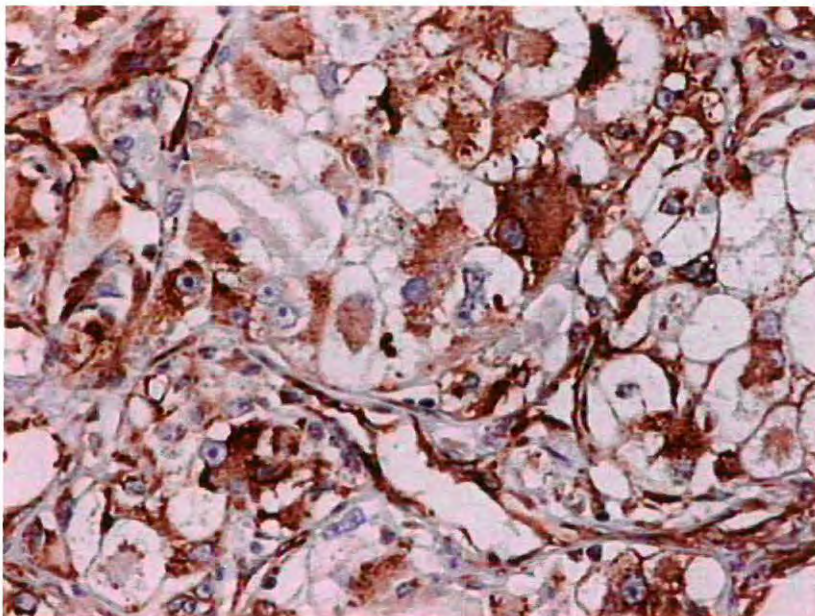
SLIKA 5. Imunohistokemijsko bojenje prikazuje gustu vaskularizaciju u svjetlostaničnom karcinomu niskog nuklearnog gradusa.



SLIKA 6. Karcinom visokog nuklearnog gradusa s oskudnom vaskularizacijom (malim brojem krvnih žila).



SLIKA 7. Citoplazmatska ekspresija VEGF-a. U karcinomu niskog nuklearnog gradusa imunohistokemijsko bojenje pokazuje perimembranozni citoplazmatski raspored.



SLIKA 8. Citoplazmatska ekspresija VEGF-a. U karcinomu visokog nuklearnog gradusa imunohistokemijsko bojenje pokazuje difuzni citoplazmatski raspored.

#### 4. REZULTATI

##### 4. 1. Kliničko-patološke karakteristike tumora bubrežnih stanica

U Tablici 1 prikazani su pojedini histološki tipovi tumora unutar nuklearnih gradusa, pri čemu je vidljivo da svjetlostanični ili konvencionalni tip prevladava u ukupnom broju od 130 (88,43%). Trećina tumora bila je NG1 (34,3%). Karcinomi s NG2 i NG3 prisutni su u približno istom postotku, dok su karcinomi s NG4 bili najmanje zastupljeni (11,9%). Zamjetna je prevaga tumora svijetlih stanica u NG1 i NG2, dok su u NG3 zastupljeni podjednako svi tipovi, a u NG4 prevladavaju konvencionalni karcinomi s miješanim stanicama.

Tablica 1. Podjela histoloških tipova karcinoma bubrežnih stanica unutar nuklearnih gradusa (NG) (N=147)

Tip tumora	Ukupno	NG1 - %	NG2 - %	NG3 - %	NG4 - %
svjetlostanični	N= 130	83,02	94,87	83,56	100
svijetlih stanica	N= 73	71,70	61,53	28,29	/
eozinofilni	N= 22	5,66	12,82	26,32	23,53
miješani	N= 35	5,66	20,52	28,95	76,47
papilarni	N= 13	9,43	5,13	15,78	/
ostali	N= 4	7,55	/	/	/
Ukupno	N= 147	N=53 / 34,3%	N=39 / 27,28%	N=38 / 26,57%	N=17 / 11,89%

U skupini analiziranih karcinoma 32 bolesnika imalo je razvijene metastaze, od toga su u deset bolesnika bile multiple. U Tablici 2 su prikazani tipovi tumora u bolesnika sa metastazama obzirom na nuklearni gradus. U tumorima višeg gradusa (NG 3 i 4)

metastaze su bile prisutne u statistički značajnijem broju ( 65,62% ; p=0,0024) u odnosu na niže graduse. Tumori sa metastazama u većim NG bili su različitih tipova. Multiple metastaze bile su prisutne samo u grupama tumora NG3 i NG4.

Tablica 2. Histološki tipovi karcinoma bubrežnih stanica s metastazama (N=32) obzirom na nuklearni gradus (NG)

Tip tumora	NG 1	NG 2	NG 3	NG 4
svjetlostanični	3	8	10	6
svijetlih stanica	1	7	3	/
eozinofilni	/	/	1	3
miješani	2	1	6	3
papilarni	/	/	4	1
Ukupno	3 / 9,38%	8 / 25%	14 / 43,75%	7 / 21,87%

#### 4. 2. Povezanost VEGF-a s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma bubrežnih stanica

U Tablici 3 je prikazana usporedba dviju grupa, obzirom na postotak VEGF pozitivnih tumorskih stanica, s brojem krvnih žila (BKŽ), veličinom tumora (VT), dobi bolesnika (DB) i ekspresijom Ki67. Statistički je nađena značajna korelacija između dvije grupe u odnosu na broj krvnih žila (p=0,0047) i ekspresiju Ki67 (p=0,0301). Broj krvnih žila je bio značajno veći u tumorima s većim postotkom tumorskih stanica pozitivnih na VEGF, dok je ekspresija Ki67 bila viša u tumora s manjim postotkom VEGF pozitivnih stanica.



Dob i veličina tumora se nisu pokazali statistički značajnim parametrima u odnosu na postotak VEGF pozitivnih tumorskih stanica.

Tablica 3. Postotak pozitivnih VEGF tumorskih stanica u odnosu na broj krvnih žila (BKŽ), veličinu tumora (VT), dob bolesnika (DB) i ekspresiju Ki67 (Student T-test)

	VEGF (0-75%)	VEGF (76-100%)	p
BKŽ	28,83 (N=42)	39,97 (N=66)	0,0047
VT	7,44 cm (N=42)	6,61 cm (N=69)	0,1764
DB	59,51 god. (N=45)	56,47 god. (N=71)	0,1902
Ki67	9,321 (N=32)	6,060 (N=61)	0,0301

Usporedbom dviju grupa s difuznim ili perimembranoznim citoplazmatskim rasporedom VEGF-a u tumorskim stanicama, u odnosu na BKŽ, VT, DB i Ki67 statistički je značajna korelacija nađena s brojem krvnih žila ( $p=0,0002$ ) i veličinom tumora ( $p=0,0335$ ) (Tablica 4). Broj krvnih žila je bio veći u tumorima s perimembranoznim rasporedom VEGF-a, dok su tumori bili veći pri difuznom citoplazmatskom rasporedu VEGF-a. Dob bolesnika i ekspresija Ki67 nisu bili statistički značajno različiti u uspoređivanim grupama.

Tablica 4. Usporedba difuznog i perimembranoznog rasporeda VEGF-a u tumorskim stanicama u odnosu na broj krvnih žila (BKŽ), veličinu tumora (VT), dob bolesnika (DB) i ekspresiju Ki67 (Student T-test)

	VEGF - difuzno	VEGF- perimembranozno	p
BKŽ	32,14 (N=82)	48,34 (N=26)	0,0002
VT	7,33 cm (N=83)	5,85 cm (N=27)	0,0335
DB	57,95 god. (N=87)	55,87 god. (N=28)	0,4298
Ki67	7,66 (N=68)	5,97 (N=24)	0,3063

U Tablici 5 je prikazana usporedba dviju grupa, s homogenom i heterogenom raspodjelom VEGF-a u tumorskom tkivu, u odnosu na BKŽ, VT, DB i ekspresiju Ki67. Statistički značajna korelacija nađena je između dviju grupa rasporeda VEGF s ekspresijom Ki67, uz veću ekspresiju u tumorima s heterogenom raspodjelom VEGF-a. Broj krvnih žila, dob bolesnika i veličina tumora nisu imali statistički značajnu razliku između uspoređivanih grupa.

Tablica 5. Homogena i heterogena ekspresija VEGF-a u tumorima u odnosu na broj krvnih žila (BKŽ), veličinu tumora (VT), dob bolesnika (DB) i ekspresiju Ki67 (Student T-test)

	VEGF- homogeno	VEGF- heterogeno	p
BKŽ	40,73 (N=34)	33,50 (N=73)	0,0856
VT	6,84 cm (N=32)	6,93 cm (N=78)	0,8862
DB	57,72 god. (N=36)	57,41 god. (N=78)	0,8991
Ki67	3,943 (N=23)	8,226 (N=68)	0,0101

U Tablici 6 je prikazana usporedba dviju grupa intenziteta VEGF-a, slab i jak, sa BKŽ, VT, DB i ekspresijom Ki67. Niti jedan od parametara nije pokazao statističku značajnost.

Tablica 6. Intenzitet VEGF-a u tumorskim stanicama u odnosu na broj krvnih žila (BKŽ), veličinu tumora (VT), dob bolesnika (DB) i ekspresiju Ki67 (Student T-test)

	VEGF - slab	VEGF - jak	p
BKŽ	36,62 (N=53)	35,32 (N=56)	0,0743
VT	6,46 cm (N=50)	7,34 cm (N=61)	0,1472
DB	56,69 god. (N=55)	58,22 god. (N=61)	0,4932
Ki67	5,78 (N=42)	8,28 (N=51)	0,0811

#### 4. 3. Usporedba nuklearnog gradusa u odnosu na kliničko patološke karakteristike karcinoma bubrežnih stanica

Analizom nuklearnog gradusa sa BKŽ, VT, DB i ekspresijom Ki67 nađen je statistički značajan odnos nuklearnog gradusa s veličinom tumora i ekspresijom Ki67 (Tablica 7). Naime, tumori višeg nuklearnog gradusa su bili veći, uz veću ekspresiju Ki67 ( $p=0,0182$  i  $p=0,001$ ). Broj krvnih žila i dob bolesnika nisu imali statistički značajne vrijednosti.

Tablica 7. Analiza nuklearnog gradusa s brojem krvnih žila (BKŽ), veličinom tumora (VT), dobi bolesnika (DB) i ekspresijom Ki67 (Pearsonov test korelacije)

	NG / broj parova	r	p
BKŽ	115	-0,156	0,0964
VT	128	0,209	<u>0,0182</u>
DB	139	0,123	0,1501
Ki67	96	0,466	<u>0,0001</u>

Usporedbom dobi s Ki67 (106 parova- $p_1$ ), brojem krvnih žila (128 parova- $p_2$ ) i veličinom tumora (147 parova- $p_3$ ) nismo dobili statistički značajnu povezanost ( $p_1=0,816$ ,  $p_2=0,557$ ,  $p_3=0,812$ ).

Usporedbom Ki67 s brojem krvnih žila (99 parova- $p_1$ ) i veličinom tumora (104 parova- $p_2$ ) nismo dobili statistički značajnu povezanost ( $p_1=0,122$ ,  $p_2=0,052^*$ ), iako je kod većih tumora zamijećena povećana ekspresija Ki67.

Usporedbom veličine tumora i broja krvnih žila (123 para) nismo dobili statistički značajnu povezanost ( $p=0,221$ ).

U Tablici 8 su uspoređeni NG1 i NG2 u odnosu veličinu tumora, dob bolesnika i ekspresiju Ki67. Veličina tumora, dob bolesnika i ekspresija Ki67 nisu imali statistički značajnu razliku unutar uspoređivanih gradusa.

Tablica 8. Usporedba nuklearnog gradusa 1 i 2 s veličinom tumora (VT), dobi bolesnika (DB) i ekspresijom Ki67 (Student T-test)

	NG 1	NG 2	p
VT	6,04 cm (N=40)	7,11 cm (N=37)	0,0703
DB	56,85 god. (N=49)	56,76 god. (N=39)	0,9721
Ki67	4,23 (N=33)	6,49 (N=24)	0,0903

Tablica 9 prikazuje usporedbu NG1 i NG3 u odnosu na veličinu tumora, dob bolesnika i ekspresiju Ki67. Statistički značajna korelacija nađena je u odnosu nuklearnog gradusa 1 i 3 s ekspresijom Ki67. U NG3 ekspresija Ki67 bila je statistički značajno veća. Za zamijetiti je i gotovo statistički značajnu razliku u većim tumorima i starijoj populaciji bolesnika sa tumorima NG3 (\*).

Tablica 9. Usporedba nuklearnog gradusa 1 i 3 sa veličinom tumora (VT), dobi bolesnika (DB) i ekspresijom Ki67 (Student T-test)

	NG 1	NG 3	p
VT	6,04 cm (N=40)	7,45 cm (N=36)	0,0564 *
DB	56,85 god. (N=49)	61,29 god. (N=37)	0,0612 *
Ki67	4,23 (N=33)	7,68 (N=24)	0,0013

U Tablici 10 su uspoređeni NG1 i NG4 u odnosu na veličinu tumora, dob bolesnika i ekspresiju Ki67. Statistički značajna korelacija nađena je u odnosu nuklearnog gradusa 1 i 4 s veličinom tumora i ekspresijom Ki67. Veći tumori i veća ekspresija Ki67 bila je u tumoru sa NG4. Dob bolesnika nije imala statističku značajnost.

Tablica 10. Usporedba nuklearnog gradusa 1 i 4 s veličinom tumora (VT), dobi bolesnika (DB) i Ki67 (Student T-test)

	NG 1	NG 4	p
VT	6,04 cm (N=40)	7,96 cm (N=15)	<u>0,0300</u>
DB	56,85 god. (N=49)	59,07 god. (N=14)	0,4869
Ki67	4,23 (N=33)	14,24 (N=15)	<u>0,0000</u>

#### 4. 4. Broj krvnih žila u odnosu na kliničko-patološke karakteristike bolesnika s karcinomom bubrežnih stanica

U Tablici 11 se analizira broj krvnih žila sa ekspresijom Ki67, dobi bolesnika i veličinom tumora. Nađena je vrijednost na granici statističke značajnosti BKŽ s veličinom tumora; manji tumori imaju veći BKŽ.

Tablica 11. Analiza broja krvnih žila ( BKŽ ) sa ekspresijom Ki67, dobi bolesnika i veličinom tumora (Pearsonov test korelacije)

	BKŽ/broj parova	r	p
VT	109	0,183	0,0571*
DB	114	-0,021	0,8243
Ki67	91	0,179	0,0896

U Tablici 12 se uspoređuje broj krvnih žila između nuklearnih gradusa. U usporedbi NG1 sa ostalim gradusima statistički značajno manji broj krvnih žila bio je u tumorima NG1 u odnosu na NG 3 i NG4, dok su usporedbe drugih gradusa bile statistički neznačajne

Tablica 12. Usporedba vrijednosti broja krvnih žila (BKŽ) između nuklearnih gradusa (NG)

	BKŽ	p
NG1 (N=38)	24,47	
NG2 (N=33)	33,88	0,0798

	BKŽ	p
NG1 (N=38)	24,47	
NG3 (N=18)	36,69	0,0454

	BKŽ	p
NG1 (N=38)	24,47	
NG4 (N=13)	47,97	0,0066
	BKŽ	p
NG2 (N=33)	33,88	
NG3 (N=18)	36,69	0,7828

	BKŽ	p
NG2 (N=33)	33,88	
NG4 (N=13)	47,69	0,4187

	BKŽ	p
NG3 (N=18)	36,69	
NG4 (N=13)	47,69	0,2567

U Tablici 13 se uspoređuje ekspresija Ki67, veličina tumora i dob bolesnika između tri grupe tumora po broju krvnih žila. Statistički značajna razlika nađena je između 1. i 3. grupe BKŽ-a i između 2. i 3. grupe BKŽ, sa većom ekspresijom u 1. grupi i 2. grupi u odnosu na 3. grupu. U odnosu na veličinu tumora nije nađena statistički značajna razlika

između grupa BKŽ-a, iako su tumori u grupama 1 i 2 bili nešto veći u odnosu na 3.grupu.

Nije nađena statistički značajna razlika između grupa BKŽ-a i dobi bolesnika.

Tablica 13. Usporedba ekspresije Ki67, veličine tumora i dobi bolesnika sa brojem krvnih žila podijeljenih u tri grupe ( 1. do 33; 2. do 66; 3. iznad 67 )

BKŽ	Grupa 1 (N=52)	Grupa 2 (N=38)	p
Ki67	7,0269	7,1078	0,9552

BKŽ	Grupa 1 (N=52)	Grupa 3 (N=9)	p
Ki67	7,0269	3,1109	<u>0,0277</u>

BKŽ	Grupa 2 (N=21)	Grupa 3 (N=16)	p
Ki67	7,1078	3,1109	<u>0,0239</u>

BKŽ	Grupa 1 (N=66)	Grupa 2 (N=46)	p
Veličina	7,0939	6,9891	0,8651

BKŽ	Grupa 1 (N=66)	Grupa 3 (N=11)	p
Veličina	7,0939	5,8636	0,2107

BKŽ	Grupa 2 (N=23)	Grupa 3 (N=20)	p
Veličina	6,9891	5,8636	0,2928

BKŽ	Grupa 1 (N=69)	Grupa 2 (N=47)	p
Dob	57,6231	58,0000	0,8725

BKŽ	Grupa 1 (N=69)	Grupa 3 (N=12)	p
Dob	57,6231	57,7500	0,9739

BKŽ	Grupa 2 (N=47)	Grupa 3 (N=12)	p
Dob	58,0000	57,7500	0,9445

#### 4. 5. Kliničko-patološki parametri u bolesnika s i bez metastaza

U Tablici 14 se uspoređuju bolesnici s i bez metastaza u odnosu na broj krvnih žila, veličinu tumora, dob bolesnika i ekspresiju Ki67. Statistički značajna korelacija nađena je s veličinom tumora i ekspresijom Ki67. Tumori s metastazama su bili veći, uz veću ekspresiju Ki67. Broj krvnih žila i dob bolesnika nisu imali statističku značajnost.

Tablica 14. Usporedba tumora u bolesnika s i bez metastaza u odnosu na broj krvnih žila (BKŽ), veličinu tumora (VT), dob bolesnika (DB) i ekspresiju Ki67 (Student T-test)

	tumori bez metastaza	tumori sa metastazama	p
BKŽ	34,97 (N=88)	34,00 (N=21)	0,8481
VT	6,34cm (N=106)	8,51 cm (N=29)	<u>0,0007</u>
DB	58,47 god. (N=116)	59,93 god. (N=32)	0,5248
Ki67	6,00 (N=71)	9,50 (N=22)	<u>0,0257</u>

#### 4. 6. Petogodišnje preživljenje bolesnika s karcinomom stanica bubrega u odnosu na analizirane kliničko-patološke parametre

U našoj studiji analizirali smo petogodišnje preživljenje bolesnika između različitih tipova ekspresije VEGF-a, nuklearnih gradusa, ekspresije Ki67 i broja krvnih žila.

Tablica 15. Prikaz ukupnog petogodišnjeg preživljenja u bolesnika s rakom bubrežnih stanica (1989-1994. godina)

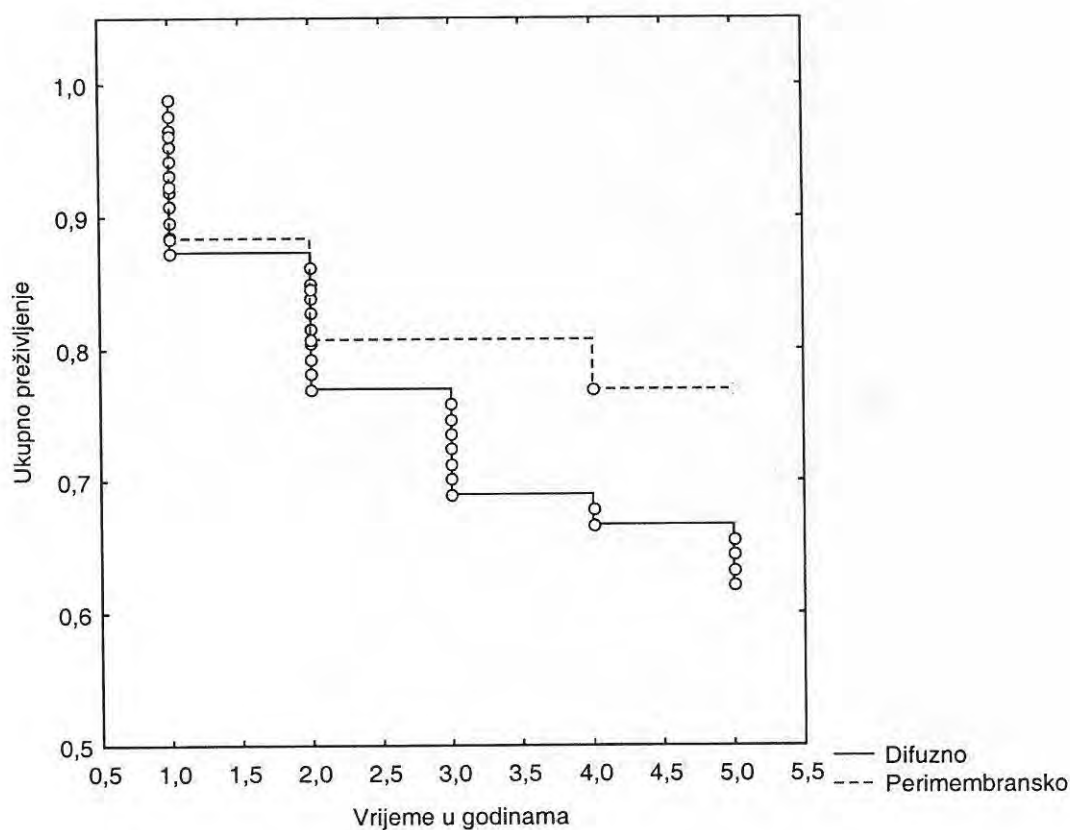
	< 5 godina (N=46)	≥ 5 godina (N=89)	p
preživljenje	34,07 %	65,93%	<u>0,0000</u>



Usporedbom petogodišnjeg preživljenja između difuznog i perimebranoznog citoplazmatskog rasporeda VEGF-a nije nađena statistički značajna korelacija (Tablica 16 i Slika 9).

Tablica 16. Usporedba petogodišnjeg preživljenja obzirom na citoplazmatsko bojenje VEGF-a

	VEGF - difuzno (N=87)	VEGF - perimembranozno (N=26)	P
Preživljenje	62,07 %	76,92 %	0,1948

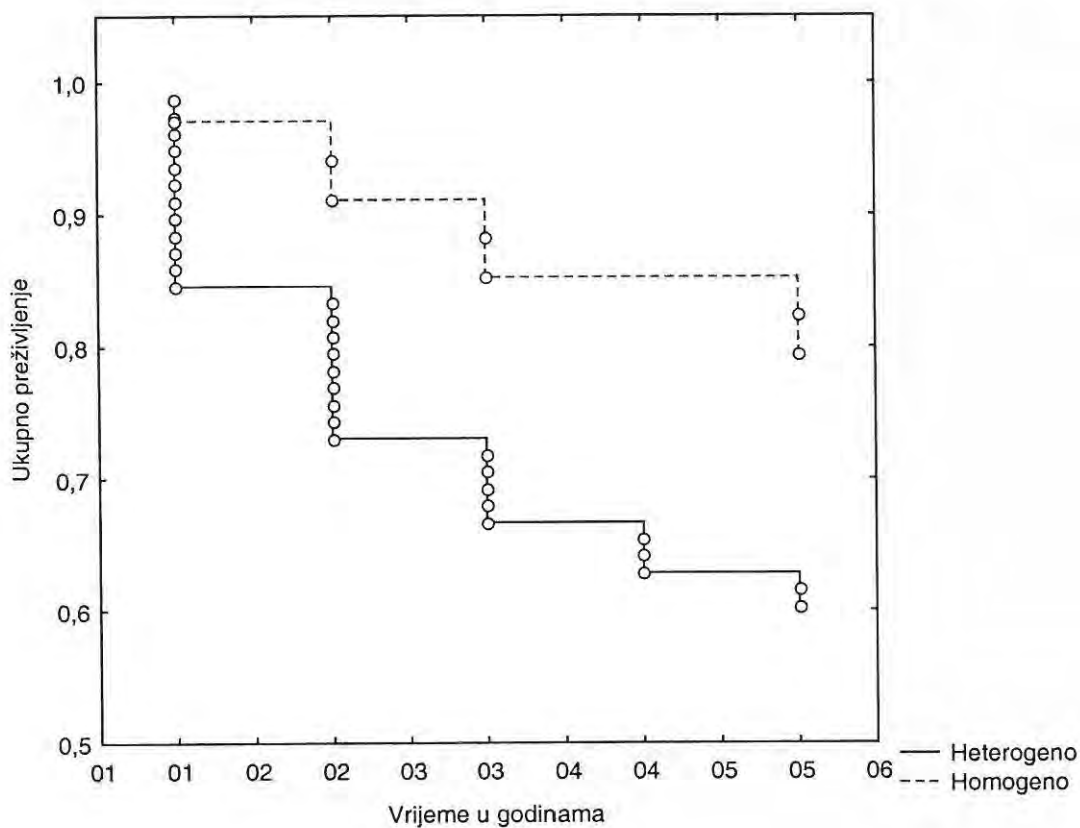


Slika 9. Petogodišnje preživljenje obzirom na citoplazmatsko bojenje VEGF-a

Usporedbom homogene i heterogene raspodjele VEGF-a nađeno je statistički značajno duže preživljenje u bolesnika s homogenim rasporedom VEGF-a unutar tumora (Tablica 17 i Slika 10).

Tablica 17. Usporedba petogodišnjeg preživljenja između načina raspodjele VEGF-a

	VEGF homogeno (N=34)	VEGF heterogeno (N=78)	p
Preživljenje	79,41 %	60,26 %	<u>0,0373</u>

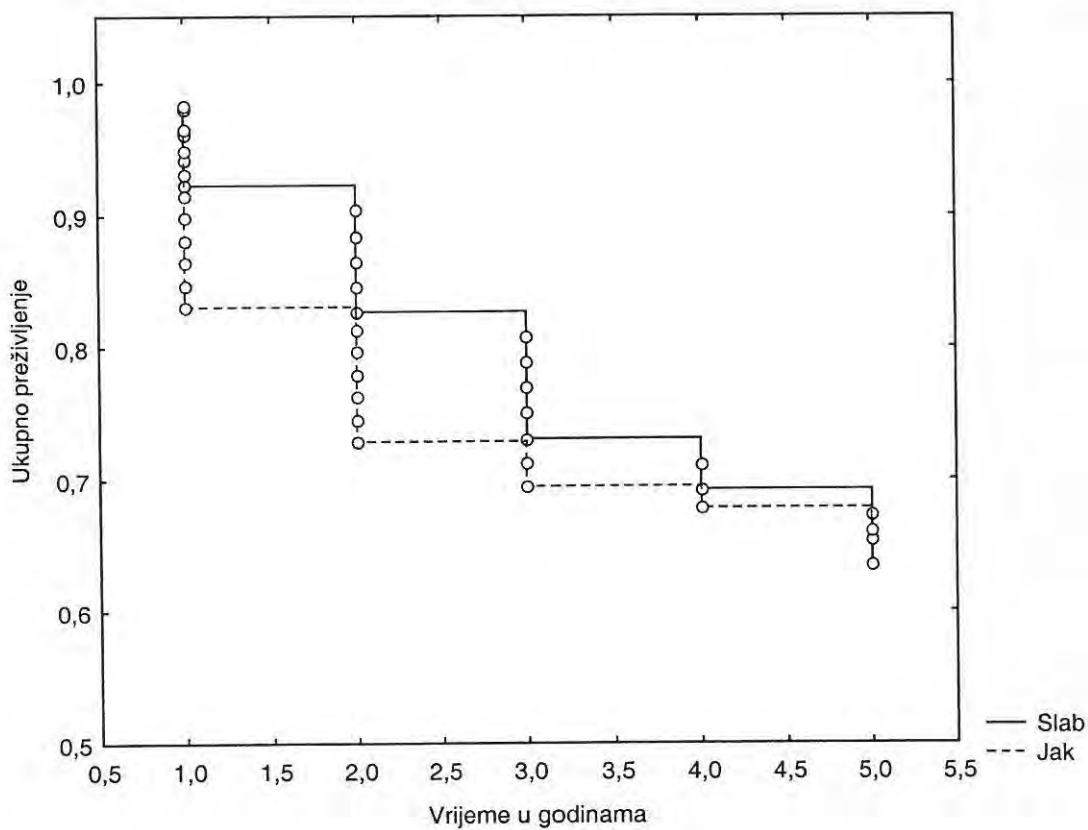


Slika 10. Petogodišnje preživljenje između dva načina raspodjele VEGF-a

Usporedbom slabog i jakog intenziteta VEGF-a nije nađena statistički značajna korelacija s petogodišnjim preživljenjem (Tablica 18 i Slika 11).

Tablica 18. Usporedba petogodišnjeg preživljenja u odnosu na intenzitet VEGF-a

	VEGF - slab (N=52)	VEGF - jak (N=59)	p
Preživljenje	63,46 %	66,10 %	0,9569

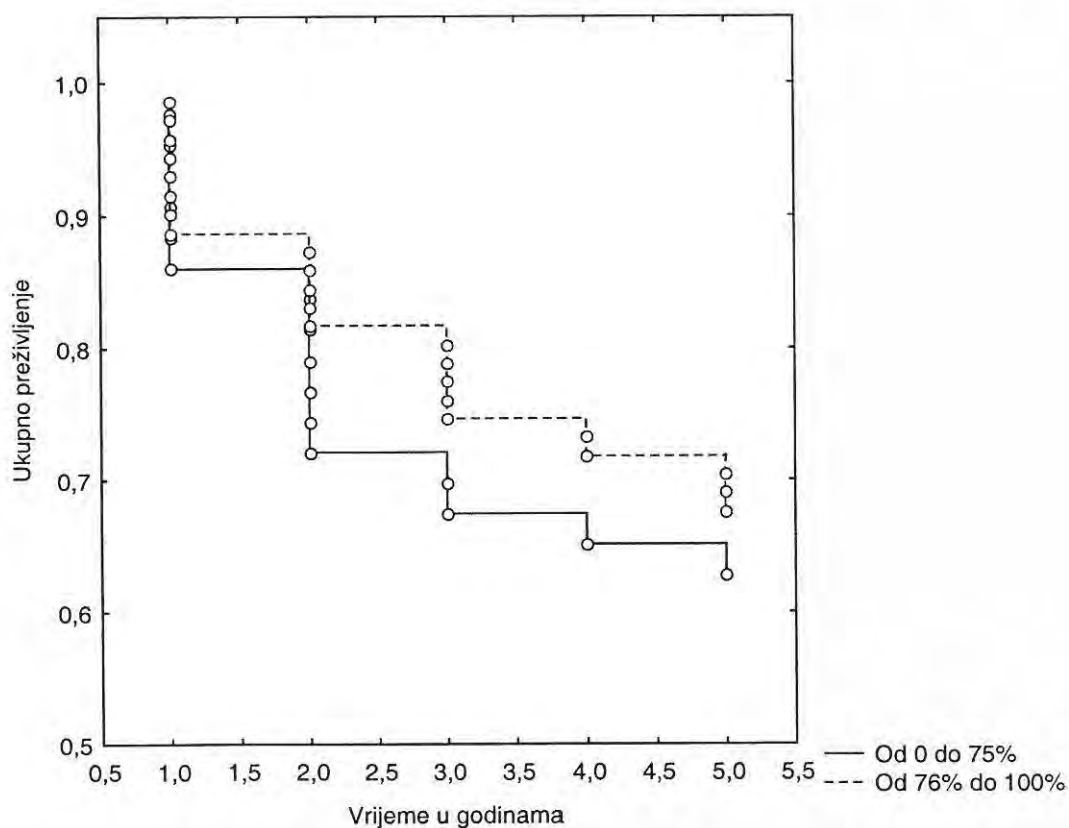


Slika 11. Petogodišnje preživljenje između dva tipa intenziteta VEGF-a

Razlika u petogodišnjem preživljenju između postotaka pozitivnih VEGF tumorskih stanica nije bila statistički značajna. (Tablica 19 i Slika 12).

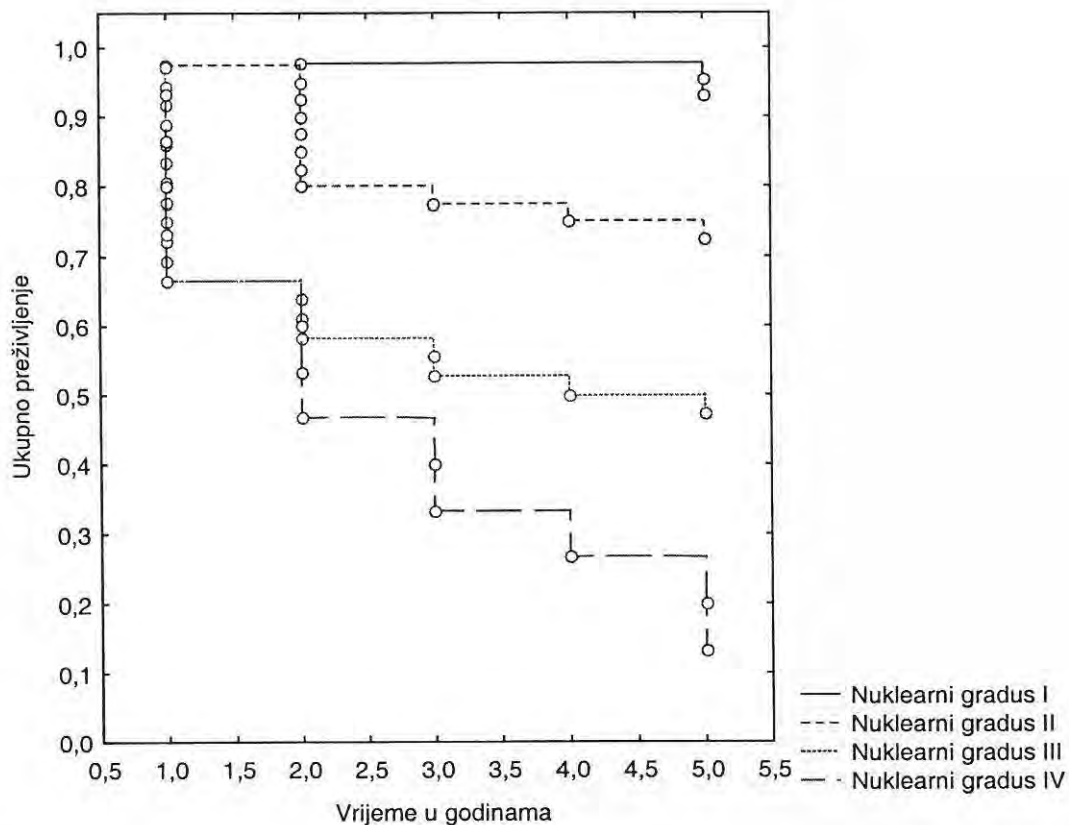
Tablica 19. Usporedba petogodišnjeg preživljenja između postotaka pozitivnih VEGF tumorskih stanica

	VEGF - 0-75% (N=43)	VEGF - 76-100% (N=71)	p
preživljenje	62,79 %	67,61 %	0,9569



Slika 12. Petogodišnje preživljenje između postotaka pozitivnih VEGF tumorskih stanica

Statistički značajna razlika nađena je u ukupnom preživljenju do pet i iznad pet godina po operaciji, uz zamjetno kraće preživljenje u višim nuklearnim gradusima. U NG1 petogodišnje preživljenje bilo je 93,18%, u NG2 72,30%, u NG3 47,22% i u NG4 13,33% ( Slika 13).



Slika 13. Usporedba ukupnog petogodišnjeg preživljenja između nuklearnih gradusa

Usporedbom petogodišnjeg preživljenja između nuklearnih gradusa nađeno je statistički značajnije preživljenje bolesnika sa tumorima NG1 u odnosu sa NG3 i NG4, te sa NG2 u odnosu sa NG3 i NG4, dok je duže preživljenje u NG3 u odnosu na NG4 na granici

statističke značajnosti (\*). Između NG1 i NG2 nije bilo statističke značajnosti u petogodišnjem preživljenju (Tablica 20).

Tablica 20. Usporedba petogodišnjeg preživljenja između nuklearnih gradusa (NG)

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
NG1 (N=44)	6,82	93,18	
NG2 (N=40)	27,50	72,30	0,0987

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
NG1 (N=44)	6,82	93,18	
NG3 (N=36)	52,78	47,22	0,0000

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
NG1 (N=44)	6,82	93,18	
NG4 (N=15)	86,67	13,33	0,0000

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
NG2 (N=40)	27,50	72,30	
NG3 (N=36)	52,78	47,22	0,0132

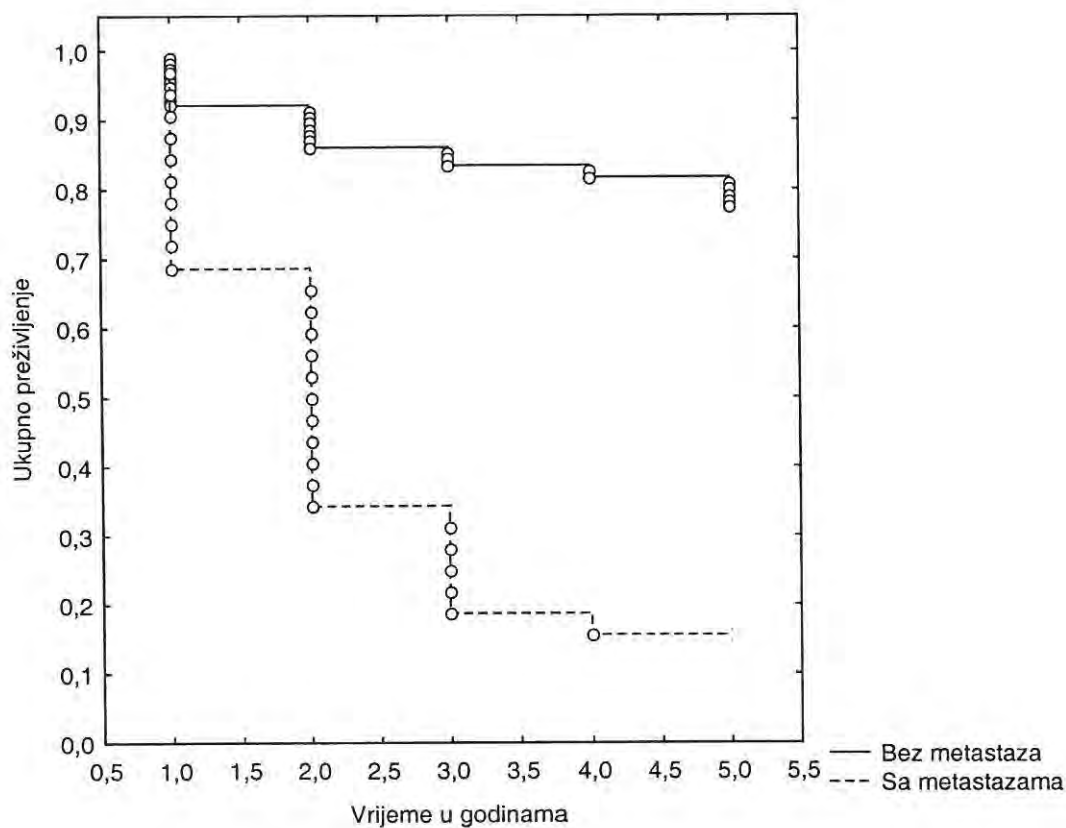
	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
NG2 (N=40)	27,50	72,30	
NG4 (N=15)	86,67	13,33	0,0007

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
NG3 (N=36)	52,78	47,22	
NG4 (N=15)	86,67	13,33	0,0587*

Usporedbom petogodišnjeg preživljenja bolesnika s i bez metastaza statistički značajno duže preživljenje nađeno je u bolesnika bez metastaza (Tablica 21 i Slika 14).

Tablica 21. Usporedba petogodišnjeg preživljenja u bolesnika s i bez metastaza (2 grupe)

	Tumori s metastazama (N=32)	Tumori bez metastaza (N=115)	p
Preživljenje > 5 godina	15,63 %	76,92 %	<u>0,0000</u>



Slika 14. Usporedba petogodišnjeg preživljenja u bolesnika s i bez metastaza

Usporedbom ekspresije Ki-67 i broja krvnih žila nađena je statistički značajna razlika u odnosu na ekspresiju Ki67 koja je obrnuto proporcionalna dužini preživljavanja bolesnika. Broj krvnih žila nije imao statističku značajnost (Tablica 22).

Tablica 22. Petogodišnje preživljenje u odnosu na ekspresiju Ki67 i broj krvnih žila (BKŽ) (Cox regresija proporcionalnog rizika)

	Ki67 (Chi2 = 10,411)	BKŽ (Chi2= 0,1026)
p	<u>0,00125</u>	0,74874

U Tablici 23 se uspoređuje petogodišnje preživljenje između tri grupe tumora po broju krvnih žila. Razlika u petogodišnjem preživljenju nije bila statistički značajna.

Tablica 23. Usporedba petogodišnjeg preživljenja u odnosu na broj krvnih žila (BKŽ) (1. do 33; 2. do 66; 3. iznad 67)

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
BKŽ 1 (N=68)	27,94% (19)	72,06% (49)	
BKŽ 2 (N=24)	37,50% (9)	62,50% (15)	0,4591

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
BKŽ 1 (N=68)	27,94% (19)	72,06% (49)	
BKŽ 3 (N=20)	45,00% (9)	55,00% (11)	0,1420

	< 5 godina (%)	> 5 godina (%)	p
BKŽ 2 (N=24)	37,50% (9)	62,50% (15)	
BKŽ 3 (N=20)	45,00% (9)	55,00% (15)	0,4853



## 5. RASPRAVA

Angiogeneza je ključni čimbenik u nastanku i razvoju tumora. Njen značaj prvi je opisao Folkman uvidjevši da angiogeneza prati tumorski rast <sup>(88)</sup>. Onog trenutka kad rast tumorskih stanica prijeđe točku jednostavne difuzije (oko  $10^6$  stanica) dalje povećanje broja stanica zahtjeva stvaranje novih krvnih žila. To je i dokazano eksperimentalnom implantacijom stanica ljudskog RCC u korneu zečeva s posljedičnim stvaranjem krvnih žila od implantiranog tumora do limbusa <sup>(89)</sup>. Pokazalo se da tumorske stanice imaju mogućnost stvaranja čimbenika rasta ili citokina koji stimuliraju rast endotelnih stanica i neovaskularizaciju. Razumljivo bi bilo da povećana vaskularizacija upućuje na veću agresivnost tumora, a time i mogućnost metastaziranja. Međutim, studije kod karcinoma dojke <sup>(90)</sup>, melanoma <sup>(91)</sup>, prostate <sup>(92)</sup>, mokraćnog mjehura <sup>(93)</sup>, kolona <sup>(94)</sup>, želuca <sup>(95)</sup> i jajnika <sup>(96)</sup> pokazale su kako je odnos angiogeneze tumora i preživljenja bolesnika i obrnuto proporcionalan.

RCC je hipervaskularizirani tumor koji pokazuje povećanu ekspresiju VEGF-a u usporedbi sa normalnim bubrezima <sup>(97,98)</sup>. Procjena ispoljenosti pojedinih proteina u imunohistokemijskim analizama većinom se vrši semikvantitativno. Cilj ovog istraživanja bio je, između ostalog, detaljnija procjena VEGF ekspresije u tumorskim stanicama i unutar tumoru. Tako je VEGF-a analiziran obzirom na postotak pozitivnih tumorskih stanica, zatim prema raspodjeli pozitivnih stanica unutar tumora te intenzitetu i položaju citoplazmatskog bojenja. Pretpostavka je bila da će promjena pojedinih oblika ispoljenosti bolje ili pouzdanije korelirati s ostalim kliničko-patološkim parametrima analiziranim u ovoj studiji. Postotak pozitivnih stanica i citoplazmatska distribucija VEGF-a statistički su značajno bili povezani s brojem krvnih žila, pri čemu je veći broj

krvnih žila bio prisutan u grupi tumora s većim postotkom VEGF pozitivnih tumorskih stanica i s perimembranoznim rasporedom ovog angiogenog faktora u citoplazmi. Ispoljenost VEGF-a je također ukazivala na razlike u nuklearnim gradusima i veličini tumora pri čemu je veći postotak pozitivnih stanica s heterogenom distribucijom VEGF-a bio prisutan u tumorima većeg gradusa i onih većih dimenzija. Za razliku od toga, homogena, perimembranozna ekspresija, niskog intenziteta zabilježena je u dobro diferenciranim tumorima. Difuzni i intenzivni citoplazmatski raspored VEGF-a zamijetili smo u tumorima višeg nuklearnog gradusa i većeg pT stadija, a veći Ki67 proliferacijski indeks u tumorima s heterogenom VEGF distribucijom. Naši rezultati, iako govore o povećanoj ispoljenosti VEGF-a u RCC, i to posebno u onih tumora s većom angienezom i s lošijim histološkim karakteristikama, ipak nisu u potpunosti potvrdili prognostički značaj ovog angiogenog čimbenika, obzirom da razlika u petogodišnjem preživljenju nije ovisila o različitosti ekspresije VEGF-a.

Tumori u bolesnika s metastazama bili su statistički veći i s većom ekspresijom Ki67 u tumorskim stanicama, što odgovara literaturnim podacima <sup>(52,54,79-87)</sup>. Za razliku od VEGF ekspresije, Ki67 proliferacijski indeks potvrđen je i kao značajni prognostički čimbenik. Naime, veća Ki67 ispoljenost bile je udružena s tumorima većih dimenzija, višeg pT stadija, većeg nuklearnog gradusa, prisutnošću metastaza i s kraćim preživljenjem bolesnika. Ovakvi rezultati odgovaraju i podacima iz literature <sup>(54,56,86,87)</sup>.

Studije u kojima se procjenjuje prognostički značaj gustoće, odnosno broja krvnih žila (MVD ili BKŽ) vrlo su kontradiktorne. Tako Yoshino i sur., te Paradis i sur. <sup>(99,100)</sup> opisuju BKŽ kao značajan prognostički čimbenik u T1-2 i M0 tumorima, dok MacLennan i Suzuki <sup>(101,102)</sup> navode nespecifičnost BKŽ u dužini preživljavanja. Slaton i

sur. <sup>(103)</sup> ne nalaze korelaciju BKŽ s metastazama. Za razliku od njih Delahunt, Leclercq i Sabo <sup>(104-106)</sup> prikazuju da viši BKŽ prati duže preživljenje. Nadalje, Kohler i Hemmerlein <sup>(107,108)</sup> opisuju smanjenje BKŽ-a od G1 prema G3 RCC.

Imao i sur. su dokazali kako smanjenje BKŽ u RCC korelira s prisutnošću metastaza i smanjenjem dužine preživljenja. Iako nije u potpunosti jasno zašto slabije vaskularizirani RCC imaju slabiju prognozu postoji nekoliko hipoteza koje pokušavaju objasniti uzroke. Herbst i sur. <sup>(109)</sup> su prikazali da stanice RCC imitiraju tubule koje su u blizini krvnih žila. Na taj način visoki BKŽ u tumorskom tkivu RCC niskog gradusa može utjecati na normalnu građu tubula. Imao i sur. <sup>(110)</sup> nalaze da je u normalnom parenhimu korteksa bubrega BKŽ visok, za razliku od tumorskog tkiva visokog gradusa. Kohler i sur. <sup>(107)</sup> predlažu hipotezu o sniženoj vrijednosti BKŽ u RCC visokog gradusa kao posljedica nemogućnosti tumorske neovaskularizacije da prati proliferaciju tumorskih stanica u gradusu 3 RCC-a. To dovodi da smanjene metaboličke opskrbe s posljedičnom nekrozom. Delahunt i sur. <sup>(104)</sup> smatraju da vrijednost BKŽ u RCC visokog gradusa ovisi i o stvaranju velikih krvožilnih kanala, koji su prisutni u tumora većih dijametara. Sabo i sur. <sup>(106)</sup> mišljenja su da solidni RCC visokog gradusa brzo rastu, mijenjajući arhitekturu tumora uz smanjenje gustoće krvnih žila. Takvi tumori postaju hipoksični i nekrotični. Tumorske stanice mogu lako prodrijeti u krvne žile zbog slabosti kapilarnih membrane. Endotelne stanice na vrhu novostvorenih krvnih žila stvaraju proteaze koje pak omogućavaju lakši prodor tumorskih stanica u krvne žile <sup>(110-112)</sup>.

Tumori visokog gradusa rastu brže, onemogućavajući stvaranje novih krvnih žila, smanjujući BKŽ i povećavajući propusnost postojećih krvnih žila. Tako neki autori

zaključuju da je visoki BKŽ vezan uz manje tumore koji ne metastaziraju i da nije nezavisan prognostički čimbenik za razliku od veličine i gradusa tumora <sup>(110)</sup>.

U našoj studiji usporedba vrijednosti broja krvnih žila (BKŽ) sa ekspresijom Ki67, dobi bolesnika i veličine tumora nije dala statistički značajne rezultate. Međutim, usporedbom vrijednosti BKŽ-a i nuklearnih gradusa (NG) tumora nađena je statistički značajna razlika u odnosu NG1 i NG3, te NG4 pri čemu je veći broj krvnih žila bio prisutan u višim NG. Ovakvi rezultati u suprotnosti su s ranije navedenim postavkama <sup>(107,110)</sup>.

Podjelom BKŽ-a u 3 grupe (do 33, do 66 i iznad 67) i usporedbom njihovih vrijednosti s ekspresijom Ki67, veličinom tumora i dobi bolesnika, statistički značajna razlika nađena je između 1. i 3. grupe te između 2. i 3. grupe u odnosu na Ki67 proliferacijski indeks s najnižim indeksom proliferacije u 3. grupi. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da angiogeneza, izražena kroz BKŽ nije jedini čimbenik ključan za proliferaciju tumorskih stanica. Veličina i dob nisu bili statistički značajno različiti između pojedinih grupa BKŽ. U našoj studiji svjetlostanični tip tumora bilo je zastupljen u 88,43% bolesnika, sa najčešćim nalazom tumora u NG1 (34,36%). U tom tipu tumora NG1 bio je prisutan u 83,02% bolesnika. Navedeni podaci o učestalosti tipa tumora odgovaraju literarnim podacima <sup>(1,3,5-9, 11,16,24-26,29)</sup>. U NG1 i NG2 bilo je 61,64% tumora, što je viši postotak u odnosu na recentnu literaturu <sup>(3,5-9,16,26)</sup>. Ranija i kvalitetnija dijagnoza omogućila je da je gotovo polovica tumora slučajno otkrivena. Metastaze su bile pretežno zastupljene u tumora sa NG3 i NG4 (65,62%). Usporedbom petogodišnjeg preživljenja sa rasporedom, raspodjelom, intenzitetom i postotkom pozitivnih VEGF tumorskih stanica statistički značajna razlika nađena je samo u homogenoj raspodjeli, uz duže preživljenje bolesnika.

Petogodišnje preživljenje značajno je duže bilo u NG1 u odnosu na NG3 i NG4 te u NG2 u odnosu na NG3 i NG4.

U bolesnika bez metastaza petogodišnje preživljenje je očekivano bilo znatno duže. Korelacijom petogodišnjeg preživljenja i ekspresije Ki67 prikazano je da je ona statistički značajno obrnuto proporcionalna dužini preživljenja. Razlika u petogodišnjem preživljenju unutar grupa BKŽ-a nije bila statistički značajna.

Klinički prognostički čimbenici su se potvrdili kao nezavisni, pri čemu su veći tumori, višeg stadija, uz prisutnost simptoma i metastaze imali lošiju prognozu. Podjednaki postotak svjetlostaničnih i papilarnih tumora nađen je u T1 stadiju. U T3 i T4 stadiju bilo je postotno više svjetlostaničnih tumora. Raspodjela po spolu i dobi u tipičnim je okvirima (odnos 2:1 u korist muškaraca, uz prosječnu dob od 57 godina), što odgovara podacima iz literature <sup>(1-5)</sup>. U našoj studiji više od polovice tumora otkriveno je slučajno (52%) što je za razdoblje iz kojega su korišteni podaci (1989-1994. godina) vrijedan podatak koji upućuje na kvalitetnu, prvenstveno ultrazvučnu dijagnostiku. Prema literaturnim podacima <sup>(60-62)</sup> za to se razdoblje navode slučajni nalazi u 30-40% bolesnika. Iako se CT navodi kao standardna metoda dijagnosticiranja tumora bubrega <sup>(61)</sup>, u našoj grupi CT je učinjen samo u 13% bolesnika, i to u prvenstveno u onih s većim, invazivnim tumorima u kojih se želio bolje prikazati odnos s okolnim organima zbog planiranja operacijskog pristupa. Razloge manjeg korištenja CT-a treba potražiti u objektivnim okolnostima, ali u prvom redu u visokoj specifičnosti, osjetljivosti i točnosti ultrazvučnih nalaza u našoj ustanovi <sup>(62)</sup>.

Kirurška tehnika je u svih bolesnika bila radikalna nefrektomija. Kroz lumbotomijski pristup učinjeno je 94% operacija, pri čemu na našem odjelu ne radimo adrenalektomiju

kod tumora smještenih u donjem polu bubrega . U 6% bolesnika nefrektomija se učinjena transabdominalno. Različitost operacijskih pristupa ovisi o stavovima i mogućnostima ustanova <sup>(63-70)</sup>.

Svrha ovog i svih dosadašnjih istraživanja, a i onima koji su u tijeku (npr. ekspresija osteopontina u RCC <sup>(113)</sup>), je otkrivanje značajnosti prognostičkih čimbenika zbog pronalaženja primjerene terapije ili što je još važnije, moguće prevencije nastajanja tumora RCC.

Koncept zaustavljanja tumorske angiogeneze prvi je put prikazan prije više od trideset godina <sup>(114)</sup>, pri čemu je bilo potrebno razjasniti događanja na molekularnoj razini odgovornih za rast i razvoj tumorskih krvnih žila. RCC je obilježen čestim nedostatkom von Hippel-Lindau tumor supresor gena što prouzrokuje izostanak važnog mehanizma za regulaciju razine čimbenika indukcije hipoksije (HIF-1). Smatra se da ovaj mehanizam dovodi do stvaranja visoke razine VEGF-a <sup>(115)</sup>.

Von Hippel Lindau (VHL) sindrom u RCC svijetlih stanica karakteriziran je nasljednom mutacijom u jednom od VHL alela i stečenim gubitkom drugog VHL alela, a u ostalim tipovima inaktivacijom oba alela, bilo mutacijom ili hipermetilacijom <sup>(116,117)</sup>.

Osnovno djelovanje pVHL gena je vezivanje na ciljni protein, molekulu pri čemu nastaje kompleks ubikvintin ligaze. To dovodi do degradacije endosoma. Najznačajniji ciljni pVHL protein je alfa podjedinica HIF-1, gdje gubitak pVHL dovodi do stvaranja visokih razina HIF-1 alfa <sup>(116,118)</sup>. U zdravih bubrega ekspresija HIF-1 alfa je neznatna ili izostaje. HIF-1, sastavljen od HIF-1 alfa i HIF-1 beta podjedinice, regulira ekspresiju gena ovisnih o hipoksiji, kao što je VEGF. U RCC je razina VEGF-a povišena što dovodi do nastanka novih krvnih žila <sup>(119)</sup>.

VEGF je vjerojatno najznačajniji čimbenik rasta koji je uključen u angiogenezu i ima značajnu ulogu u nastajanju metastaza u mnogim karcinomima. Primarni solidni tumori prolaze kroz fazu sporog rasta, gotovo mirovanja, do veličine do nekoliko milimetara, a zatim započinje postupno stvaranje novih krvnih žila. Tumorske stanice moraju razviti sposobnost stvaranja novih krvnih žila iskorištavajući kisik i hranidbene čimbenike (120,121). Angiogeneza je pod kontrolom nekoliko važnih citokina i čimbenika rasta, kao što su fibroblastni čimbenik rasta, VEGF, angiopoietini, semaforini, efrini i drugi proteini. VEGF, a naročito VEGF-A se pokazao najvažnijim medijatorom angiogeneze: djeluje kao mitogen endotelnih stanica i citokin koji kontrolira proliferaciju, migraciju i preživljavanje endotelnih stanica. VEGF ekspresija u karcinomima započinje na nekoliko načina: hipoksijom unutar tumorske mase, izostankom tumor supresorskih gena kao što su VHL i p53, aktivacijom drugih čimbenika rasta ili stimulacijom tumorskih stanica sa parakrinim ili autokrinim citokinima i čimbenicima rasta (122-124).

U ovom je istraživanju potvrđena povezanost između ispoljenosti VEGF u tumorskim stanicama i BKŽ što ukazuje na značaj ovog citokina u angiogenezi kod RCC. Sama angiogeneza, izražena kroz BKŽ, bila je povezana samo s NG dok udruženost s ostalim prognostički nepovoljnijim parametrima kao što su to metastaze, veličina tumora i Ki proliferacijski indeks i preživljenje u ovoj studiji nije nađena. Usporedba VEGF ekspresije sa patološkim i kliničkim parametrima značajnim za prognozu bolesti pokazala je da su veći nuklearni gradus i veći tumori, koji su i do sada bili poznati kao nezavisni prognostički čimbenici, povezani s tumorima u kojih je bila povećana VEGF ekspresija i to u grupi heterogene distribucije VEGF. Homogena distribucija i perimembranozna citoplazmatska ekspresija VEGF sa slabim intenzitetom bila je prisutna u bolje

diferenciranih tumora. Difuzna i intenzivnija citoplazmatska distribucija zabilježena je u tumorima s višim nuklearnim gradusom.

Kraće preživljenje bolesnika s RCC udruženo je s pojavnosti metastaza odnosno s patohistološkim karakteristikama kao što su to veći nuklearni gradus i veći proliferacijski indeks tumorskih stanica. Tumorske stanice s navedenim obilježjima obično imunohistokemijski pokazuju difuzno i jako citoplazmatsko obojenje s VEGF. Pretpostavka je da će VEGF ili njegov receptor u takvim tumorima biti potencijalna ciljna supstanca u terapiji bolesnika s RCC. Tako su mnogobrojni lijekovi, koji su u različitim fazama kliničkog ispitivanja, npr. bevacizumab, PTK787, SU5416, BAY43-9006, neovastat, TNP-470, talidomid, pokazali uspješnost u liječenju bolesnika sa metastatskim RCC, i ujedno time opravdavali daljnja ispitivanja u cilju utvrđivanja angiogenih čimbenika kao i njihovih korelacija s kliničkim i patohistološkim prognostičkim čimbenicima kod raznih malignih oboljenja<sup>(113,125)</sup>.

Naravno da je to samo mali korak ka glavnom cilju mnogih timova bazičnih istraživača, genetičara, molekularnih biologa, biokemičara, farmakologa, patologa, citologa, urologa, onkologa, ali i psihologa, psihijatarata, ... otkriti uzroke kada i zašto naš životni okidač pokrene lanac reakcija koje dovedu do procesa koji nas postupno odvede sa ove malene kugle okružene atmosferom.



## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- polovica novootkrivenih bolesnika s rakom bubrežnih stanica, i to dijagnosticiranih ultrazvukom, bilo je u asimptomatskoj fazi bolesti,
- metastaze su otkrivene u 32 ( 21,76%) bolesnika s rakom bubrežnih stanica pri čemu je 65% tumora bilo nuklearnog gradusa 3 i 4 i značajno većeg Ki67 proliferacijskog indeksa,
- konvencionalnom ili svjetlostaničnom histološkom tipu karcinoma bubrežnih stanica pripadalo je 88,43%, od kojih je 61,64% nuklearnog gradusa 1 i 2,
- broj krvnih žila rastao je s postotkom pozitivnih tumorskih stanica na VEGF, što ukazuje na značaj ovog čimbenika u angiogenezi raka bubrežnih stanica,
- veći broj krvnih žila nalazio se u tumorima većeg nuklearnog gradusa, a tumori većeg nuklearnog gradusa bili su udruženi s većom Ki67 proliferativnom aktivnosti tumorskih stanica, što ukazuje na udruženost angiogeneze s prognostički nepovoljnijim parametrima kod karcinoma bubrežnih stanica,
- pokazatelji angiogeneze (broj krvnih žila i ispoljenost VEGF), kao zasebni parametri, nisu bili udruženi s preživljenjem bolesnika, odnosno nisu se pokazali kao nezavisni prognostički čimbenici i
- bolesnici s rakom bubrežnih stanica većeg NG, većeg Ki67 proliferacijskog indeksa, većeg promjera tumora i s metastazama imali su kraće preživljenje, što potvrđuje njihov nezavisni prognostički značaj.

## 7. LITERATURA

1. Kirkali Z, Tuzel E, Mungan MU. Recent advances in kidney cancer and metastatic disease. *BJU Int* 2001;88:818-24.
2. Strnad M. Epidemiology of renal carcinoma in Croatia. *Hrvatski zavod za javno zdravstvo* 2003;12:14-7.
3. Chow WH, Devesa SS, Warren JL i sur. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999;281:1628-31.
4. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni Jr JF. Epidemiology of renal cell carcinoma. U: Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Coffey DS, ur. *Comprehensive textbook of genitourinary oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:1011-5.
5. Parkin DM, Muir CS. Comparability and quality of data. U: Muir C, Waterhouse T, Mack T, ur. *Cancer incidence in five continents*. New York: UARC Scientific; 1997: 45.
6. Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF, Chow. Global increase in kidney cancer incidence, 1973-1992. *Eur J Canc Prev* 2002;11:171-8.
7. Bretheau D, Lechevalier E, Eghazarian C, Grisoni V, Coulange C. Prognostic significance of incidental renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1995;5:319-23.
8. Homma Y, Kawabe K, Kitamura T, Nishimura Y, Shinohara M, Kondo Y. Increased incidental detection and reduced mortality in renal cancer: recent retrospective analysis at eight institutions. *Int J Urol* 1995;2:77-80.

9. Dhote R, Pellicercoeuret N, Thiounn B, Vidaltrecan D. Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for preventions. *BJU Int* 2000;86(1):20.
10. Liehr JG. Hormone associated cancer:mechanistic similarities between human breast cancer and estrogen-induced kidney carcinogenesis in hamsters.*Environ Health Perspect* 1997;105(S3):565-9.
11. Muscat JE. The epidemiology of renal cell cancer. In: Brukowski RM, Novick AC, ur. *Renal Cell Carcinoma*. Totowa (NJ): Humana Press; 2000:3-14.
12. Hanley AJ, Choi BC, Holowaty EJ. Cancer mortlity among Chinese migrants: a review. *Int J Epidemiol* 1995;24:255-65.
13. Wolk A, Gridey G, Niwa S, Lindblad P, McCredie M, Mellemggaard. International renal cell cancer study. Role of diet. *Int J Cancer* 1996;65:67-73.
14. Yuan JM, Gago-Dominguez M, Castelao JE, Hankin JH, Ross RK, Yu MC. Cruciferous vegetables in relation to renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;77:211-6.
15. Sagasawa I, Teresawa Y, Imai K, Sekino H, Takahashi H. Acquired cystic disease of the kidney and renal carcinoma in hemodialysis patients: ultrasonographic evaluation. *Br J Urol* 1992;70:236-9-
16. Jacqmin D, Van Poppel H, Kirkali Z, Mickisch G. Renal cancer. *Eur Urol* 2001;39 (3):1-9.
17. Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML I sur. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317-20.

18. Maranchie JK, Linehan M. Genetic disorders and renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 2003;30:133-41.
19. Maher ER, Kaelin JR WG. Von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)* 1997;76:381-91.
20. Chauveau D, Duvic C, Chretien Y, Paraf F, Droz D, Melki P i sur. Renal involment in von Hippel-Lindau disease. *Kidney Int* 1996;50:944-51.
21. Zbar B, Glenn G, Lubensky I, Choyke P, Walther MM, Magnusson G i sur. Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *J Urol* 1995;153:907-12.
22. Schmidt L, Duh FM, Kishida T, Glenn G, Cholke P, Scherer SW i sur. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogen papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997;16:68-73.
23. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D i sur. Multiple Leiomyoma Consortium. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* 2002;30(4):406-10.
24. Cohn EB. Campbell SC. Screening for renal cell carcinoma. U: Brukowski RM, Novick AC ur. *Renal cell carcinoma*. Totowa (NJ): Humana Press; 2000:93-109.
25. Filipas D, Spix C, Schulz-Lampel D, Michaelis J, Hehenfellner R, Roth S i sur. Screening for renal cell carcinoma using ultrasonography: a feasibility study. *BJU Int* 2003;91(7):595.
26. Novick AC, Campbell SC. Renal tumors. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED ur. *Campbells Urology*. Philadelphia: Saunders;2002:2672-731.

27. Choyke PL, Glenn GM, McClennan MW, Patronas NJ, Lineham WM, Zbar B. Von Hippel-Lindau disease: genetic, clinical and imaging figure. *Radiology* 1995;194:6269-342.
28. Friedrich CA. Von Hippel-Lindau syndrome: a pleomorphic condition. *Cancer* 1999;86: 1658-62.
29. Slaton JW, Swanson DA. Renal cell carcinoma-diagnosis and staging. U: Brukowski RM, Novick AC ur. *Renal cell carcinoma*. Totowa (NJ): Humana Press; 2000: 111-33.
30. Aldaabil R, Peereboom D. Paraneoplastic syndromes in renal cell carcinoma .U: Brukowski RM, Novick AC ur. *Renal cell carcinoma*. Totowa (NJ): Humana Press; 2000:135-45.
31. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 1996;14:216-22.
32. Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Negrier S I sur. Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndromes associated with renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1997;72:424-30.
33. Bosniak MA. Angiomyolipoma (hamartoma) of the kidney: a preoperative diagnosis is possible in virtually every case. *Urol Radiol* 1981;3:135-41.
34. Choyke PL, White EM, Zeman RK, Jaffe MH, Clark LR. Renal metastases: clinicopathologic and radiologic correlation. *Radiology* 1987;162:359-63.
35. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA ur. *WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System* 2004.

36. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma. I Swiss experience of 588 tumors. *Cancer* 2000;89:604-14.
37. Nagashima Y. Chromophobe renal cell carcinoma: clinical, pathological and molecular biological aspects. *Pathol Int* 2000;50 (11): 872-8.
38. Murphy WM, Beckwith JB, Faroww GM. Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures. *Atlas of Tumor Pathology, 3<sup>rd</sup> Series, Fascicle 13*, Washington (DC): Armed Forces Institute of pathology; 1994.
39. Weiss L, Gelb AB, Meideros J. Adult renal epitheal neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1995;103:624-35.
40. Molinie V, Cochand-Priollet B, Staroz F, Viellefond A I sur. Classification des tumeurs primitives du rein de l'adulte. *Ann Pathol* 1998;18: 29-47.
41. Eble JN. Recommendations for examining and reporting tumor-bearing kidney specimens from adults. *Sem Diag Pathol* 1998;15:77-82.
42. Amin MB, Corless CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kubus J, Schultz DS. Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *Am J Surg Pathol* 1997;21:621-35.
43. Allory Y, Ouazana D, Boucher E, Thiounn N, Viellefond A. Papillary renal cell carcinoma. Prognostic values of morphological subtypes in a clinicopathological study of 43 cases. *Virchows Arch* 2003;442 (4):336-42.

44. Cochand-Priollet B, Molinie V, Bougaran J, Bouvier R, Dauge-Geoffroy MC, Deslignieres S i sur. Renal chromophobe cell carcinoma and oncocytoma : a comparative morphologic, hystochemical and immunohistochemical study on 124 cases. Arch Pathol Lab Invest 1997;121:1081-6.
45. Srigley JR, Eble JN. Collecting duct carcinoma of the kidney. Sem Diagn Pathol. 1998;15:54-67.
46. Intenational Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors (6<sup>th</sup> ed). New York: Wiley-Liss;2003.
47. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol 1982;6:655-63.
48. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol 2003;27:612-24.
49. Mejean A, Oudard S, Thiounn N. Prognostic factors of renal cell carcinoma. J Urol 2003;169:821-27.
50. Van Poppel H, Vandehdriessche H, Boel K, Mertens V, Goethuys H, Hausetermans K i sur. Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. J Urol 1997;158:45-9.
51. Lang H, Lindner V, Saussine C, Havel D, Faure F, Jacqmin D. Microscopic venous invasion: a prognostic factor in renal cell carcinoma. Eur Urol 2000; 38:600-5.

52. Dekel Y, Koren R, Kugel V, Livne PM, Gal R. Significance of angiogenesis and microvascular invasion in renal cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2002;8:129-32.
53. Ziesman A, Pantuck AJ, Dorey F i sur. Mathematical model to predict individual survival for patients with renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:1368-74.
54. Yasunaga Y, Shin M, Miki T i sur. Prognostic factors of renal cell carcinoma: A multivariate analysis. *J Surg Oncol* 1998;68:11-18.
55. Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN i sur. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: Comparison for tumor grade, mitotic index and silver staining nucleolar organizer regions numbers. *J Pathol* 1993;170: 471-7.
56. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard JY i sur. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 2000;55:501-5.
57. Ozer E, Yorukoglu K, Gagol O i sur. Prognostic significance of nuclear morphometry in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2002;90:20-5.
58. Vasavada SP, Novick AC, Williams BG. P53, bcl-2 and Bax expression in renal cell carcinoma. *Urology* 1998; 51:1057-67.
59. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB i sur. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol* 2002;163:426-30.
60. Israel GM, Bosniak MA. Renal imaging for diagnosis and staging of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 2003;30:499-514.
61. Roy C, Buy X, el Ghali S. Imaging in renal cell cancer. *EAU Update Series* 2003;1:209-14.



62. Fučkar Ž i sur. Sonografija urogenitalnog sustava – II dio. Digital point, 2000; 1-116.
63. Van Popplel H, Deroo F, Joniau S. Open surgical treatment of localized renal cell cancer. EAU Update Series 2003;1:220-5.
64. Uzzo RG, Novick AC. Nephron-sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. J Urol 2001;166:6-18.
65. Novick AC. Nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma. Annu Rev Med 2002;53:393-407.
66. Rassweiler JJ, Abou C, Janetschek G i sur. Laparoscopic partial nephrectomy. The European Experience. Urol Clin North Am 2000;27(4):721-36.
67. Gill IS. Laparoscopic radical nephrectomy for cancer. Urol Clin North Am 2000;27(4):707-19.
68. Nieder AM, Taneja SS. The role of partial nephrectomy for renal cell carcinoma in contemporary practice. Urol Clin North Am 2003;30:529-542.
69. Mickisch GHJ. Surgical Treatment of Advanced Disease for Renal Cell Cancer. EAU Update Series 2003;1:230-6.
70. Mickisch GHJ. Rational selection of a control arm for randomized trials in metastatic renal cell carcinoma. Eur Urol 2003;43:670-9.
71. Gitlitz BJ, Figlin RA. Cytokine-based therapy for metastatic renal cell cancer. Urol Clin North Am 2003;30:589-600.
72. Milowsky MI, Nanus DM. Chemotherapeutic strategies for renal cell carcinoma. Urol Clin North Am 2003;30:601-609.

73. Negrier S, Caty A, Lesimple T i sur. Treatment of patients with metastatic renal carcinoma with combination of subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha with or without fluorouracil. *J Clin Oncol* 2000;18:400-9.
74. Mickisch GHJ, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R i sur. Radical nephrectomy plus interferon-alpha-based immunotherapy compared with interpheron-alpha alone in metastatic renal cell carcinoma: a randomized trial. *Lancet* 2001;358:966-70.
75. Mickisch GMJ, Carballido J, Hellsten S, Schulze H, Mensink H. Guidelines on renal cell carcinoma. *EAU Oncological Urology Group* 2002: 1-8.
76. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58-61.
77. Weinsts-Saslow, Steeg P. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *The FASEB Journal* 1994;8:401-406.
78. Polverini PJ. Cellular Adhesion Molecules – Newly Identified Mediators of Angiogenesis. *Am J Of Pathology* 1996; 148 (4): 1023-1028.
79. Weider N. Intratumor Microvessel Density as a Prognostic Factor in Cancer. *Am J of Pathology* 1995; 147 (1): 9-15.
80. Fieder IJ, Ellis LM. The implication of Angiogenesis for the Biology and Therapy of Cancer Metastasis. *Cell* 1995; 59: 12-17.
81. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability and Angiogenesis. *Am J of Pathology* 1995; 146 (5):1029-1039.

82. Morita T, Shinohara N, Tokue A. Antitumor effect of a synthetic analogue of fumagillin on murine renal carcinoma. *Br J Urol* 1994; 74 (4): 416-421.
83. Gerdes J, Li L, Schlueter C. Immunobiochemical and Molecular Biology Characterization of the Cell Proliferation – associated Nuclear Antigen That is Defined by Monoclonal Antibody. *Am J of Pathology* 1997; 139 (4), 867-873.
84. Thomas KA. Vascular endothelial cell growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271:603-606.
85. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182:311-22.
86. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257:231-7.
87. Kausch I, Jiang H, Brocks C, Bruderek K, Kruger S, Sczakiel G, Jocham, Bohle A. Ki-67 directed antisense therapy in an orthotopic renal cell carcinoma model. *Eur Urol* 2004; 46:118-125.
88. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumours. *Ann Surg* 1972; 175:409-416.
89. Bard RH, Mydlo JH, Freed SZ. Detection of tumor angiogenesis factor in adenocarcinoma of kidney. *Urology* 1986; 5:447-450.
90. Bosari S, Lee AKC, Delellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23:755-761.

91. Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularisation as a prognostic indicator in thin malignant melanomas. *Am J Pathol* 1994;145:510-514.
92. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401-409.
93. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1603-612.
94. Tanigawa N, Amaya H, Lu C, Kitaoka A. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1043-1046.
95. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M. Extent of tumor vascularisation correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1996;56:2671-6.
96. Schoell WMJ, Pieber D, Reich O. Tumor angiogenesis as prognostic factor in ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;80: 2257-62.
97. Nicol D, Hii S, Walsh M, The B, Thompson L, Kenett C. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J Urol* 1997; 157:182-6.
98. Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ. Markedly increased amounts of messenger RNAs for VEGF and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4233-7.

99. Yoshino S, Kato M, Okada. Prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma. *Int J Urol* 1995;2:156-160.
100. Paradis V, LaghaNB, Zeimoura L. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virch Arch* 2000;436:35-356.
101. Gregory T, Maclennan MD, David G, Bostwick MD. Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. *Urology* 1995; 46:27-30.
102. Suzuki K, Morita T, Hashimoto S, Tokue A. Thymidine phosphorylase/platelet-derived cell growth factor associated with prognosis in renal cell carcinoma. *Urol Res* 2001;29:7-12.
103. Slaton JW, Inoue K, Perotte P. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *AM J Pathol* 2001; 158:735-743.
104. Delahunt B, Bethwaite PB, Thorton A. Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal carcinoma. *Br J Urol* 1997;80: 401-404.
105. Leclercq NR, Epstein JI, Bansard JY. Clinical significance of cell proliferation, microvessel density and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 200;32: 1209-1215.
106. Sabo E, Boltenko A, Sova Y, Stein A, Kleinhaus S. Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:533-537.

107. Kohler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz EW, Bittinger A. Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1996;77:650-654.
108. Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, Ringert RH, Radzun HJ, Thelen P. Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis and necrosis in renal cell carcinoma. *Virch Arch* 2001;439:645-652.
109. Herbs C, Kosmehl H, Stiller KJ. Evaluation of microvessel density by computerized image analysis in human renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124:141-147.
110. Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urology* 2004;11:948-953.
111. Nagy JA, Brown LF, Senger DR. Pathogenesis of tumor atheroma generation: a critical role for early blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* 1989;948:305-326.
112. Gross JL, Moscatelli D, Jaffe EA, Rifkin DB. Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 1982;95:974-981.
113. Matusan K, Đorđević G, Stipić, Mozetič V, Lucin K. Osteopontin expression corelate with prognostic variables and survival in conventional renal cell carcinoma. 2005 (u tisku)
114. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-1186.

115. Ebbinghaus SW, Gordon MS. Renal cell carcinoma: rationale and development of therapeutic inhibitors of angiogenesis. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18:1143-159.
116. Clifford SC, Maher ER. Von Hippel-Lindau disease: clinical and molecular perspectives *ADV Cancer Res* 2001;82:85-105.
117. Linehan WM. Molecular targeting of VHL gene pathway in clear cell kidney cancer. *J Urol* 2003;170:593-594.
118. Na X, WU G, Ryan CK, Schoen SR, Messing EM. Overproduction of VEGF related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *J Urol* 2003;170:588-592.
119. Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1569-1575.
120. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-28.
121. Sullivan DC, Bicknell R. New molecular pathways in angiogenesis. *Br J Cancer*;89:228-231.
122. Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:35-40.
123. Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* 2003;21:118-119.

124. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of VEGF. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.
125. Rini B, Small E. Biology and clinical development of VEGF- targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:1028-1043.

www.ijerph.com  
IJERPH



## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam prije 38 godina u Rijeci. Osnovnu i srednju školu pohađao sam u rodnom gradu. Medicinski fakultet u Rijeci upisao sam 1985. godine, te diplomirao u travnju 1991. godine.

Od prosinca 1989. godine aktivno sam uključen u rad Službe za ultrazvučnu dijagnostiku KBC Rijeka. Od 1992. do 1995. godine radio sam pri Kirurškoj klinici – Urološkom odjelu KBC Rijeka kao znanstveni novak na projektu Ministarstva znanosti Republike Hrvatske i Medicinskog fakulteta u Rijeci. U lipnju 1996. godine obranio sam magistarski rad.

Razdoblje od 1995-2000. godine proveo sam na specijalizaciji iz urologije, te u listopadu 2000. godine položio specijalistički ispit. Radim kao odjelni liječnik pri Urološkom odjelu Kirurške klinike KBC Rijeka.

Bio sam član Organizacijskog odbora, predavač i voditelj vježbi u okviru Poslijediplomskog tečaja "Sonografija urogenitalnog sustava", te tečaja "Sonografija u hitnim stanjima" u razdoblju 1992-1999. godina. Član sam Uređivačkog odbora časopisa Hrvatskog liječničkog zbora – podružnice Rijeka - "Medicina".

Jedan sam od urednika i koautora poglavlja u knjigama "Sonografija urogenitalnog sustava - I i II dio" (1998-2000 g.), te koautor poglavlja u knjizi "Ultrazvuk u kliničkoj praksi" (2004.g.). Do sada su objavljena 33 rada iz područja urologije, transplantacije bubrega i ultrazvučne dijagnostike i terapije u kojih sam jedan od autora. Deset radova je objavljeno u časopisima citiranim u Current Contentu. Aktivno sam sudjelovao na dvadesetak kongresa i simpozija u zemlji i inozemstvu.

Oženjen sam i otac troje djece.